

What doesn't kill you makes you stronger – novel method to improve the efficacy of assisted reproduction

Losonczy Eszter*
Pribenszky Csaba

E. Losonczy*
Cs. Pribenszky

Állatorvostudományi Egyetem
Állathigiéniai,
Állomány-egészségtani és Állatorvosi
Etológiai Tanszék
1078 Budapest, István u. 2.

* e-mail: losonczy.eszter@univet.hu

Ami nem öl meg, az megerősít – új eljárás az asszisztált reprodukciós technikák hatáskörének növelésére

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen tanulmányukban összefoglalják mindazokat a kutatási eredményeket, amelyek az embriók és ivarsejtek életképességét javítják egy ún. stressz-előkezelés segítségével, ezáltal növelve a különböző asszisztált reprodukciós eljárások hatékonyságát. Bár a laboratóriumi munka során óvjuk e sejteket a kedvezőtlen környezeti tényezőktől (stresszoroktól), mégis, az elmúlt évtized kutatásai rámutatnak, hogy a sejteket ért stresszhatásnak pozitív hatásai is lehetnek. Amennyiben meghatározott mértékű és megfelelően kivitelezett stresszhatással előkezeljük (pre-kondicionáljuk) őket, növelhetjük a negatív környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodóképességüket.

SUMMARY

Background: Several methods have been developed in the last decades, which require in vitro manipulation, culture, and fresh or cryopreserved storage of gametes and embryos. These techniques, like gamete and embryo cryopreservation, in vitro embryo production and culture, and somatic cell nuclear transfer necessitate meticulously adjusted conditions to avoid or minimize the harmful effects of uncontrolled stress. However, several studies in the last ten years indicate that purposefully applied stress have a positive effect on cells' quality, viability, and developmental competence.

Objectives: The aim of this review is to summarize research results on the effects of stress preconditioning on gametes and embryos of several species, provided that this pretreatment is introduced before various processes of assisted reproduction.

Materials and Methods: Review of the published literature.

Results and Discussion: If gametes and embryos are subjected to a well-defined and properly applied stress, it may induce their general adaptation and increase tolerance to various in vitro procedures, like long-term storage, cryopreservation, culture, and manipulations. The term "well-defined and properly applied" is of capital importance; only this type of stress pretreatment may increase the general tolerance of the cells. Although cellular and subcellular mechanisms supposedly contributing to these processes require further research, the new principle, i.e., to improve the stress tolerance by a defined sublethal stress, instead of passively satisfying the cells' physiological needs, may outline a completely new strategy in mammalian embryology, as well as cryopreservation of other cells and tissues. This procedure, besides its scientific value, may have significant practical consequences resulting in tangible economic benefits in many fields.

Az emlős embriók és ivarsejtek természetes körülmények között nem kerülnek ki a szervezetből, hanem *in vivo*, számukra biztonságos, optimális körülmények között fejlődnek és látják el feladatukat. Az embriológiai kutatások fejlődésével párhuzamosan azonban megszületett az igény a különböző sejtek testen kívüli, *in vitro* körülmények közötti életben tartására és manipulálására is.

A 19. század második felében kezdődtek meg az *in vitro* embriológiai kutatások

A 19. század második felében kezdődtek meg azok a kutatások, amelyek már a szervezeten kívül, *in vitro* körülmények között vizsgálták a különböző sejtek, szövetek, szervek működését. Már ekkor SIDNEY RINGER azt vizsgálta, hogy a szívbe áramoltatott perfúziós oldat ionösszetétele milyen hatással van a szív összehúzódásaira (56), WALTER HEAPE pedig sikeresen mosott ki nyúlembriókat donor méhből, majd ültetett át recipiens méhbe (22). 1934-ben GREGORY PINCUS *in vitro* termékenyítéssel kísérletezett (43), majd a következő évtizedekben HAMMOND (20), WHITTEN (70) és ADAMS (1) egymásra épülő kutatásainak eredményeképpen születtek meg azok az embriótenyésztő oldatok, amelyek az embriológiában ma is használt médiumok alapjait képezik. Mivel maguk a kutatások, később pedig az ezek eredményeképpen kidolgozott módszerek pont a kutatások alanyaira, azaz az ivarsejtekre, embriókra nézve potenciálisan veszélyeket hordoznak magukban (18, 63), megkezdődött a különböző tenyésztőoldat-gyártó vállalatok kutatólaboratóriumaiban az ivarsejtek, embriók igényeit minél jobban kielégítő újabb és újabb oldatok fejlesztése. Az ilyen irányú fejlesztések célja többnyire az volt, hogy az átmenetileg *in vitro* körülmények között tartott ill. tenyésztett sejtek számára az *in vivo* körülményeket minél pontosabban lemásolja, imitálja. Mivel az *in vivo* lezajló folyamatokat a legtöbb esetben nem ismerjük kellő mélységben, és ha ismernénk is, nem tudjuk tökéletesen létrehozni *in vitro*, mesterséges körülmények között, (4, 37), az embriológusoknak többnyire bele kell törődniük abba, hogy az ilyen módon tartott ivarsejtek, ill. tenyésztett embriók minősége némileg károsodik az eljárások során. Ezen tökéletlenségek tetten érhetők többek között az élettani eltérésekben, génexpressziós változásokban, valamint fejlődésbeli zavarokban.

Egy olyan laboratóriumi technológia alkalmazása, amely nem csupán passzívan próbálja csökkenteni a káros hatásokat, hanem aktívan képes növelni az ivarsejtek, embriók ellenálló képességét, termékenyítő vagy termékenyülő képességét, fejlődési potenciálját, korábban a legtöbb embriológus fejében még elképzelés-ként sem merült fel. A jelen áttekintésben csokorba fogott kutatási eredmények azonban azt bizonyítják, hogy az ismert „Ami nem öl meg, az megerősít” FRIEDRICH NIETZSCHE-idézet nemcsak az egyén, hanem a sejtek szintjén is igaz lehet.

A STRESSZ ÉS ALKALMAZÁSA MINT PREKONDITIONÁLÁS

A környezeti stressz indukálta szervezeti reakciókat az 1900-as években írták le

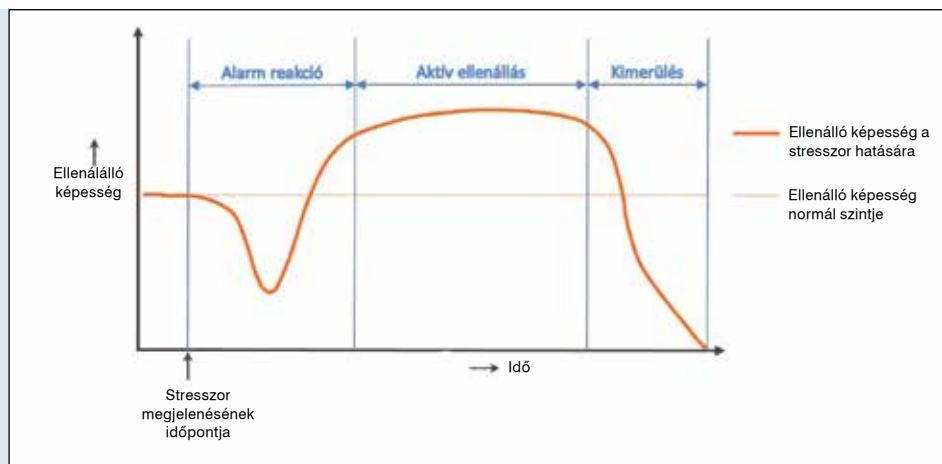
A környezeti stressz által kiváltott reakciók vizsgálatának első tudományos eredményeit 1915-ben CANNON, majd 1936-ban SELYE stresszelmélete fogalmazta meg. CANNON felismerte, hogy a külső környezet hirtelen változásaira az állati és emberi szervezet egy ún. akut stresszreakcióval, a később róla elnevezett Cannon-féle vészreakcióval válaszol, amelynek során a szimpatikus idegrendszer aktiválódik, és ennek hatására a szervezet energiatartalékainak mozgósítása révén képes lesz a menekülésre, vagy a káros hatás elhárítására (8).

SELYE azt vizsgálta, hogy az emberi szervezetre hogyan hatnak a külső környezet változásai, és ennek során felismerte, hogy különböző betegségek, ill. környezeti hatások sokszor hasonló tüneteket is kiváltanak. Ez alapján feltételezte, hogy ezek a közös tünetek egy általános válaszreakció részét képezhetik, amit generalizált adaptációs szindrómának nevezett el. Az adaptáció első fázisa az alarmreakció, amely tulajdonképpen a Cannon-féle vészreakciónak felel meg. A szervezet azonban nem képes ezen állapot hosszabb távú fenntartására, így tartósabb környezeti hatás esetén a szervezet vagy eljut az aktív ellenállás fázisába, amikor is az új

1. ÁBRA. A stresszor hatására bekövetkező változás az ellenálló képességben

FIGURE 1. Effect of a stressor on resistance

Ábrafelirat: Ellenálló képesség 2x



A stressz ellenőrzött alkalmazása javítja a sejtek reakciókészségét, ellenálló képességét

viszonyoknak megfelelően egy új egyensúlyi állapot alakulhat ki, vagy pedig túlságosan erős, kivédhetetlen környezeti hatás esetében a kimerülés szakaszába kerül (1. ábra) (59). Az előbbi fázisoknak megfelelően az élőlényre ható stressz egy bizonyos szintig javítja a reakciókészséget, az ellenálló képességet, azaz a teljesítményt, és csupán akkor lesznek káros hatásai, ha a környezeti hatás ezen a szinten túllép. E felismerésből eredeztethető az az elmélet, amely szerint ha ez a bizonyos környezeti tényező nem véletlenszerűen, kontrollálatlanul éri a szervezetet, hanem azt tudatosan, pontosan meghatározott erősséggel és ellenőrzött módon alkalmazzuk, akkor segítségével növelhető lehet a teljesítmény akár a szervezet, akár pedig a sejtek szintjén.

Jelen összefoglaló egy olyan *in vitro* technológia fejlesztését és alkalmazási területeit mutatja be, amely már bizonyított módon növeli az ivarsejtek, embriók és őssejtek általános ellenálló képességét, és ezáltal a különböző beavatkozások utáni felhasználhatóságát. E módszer működési elve az, hogy egy, a sejtek életképességét még nem rontó mértékű stresszelőkezelést követően megnő a kezelt sejtek egyéb stresszorokkal szembeni ellenálló képessége, így kevesebb alaki és működésbeli károsodást szenvednek el a fagyasztást vagy egyéb beavatkozásokat követően. A kezelés kövekezményeképpen a sejtek megnövekedett termékenyítő, ill. termékenyülő képességgel, valamint fejlődési potenciállal rendelkeznek a felhasználáskor. Jelen cikk az alkalmazható stresszorok közül főként a magas hidrosztatikus nyomásra fókuszál, amely elsőként került sikeres alkalmazásra, mint szubletális – azaz a halálosnál kisebb erősségű, a vizsgált sejteket nem károsító – stresszelőkezelés. Ezen kívül megkíséreljük sorra venni mindazokat a tényezőket, amelyek szerepet játszhatnak az ellenálló képesség javításában, valamint felvázoljuk, hogy milyen jövőbeni alkalmazásai lehetnek e módszernek.

A nagy hidrosztatikai nyomás szubletális stresszelőkezelésként használható

A NAGY HIDROSZTATIKUS NYOMÁS MINT STRESSZELŐKEZELÉS

Azt az ötletet, hogy a nagy hidrosztatikai nyomást mint szubletális stresszelőkezelést alkalmazzuk embriókon és ivarsejteken az ellenálló képességük növelése céljából, korábbi élelmiszer-mikrobiológiai kutatások meglepő eredménye adta. Érdekes módon ez az – élelmiszeripari szempontból egyébként kedvezőtlen – eredmény lett az alapja számos korábbi és jelenleg is folyó kutatásnak.

HÍTE az 1900-as évek elején a magas hidrosztatikus nyomáskezelést követően hosszabb eltarthatóságról és jobb minőségről számolt be tej és gyümölcsök esetében. Azt tapasztalta, hogy 450–600 MPa erősségű nyomás hatására csökkent a kezelt élelmiszerek csíraszám, viszont az egyéb tartósítási módszerekhez

hasonlítva az élelmiszerek minősége csak kisebb mértékben károsodott (23). Mivel azonban a szükséges mértékű nyomás kialakítása az élelmiszerek széles körén és nagyobb mennyiségeken alkalmazva komoly kihívás elé állította volna az élelmiszeripart, kombinált kezelési eljárásokat használtak, mérsékelt erősségű nyomás és kisebb mértékű hőkezelés egymást követő alkalmazásával. A két enyhébb, szubletális, azaz a baktériumokat önmagában el nem pusztító stressz egymást követő alkalmazásától azt várták, hogy hatásuk összeadódik, és ezáltal elérhető az élelmiszer-patogén csíraszám kellő csökkenése az élelmiszerekben. A várt eredményekkel éles ellentétben azonban WEMEKAMP-KAMPHUIS és mtsai azt tapasztalták, hogy a *Listeria monocytogenes* szaporodása nemhogy csökkent volna, hanem szignifikánsan növekedett a hűtés és a nyomáskezelés egymás utáni alkalmazását követően (69). Ez arra engedett következtetni, hogy az első szubletális mértékű kezelés felkészítette a baktériumokat arra, hogy jobb hatásokkal éljék túl a második, szintén szubletális mértékű kezelést.

A magas hidrosztatikus nyomás azonnal és egyforma mértékben hat a minta minden pontjára

Erre a megfigyelésre alapozta kutatócsoportunk azokat a vizsgálatokat, amelyek az asszisztált reprodukció során alkalmazott *in vitro* eljárások hatékonyságát igyekeztek növelni szubletális mértékű stresszelőkezelés segítségével. De nem csupán a magas hidrosztatikus nyomás, hanem minden megváltozott környezeti tényező (hő, hiper- vagy hipoozmotikus viszonyok, éheztetés, mechanikai behatások, besugárzás stb.) stresszként hat a sejtekre, szervezetre, tehát mindegyik képes stressz-válaszreakciót kiváltani a sejtekben. Számos tulajdonsága miatt mégis a magas hidrosztatikus nyomás bizonyult a legalkalmasabbnak a szubletális stresszelőkezelés céljára. Egyik fontos tulajdonsága, hogy – ellentétben az összes többi stresszszorral – a nyomás felépülésével egyidejűleg, azonnal és egyforma mértékben hat a minta minden pontján. Ennek köszönhetően nem szükséges azt figyelembe venni, hogy a kezelés mennyi idő alatt tud a minta minden pontján hatást kiváltani – azaz penetrálódni –, ill. hogy egyáltalán eljut-e a minta minden pontjához. Ezen tulajdonságai mellett a hidrosztatikus nyomáskezelés biztonságosan, nagy pontossággal kivitelezhető és fenntartható az erre a célra kialakított berendezésekben. Emellett bizonyítást nyert, hogy – ellentétben pl. a hőkezeléssel, ozmotikus vagy oxidatív stresszel – a sejtek igen nagy mértékben képesek a nyomáskezelésnek ellenállni, így tág határok közötti nyomáskezelést lehet alkalmazni, anélkül hogy veszélyeztetnénk a sejtek túlélését.

A hidrosztatikus nyomáskezelés nagy pontossággal kivitelezhető és fenntartható

Hogy érzékelhetővé váljon a sejtek meglepő mértékű alkalmazkodóképessége a hidrosztatikus nyomással szemben, érdemes áttekinteni a Földön és főként a tengerekben, különböző mélységekben mérhető hidrosztatikus nyomást. Az atmoszferikus nyomás nagysága tengerszint magasságon kb. 1 bar, azaz 0,1 MPa, ez tehát az a nyomásérték, amelyhez mi, emberek, a növény- és állatvilág jelentős része – köztük a jelen cikk témájául szolgáló háziállataink –, a minket körülvevő környezetben élő baktériumok alkalmazkodtak az elmúlt évmilliók során. 10 MPa nyomás megfelel az ezer méter magas vízoszlop nyomásának, ez az a mélység, ameddig a katonai célú atom-tengeralattjárók még lemerészkednek. A Marianna-árokban mérhető hidrosztatikus nyomás kb. 100 MPa, ebben a nagyságrendben csak egyes barofil organizmusok képesek túlélni. Mindezek ismeretében igen meglepő, hogy a petesejtek, a spermiumok, az embriók, az őssejtek kezelésének optimális tartománya – amelyet az **1. táblázat** mutat be részletesen – a 30–60 MPa értékek közé esik.

A magas hidrosztatikus nyomáskezelés túlélést és ellenálló képességet javító hatásait kutatócsoportunk tíz éve kezdte vizsgálni. Egy-egy új sejttípus kezelési paramétereinek meghatározására egy általános protokollt alakítottunk ki. A kísérletek során meghatározzuk és leírjuk az adott minta stressztoleranciáját, majd ez alapján kerül a sejt-specifikus kezelési protokoll meghatározásra. Az eljárást PTAT-protokollnak hívjuk, a „Pressure Triggered Activation of Tolerance” kifejezés alapján (jelentése: nyomás által kiváltott ellenálló képesség növekedése).

A kísérletek első lépéseként definiáljuk és standardizáljuk a vizsgált sejttípus

1. TÁBLÁZAT. Optimális és szubletális nyomáskezelés mértéke különböző emlős ivarsejtek és embriók esetében**TABLE 1.** Optimal and sublethal pressure levels for various mammal gametes and embryos

	Optimális nyomáskezelés mértéke	Optimális nyomáskezelés időtartama	A szubletális tartomány
Embrió (szarvasmarha, juh, egér)	40–60 MPa	30–60 min	≤ 80 MPa
Petesejt (sertés, egér, humán)	20 MPa	60–90 min	≤ 60 MPa
Spermium (ló, szarvasmarha, sertés, nyúl)	10–30 MPa	90–120 min	≤ 60 MPa
Embrió test	60 MPa	30–60 min	≤ 80 MPa

Első lépésben meghatározzák a vizsgálandó sejtípus in vitro túlélését, funkcióját jellemző, mérhető paramétereket

Második lépésben meghatározzák a mintatárolót, a tenyésztőoldatot és a hígítót

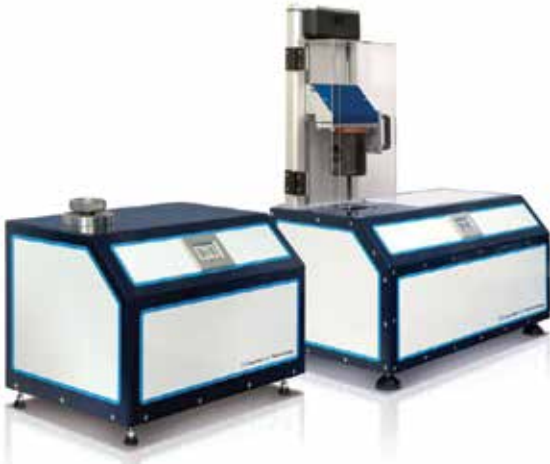
A következő lépés a hidrosztatikus nyomáskezelés beállítása

azon mérhető funkcióit, amellyel az adott sejtek *in vitro* túlélése, működése jellemezhető. Ez jellemzően a spermiumok esetében a motilitás, a membránintegritás, a DNS-fragmentáció és a mitokondriumok aktivitásának mértéke. Embriók esetében vizsgáljuk a reexpanziót, azaz a mélyhűtést követő összeesett – vagy más néven kollabált – állapotból történő visszaalakulást, a további osztódásra való képességet, a blasztociszta állapotig eljutott embriók arányát és sejtszámát. Petesejtekénél a termékenyülésre való képesség, ezt követően a petesejtből keletkezett embriók fejlődése és az előbb említett, embriókra vonatkozó vizsgálatok nyújtanak információt.

Ezt követően meghatározzuk, hogy a vizsgált sejtípus milyen mintatárolóban, milyen tenyésztőoldat, ill. hígító hozzáadásával kezelhető. A mintatárolóval szemben elvárás, hogy levegőbuborékoktól mentesen feltölthető legyen, rugalmas anyaga révén képes legyen a nyomás átadására, és hermetikusan lezárható legyen. A gyakrabban alkalmazott mintatárolók a minta térfogatától függően a 0,25 ml-es, 0,5 ml-es és 5 ml-es műszalmák, a Luer lockkal ellátott 2 ml-es, 5 ml-es, 10 ml-es fecskendő, vagy a 100 ml-es és 500 ml-es transzfúziós zsákok. A minta megfelelő tenyésztőoldatban vagy hígítóban kerül a mintatárolóba (embriók esetében pl. TCM-199, M2, G-MOPS; spermiumok esetében spermahígító).

A következő fázis feladata annak megállapítása, hogy a sejt milyen mértékű hidrosztatikus nyomásra reagál pozitívan, ill. milyen mértékű hidrosztatikus nyomást képes még károsodás nélkül túlélni. E lépés során mátrix rendszerben vizsgáljuk a hőmérsékletnek (20–24 °C, azaz szobahőmérséklet és 37–38 °C, azaz testhőmérséklet, emlős sejtek esetében), a nyomáskezelés mértékének (5–80 MPa), valamint a nyomáskezelés időtartamának (15–120 perc) a hatását a minta életképességet jellemző tulajdonságain. A nyomáskezelés az erre a célra kialakított berendezésben (2. ábra; GBOX 2010 ill. GBOX 2140, Applied Cell Technology Kft., Budapest, Magyarország) történt minden egyes referált kísérletben. A berendezés a kezelést megelőzően a kívánt hőmérsékletre felmelegíti a desztillált vízzel feltöltött nyomáskamrát, majd a minta behelyezése után a nyomáskamra lezáródik, és a beállított nyomásprogramot a készülék automatikusan kivitelezi, a megadott hőmérsékleten, nyomásértéken és időtartamban. A javító hatás a kísérlet végpontjától függően már ebben a fázisban is tetten érhető a megfelelő kezelési paraméterek alkalmazásakor.

Ezután, a kutatás harmadik szakaszában az előző fázisban megállapított mértékű, időtartamú és hőmérsékletű PTAT-kezelést követően már megtörténik az a beavatkozás – leggyakrabban mélyhűtés – is, amely hatékonyságának növelése a cél. E beavatkozást követően összehasonlítjuk a PTAT-kezelt és az előkezelésben nem részesült (kontroll-) minták életképességét jellemző paramétereket *in vitro*



2. ÁBRA. A PTAT-előkezelés automatikus kivitelezésére szolgáló GBOX 2010 és 2140 készülék

A GBOX 2010 (a képen bal oldalon) nyomáskamrája 100 cm³-es, és 2–90 MPa közötti nyomásértékek előállítására alkalmas. Kisebb térfogatú minták, pl. embriók, petesejtek, embryoid bodyk kezelhetők a segítségével. Ezzel szemben a GBOX 2140 (a képen jobb oldalon) nagyobb, 1400 cm³-es nyomáskamrájának köszönhetően nagyobb térfogatú minták, pl. bikasperma, kansperma, köldökzsinórvér kezelésére is alkalmazható, 2–40 MPa közötti nyomásértékeken

FIGURE 2. GBOX 2010 and 2140 instruments for PTAT pretreatment

GBOX 2010 (on the left side) contains a 100 ml pressure chamber, and is designed to perform pressure levels between 2 and 90 MPa, for samples of smaller volume (e.g. embryos, oocytes, embryoid bodies). GBOX 2140 (on the right side) has a 1400 ml pressure chamber, thus is capable of treatment of large sample sizes such as boar and bull semen, or umbilical cord blood, between the levels of 2 and 40 MPa

körülmények között. A PTAT-kezelést szükség esetén a sejtek feldolgozási protokolljának több különböző pontján is elvégezzük, hogy ezáltal megtaláljuk azt a pontot, ahol a kezelés a maximális javító hatást képes nyújtani.

A kutatások utolsó fázisában a minták mélyhűtést – vagy egyéb beavatkozást – követő túlélését már annak figyelembevételével vizsgáljuk nagyszámú mintán, hogy a minták felmelegítése után az adott sejtípus *in vivo* képes-e biológiai funkcióinak ellátására. Így spermiumok esetében a mesterséges termékenyítés során megfigyelt termékenyítőképeséget, a termékenyített anyától elérhető utódszámot; petesejtek esetében a termékenyülésre, majd az osztódásra való képességet; embriók – ill. a kezelt petesejtekből keletkezett embriók – esetében a további osztódásokat, az embrió beültetését követően a megtapadást, *in vivo* fejlődést és terminusra történő megszületést vizsgáljuk. Végző soron tehát mindhárom esetben az inszeminálást, ill. embriótranszfert követően a vemhesség és az életképes utód létrejötte, ill. ennek aránya az a végpont, amelyek segítségével mérjük a PTAT-kezelt és a kontrollminták közötti különbséget.

A PTAT-KEZELÉSSSEL ELÉRT EREDMÉNYEK

A következő alfejezetekben sejtípusonként foglaljuk össze mindazokat az eredményeket, amelyeket a világ több kutatócsoportja ez idáig elért a magas PTAT-protokoll segítségével a különféle asszisztált reprodukciós eljárásokban. A kutatások számszerű eredményei a [2. táblázat](#)ban láthatóak.

BLASZTOCISZTA STÁDIUMÚ EMBRIÓK

Több független kutatócsoport is vizsgálta a PTAT-kezelés egér-, szarvasmarha- és juhembriókra kifejtett hatását. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a kezelésen átesett embriók a mélyhűtés után nagyobb arányban maradtak életben, valamint nagyobb arányban nyerték vissza a fejlődésre való képességüket, mint az előkezelésben nem részesülő embriók.

Bár a blasztociszta állapotú embriók állatfajtól függetlenül károsodás nélkül túléltek a 80–90 MPa erősségű nyomást is, stresszelő-kezelésként alkalmazva a 40–60 MPa erősségű, 30–70 perc időtartamú kezelést bírta a legkedvezőbb hatással. Szintén állatfajtól függetlenül megfigyelhető volt a kezelést követően az embriók üregének átmeneti, reverzibilis összeszűkülése, az embrió kollabálása.

Az *in vivo* előállított blasztociszta egérembriók esetében a 30 percen át tartó 60 MPa erősségű behatás bizonyult hatékonynak. Ezen értékekkel végzett PTAT-kezelés gyors mélyhűtést megelőzően szignifikánsan megnövelte az embriók fagyasztást követő túlélését (50).

Az *in vitro* előállított szarvasmarha-embriók nagyobb, 80 MPa erősségű nyomást is károsodás nélkül elviseltek 45 percen keresztül, és az egérembriókhoz hasonlóan esetükben is a mélyhűtést követő túlélés jelentősen javult (52). Hasonló eredményt hozott ugyanebben a fajban a 60 MPa erősségű, 60 percen át tartó PTAT-kezelés

**Több nemzetközi
kutatócsoport is
visszaigazolta a
PTAT-kezelés
hatékonyságát embriók
esetében**

is, amelyet követően hagyományos mélyhűtés helyett vitrifikációt alkalmaztunk (60). A vitrifikáció alkalmazásával a kontrollként szereplő, PTAT-kezelésben nem részeseült embriók túlélési aránya is javult, de a PTAT-kezelésen átesett embriók esetében ehhez képest is emelkedett a túlélési arány, a re-expandálódott embriók aránya, és a zona pellucidából kibújt, azaz hatchingelt embriók aránya is. E kedvező hatás leginkább akkor volt tapasztalható, amikor a PTAT-kezelést egy óra inkubáció követte a vitrifikációt megelőzően (60).

Popovic és mtsai *in vitro* előállított, majd hét napig *in vitro* tenyésztett szarvasmarha-embriókat morfológiai jellemzőik alapján három – kiváló, azaz fagyasztható és beültethető, jó, azaz fagyasztásra a korábbi tapasztalatok alapján alkalmatlan, így csak frissen beültethető; ill. gyenge, azaz frissen sem beültethető – minőségi osztályba soroltak, alávetették 60 MPa erősségű, 60 percen át tartó PTAT-kezelésnek, majd egy óra inkubációt követően vitrifikálták azokat (44). Az embriók felmelegítése után vizsgálták, hogy az egyes minőségi csoportokból milyen arányban kerültek ki beültetésre alkalmas minőségű blasztociszták. Az eredmények azt mutatták, hogy ugyan a kiinduláskor kiváló minőségű embriók esetében nem volt különbség a beültethető embriók arányában, a jó kategóriába eső embrióknál viszont a PTAT-kezelés szignifikánsan javított ezen a mutatón, így mélyhűtésre alkalmassá tette a kezelés nélkül csak frissen felhasználható embriókat. Emellett a jó minőségi osztályba sorolt embriók szignifikánsan nagyobb arányú élő sejtet tartalmaztak, mint a PTAT-kezelést nem kapott csoport. A beültetést követően a vemhességi arányban nem volt szignifikáns eltérés a PTAT-kezelésen átesett, ill. előkezelés nélküli embriók között, viszont a PTAT-csoport nagyobb számban fagyaszthatóvá és beültethetővé vált embriói biztosították az eljárás gazdasági relevanciáját (44).

TRIGAL és mtsai szintén *in vitro* előállított, majd 7–8 napig *in vitro* tenyésztett szarvasmarha-embriókat vetettek alá az előzővel megegyező mértékű PTAT-kezelésnek a vitrifikációt megelőzően. Az embriók felmelegítése után nem volt eltérés a vitrifikációt túlélő embriók arányában, azonban a PTAT-kezelésen átesett embriók esetében a felmelegítés után 48 órával szignifikánsan nagyobb volt az embriócsomót képező sejtek száma, amely egyértelmű jele a kezelt embriók magasabb minőségének és jobb fejlődési potenciáljának (65).

BOGLIOLO és mtsai friss és mélyhűtött juh embriókon végzett kísérleteikben alkalmazták a PTAT-kezelést. Tapasztalatuk szerint a 40 MPa erősségű, 70 perc időtartamú, testhőmérsékleten végzett PTAT-kezelés hatására az embriók jobb minőségűek lettek, mint a kezeletlen kontrollembriók, amelyet a nagyobb sejt-szám és a piknotikus, azaz károsodott magvú sejtek alacsonyabb aránya jelzett (7). A vitrifikált blasztociszta embriók esetében is tetten érhető volt a PTAT-kezelés kedvező hatása, amelyet a nagyobb arányú túlélés és a piknotikus sejt-magok kisebb száma jelzett (35).

HÍMIVARSEJTEK

Mind a sertés-, mind pedig a szarvasmarhaspermára vonatkozó kísérletek során a PTAT-kezelés eredményeképpen a mélyhűtést követően nagyobb arányú túlélés, ill. hosszabb eltarthatóság volt megfigyelhető.

Kutatócsoportunk sertéshímivarsejtek PTAT-kezelésével és rutin inszeminálásával vizsgálta, hogy a kezelésnek van-e esetleges negatív hatása a vemhességre és az alomlétszámra. Az ejakulátumokat donoronként felezve a kezelt csoport 30 MPa erősségű 90 percen át tartó PTAT-kezelést kapott, míg a kontroll a hagyományos feldolgozási folyamaton ment keresztül. A kezelt és kontroll ejakulátumokat 4–24 óra elteltével mesterséges termékenyítés során felhasználva az látszott, hogy a PTAT-kezelés hatására a vemhességi arány és fialási arány nem változott, azonban az alomlétszám szignifikáns növekedése volt megfigyelhető a kontroll, kezeletlen spermával inszeminált csoporthoz képest. Érdekes módon a javító hatást csak sülők esetében tapasztaltuk. A PTAT-kezelés kedvező hatása *in vitro* körülmények

**Hazai és külföldi
tapasztalatok is
alátámasztották a
PTAT-kezelés kedvező
hatását spermium-
mélyhűtés esetén**

2. TÁBLÁZAT. Ivarsejtekkel és embriókkal elért kutatási eredmények magas hidrosztatikus nyomás (PTAT) előkezelést követően**TABLE 2.** Summary of research results obtained following high hydrostatic pressure (PTAT) pretreatment

A kezelt sejt típusa	A kezeléssel elérni kívánt cél	A magas hidrosztatikus nyomás (PTAT) előkezeléssel elért eredmény (kezelt vs. kontroll)
<i>In vitro</i> előállított szarvasmarha-blasztociszta	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*81% vs. 41%-a az embrióknak élte túl a lassú mélyhűtést (16)
	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*76% vs. 63%-a az embrióknak bújt ki az öt körülvevő burokból a vitrifikációt követően (17)
	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*68% vs. 36%-a transzferálható a kiinduláskor „jó” kategóriába eső embrióknak a vitrifikációt követően (18)
	az embriók minőségének javítása	*73% vs. 55% élő sejt a blasztocisztában vitrifikációt követően (18)
	az embriók minőségének javítása	*50 vs. 39 sejt az embriócsomóban (19)
<i>In vitro</i> előállított juhblasztociszta	az embriók minőségének javítása	*161 vs. 124 blasztociszta sejtszám; *1,3 vs. 3,8 piknotikus index (20)
	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*2,3 vs. 4,8 piknotikus index (21)
<i>In vivo</i> előállított egémbriók	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*94% vs. 46%-a az embrióknak nyerte vissza eredeti formáját vitrifikációt követően (15)
	a génexpressziós változások vizsgálata	*a kiválasztott gének magasabb expressziója 0–120 perccel a nyomás előkezelést követően (57)
Ejakulált szarvasmarhasperma	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*21% növekedés a motilitásban lassú fagyasztást követően (27) *62% vs. 54% motilitás lassú fagyasztást követően (28)
	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*59% vs. 37% motilitás lassú fagyasztást követően (23)
Ejakulált sertéssperma	az alomlétszám növelése mélyhűtött spermás inszeminálást követően	*9,4 vs. 4,4 élő alomlétszám (termékenyülési arány ~70% mindkét csoportban) (25)
	a vemhességi arány és az alomlétszám növelése mélyhűtött spermás inszeminálást követően	*82% vs. 61% vemhességi arány *78% vs. 59% fialási arány *10,8 vs. 8,0 alomlétszám *9,4 vs. 7,3 élve született malac/alom *8,0 vs. 6,2 élő malac/alom 42 napos korban (születési súly ~1,7 kg mindkét csoportban, 42 napos testtömeg ~13,3 kg mindkét csoportban) (26)
	az alomlétszám növelése friss spermás inszeminálást követően	*12,4 vs. 11,4 alomlétszám (termékenyülési arány ~80% mindkét csoportban) (22)
	fehérjeprofил változások vizsgálata	*egyes, a megtermékenyülésben szerepet játszó fehérjék megnövekedett termelődése (24)

(folytatás a következő oldalon)

között is tapasztalható volt; a kezelt sperma rutin körülmények közötti eltarthatósága megnövekedett (53).

További kutatások kimutatták, hogy a PTAT-kezelésen átesett sertéssperma kevésbé károsodott a mélyhűtés következtében, mint a kezelésben nem részesült kontrollminta (26, 49). Ezen eredmények tükrében a PTAT hatékony módszert jelenthet a mélyhűtött sertésspermával végzett termékenyítések esetében, megnövelve az eljárás meglehetősen gyenge hatásfokát (32).

HORVÁTH és mtsai már *in vivo* vizsgálatokkal igazolták a mélyhűtött sertéshímivarsejtekkel végzett termékenyítés létjogosultságát. A kutatócsoport PTAT-kezelést, majd mélyhűtést követően a felolvasztott örökítőanyagot kocák inszemi-

A kezelt sejt típusa	A kezeléssel elérni kívánt cél	A magas hidrosztatikus nyomás (PTAT) előkezeléssel elért eredmény (kezelt vs. kontroll)
<i>In vitro</i> maturáción átesett sertéspetesejtek	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*15% vs. 1%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává vitrifikációt, majd parthenogenetikus aktiválást követően (29, 30)
	a szomatikus sejtmagátültetéses klónozás eredményességének javítása	*57% vs. 28%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává (Yucatan sejtvonal) (31) *68% vs. 48%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává (Large white sejtvonal) (32) *56 vs. 49 blasztocisztasejtszám (Large white sejtvonal) (32)
	a szomatikus sejtmagátültetéssel létrehozott embriók mélyhűtést követő túlélésének javítása	*62% vs. 30%-a az embrióknak túlélte a vitrifikációt (32)
Éretlen sertéspetesejtek	az <i>in vitro</i> maturáció és parthenogenetikus aktiválás eredményességének növelése	*54% vs. 39%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává *60 vs. 47 blasztociszta sejtszám a petesejtből fejlődött embrióban (33)
Egér érett petesejtek	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*51% vs. 42%-a a petesejtekből fejlődött embrióknak osztódott a vitrifikációt követően (34) *27% vs. 12% születési arány a petesejtekből fejlődött embriók beültetése után (34)
	a génexpressziós változások vizsgálata	*250 gén magasabb expressziója a petesejtből fejlődött négysejtes embrióban (59) *255 gén alacsonyabb expressziója a petesejtből fejlődött négysejtes embrióban (59)
Humán érett petesejtek	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*87% vs. 73%-a a petesejteknek élte túl a mélyhűtést (34) *50% vs. 32%-a a petesejteknek osztódott a mélyhűtést majd parthenogenetikus aktiválást követően (34)
Egér embrionális őssejtek	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*75% vs. 37% <i>in vitro</i> differenciálódás szívizom irányába (35)

* Szignifikáns különbség ($p < 0,05$); statisztikai módszer: generalizált lineáris modell.

nálására használta fel. A PTAT-kezelésben részesült spermiumok progresszív és totál motilitása a felolvasztás után jobb volt, mint a kezeletlen kontrollmintáé. A vemhességi arány, a fialási arány, az alomlétszám, az élve született malacok és a választott malacok száma nagyobb volt a PTAT-kezelésen átesett sejtekkel történt termékenyítést követően, mint a kontrollcsoportban. A születéskori és a 42 napos kori testtömeg, ill. takarmányhasznosítás nem különbözött a kezelt és a kontrollcsoport esetében (25).

Bikaspermával végzett kutatások eredménye szerint PTAT-kezelést követően mind a mélyhűtést és felolvasztást követő motilitás, mind a membránintegritás, mind pedig a fertilitás nagyobb volt (33, 51).

A petesejtek PTAT-kezelése a mélyhűtés, in vitro maturáció, ill. klónozás után nagyobb túlélési arányt eredményezett

PETESEJTEK

Több kutatócsoport vizsgálatai is kimutatták, hogy sertés-, egér- és humán petesejtek PTAT-kezelése a mélyhűtést követően nagyobb túlélési arányt eredményez. Ezen túlmenően szomatikus sejtmag-átültetési klónozás előtt alkalmazva a PTAT-kezelés szintén szignifikánsan javította a módszer eredményességét. Az elvégzett kísérletek azt igazolták, hogy petesejtek esetében a PTAT-kezelés optimális mértéke 10–20 MPa, 30–60 percen keresztül alkalmazva.

A sertéspetesejtek esetében a 20 MPa erősségű, 60 perces PTAT-kezelés bizonyult a legkedvezőbbnek (45). E kezelés hatására a vitrifikációt, majd parthenogenetikus aktiválást – amelynek során arra készítjük a petesejtet, hogy megtermékenyülés nélkül kezdje meg az egyedfejlődést – követően több mint tízszeresére nőtt a blasztocisztaarány a kontrollcsoporthoz képest (15, 45). Egy másik kutatásban PTAT-előkezelésen átesett petesejtek sejtmagjának eltávolítása után, az így kapott citoplasztot használták fel recipiensként szomatikus sejtmag-átültetési klónozás során. Mind a blasztocisztaarány, mind pedig e blasztociszta vitrifikációt követő túlélése szignifikánsan megemelkedett a PTAT-kezelte csoportban. A javító hatás akkor volt a legjelentősebb, ha a PTAT-kezelés vége és a vitrifikáció ill. a sejtmag-eltávolítás megkezdése között 1–2 óra inkubációs idő telt el. A PTAT-kezelésen átesett petesejtekből származó klónozott embriók beültetéséből két egészséges malac született (13, 14). Hasonlóképpen, egy másik tanulmány eredményei alapján éretlen (GV stádiumú) sertéspetesejtek *in vitro* maturációja, parthenogenetikus aktiválása és *in vitro* tenyésztése magasabb blasztocisztaarányt és blasztociszta-sejtszámot eredményezett, amennyiben a petesejtek előzetesen PTAT-kezelésen estek át (46).

Az egérpetesejtek stresszel szembeni toleranciája a sertéspetesejtekéhez hasonlóan bizonyult. Termékenyítésre már alkalmas, érett (MII stádiumú) egérpetesejteknek a vitrifikációt megelőző 20 MPa erősségű, 60 perces PTAT-kezelésének hatása a vitrifikáció utáni magasabb túlélési arányban, majd az intracitoplazmatikus spermium injektálással történő termékenyítést követően szintén nagyobb túlélési arányban, az embriótranszfert követően pedig nagyobb vemhességi arányban és születési arányban volt tetten érhető (48). Az előbbi biztató eredményeket követően humán petesejteket is alávetettünk az egérnél már eredményesnek bizonyult mértékű PTAT-kezelésnek. Lassú fagyasztás után a túlélő petesejtek aránya szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen kontrollpetesejtekkel összehasonlítva (48).

EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEK

DINNYÉS és mtsai számoltak be elsőként a PTAT-kezelés segítségével elért eredményekről egér embrionális őssejtek esetében (12). Az embrionális őssejtekből ún. embryoid bodyt hoztak létre, amely néhány száz embrionális őssejtből álló sejtaggregátum. Ezen embryoid bodyk létrehozása utáni negyedik napon a sejtaggregátumot 60 MPa erősségű, 30 perces PTAT-kezelésnek vetették alá, amely kezelés megegyezik a blasztociszta stádiumú egérembrióknál hatásosnak bizonyult kezeléssel (50). A kezelés után az embryoid bodykat vitrifikálták, majd a felmelegítésük után vizsgálták a szívizomsejtté differenciálódás mértékét mind mikroszkópos vizsgálat, mind pedig a szívizomsejt-specifikus immunhisztokémiai festési eljárás segítségével. Az eredmények azt mutatták, hogy a PTAT-kezelésnek nem volt hatása a vitrifikálást követő túlélési arányra, ellenben a szívizom irányába történő differenciálódás mértéke szignifikánsan megemelkedett a kezelt csoportban (12).

IN VIVO EREDMÉNYEK

A PTAT-kezelésen átesett friss sertésspermával végzett termékenyítésekből 491, a PTAT-kezelte mélyhűtött spermával végzett inszeminációkból pedig 531 egészséges malac született (25, 32, 53). A malacok ivararánya, születési testtömege, a koraellések és malformációk aránya nem különbözik a PTAT-kezelésben nem részesült spermával végzett termékenyítésekből származó kontrollmalacokétól.

Az embryoid body néhány száz embrionális őssejtből álló sejtaggregátum

A PTAT-kezelt, mélyhűtött/felolvasztott sertésspermával végzett termékenyítéssel kapcsolatos eredmények kifejezetten kedvezőek

A PTAT-kezelésben részesült mélyhűtött-felolvasztott sertésspermával végzett termékenyítések után a vemhességi arány, a fialási arány, az alomlétszám, az élve született malacok és a választott malacok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a kezelésben nem részesült sperma esetében. A születéskori és a 42 napos kori testtömeg nem különbözött a kezelt és a kontrollcsoport esetében (25).

PTAT-kezelésen átesett sertéspetesejt – sejtmagrecipienseként történő – felhasználásával végzett klónozásból az embriók beültetését követően két egészséges malac született (14).

PTAT-kezelésben részesült egérblasztociszták recipiensbe ültetését követően 240 egészséges újszülött született, ebből 12 egyedét követtünk két generáción keresztül: vizsgáltuk az élettartamot, valamint párosztatást követően az állatok szaporodásbiológiai tulajdonságait és utódait. Ezen tulajdonságok tekintetében nem volt eltérés a kezeletlen embrió beültetéséből megszületett állatokhoz képest (50).

HATÁSMECHANIZMUS

Számos kutatócsoport foglalkozott az elmúlt években a PTAT-kezelés hatásmechanizmusának feltárásával (47, 54, 55).

Az élő sejtekben és szervezetekben – a baktériumoktól a többsejtes organizmusokon át, beleértve az emberi szervezetet is – megfigyelhető az a jelenség, hogy a különféle stresszorok egy átmeneti, általános ellenállóképesség-növekedést váltanak ki (59). A sejszintű mechanizmusok a stresszhatás érzékeléséből, a stressz hatásának elemzéséből, kiértékeléséből, valamint a káros hatás ellensúlyozásából, közömbösítéséből állnak, ilyen módon növelve a sejt ellenálló képességét a hasonló hatásokkal szemben (30). Amennyiben az adott stresszor erősebb, mint a sejt ellenálló képessége, programozott sejthalál (apoptosis) vagy necrosis következik be (21). A stressz hatására termelt fehérjék, az ún. stresszfehérjék csökkenthetik vagy erősíthetik az apoptosist kiváltó sejten belüli folyamatokat (3, 19).

A stresszfehérjék többsége a chaperon családba tartozik. E fehérjék számos sejtfolyamatban részt vesznek, többek között a fehérjeláncok, a DNS és a kromatin javító mechanizmusaiiban és stabil konformációjának fenntartásában, a sejtciklus és a redoxfolyamatok regulációjában, az energiametabolizmusban, a zsírsavak és lipidek metabolizmusában, valamint a károsodott fehérjemolekulák eliminációjában (10, 31). A stresszre adott válasz során e fehérjék termelésének szabályozása transzkripció, transláció és poszttranszlációs szinten valósul meg (29, 62).

A fehérjék szerepe a stresszre adott válaszreakció során elsőként a hő sokk esetében (57), a hő sokkfehérjék (heat shock protein, HSP) felfedezésekor került megfigyelésre (64). Későbbi kutatások eredményeképpen fény derült arra, hogy a hő sokkfehérjék az egyéb, hirtelen fellépő környezeti hatásokkal szembeni ellenállás során is szerepet játszanak. HÖRMANN és mtsai a *Lactobacillus sanfranciscensis* esetében vizsgálták a nyomáskezelés, a hő, a hideg, az ozmotikus eltérések, a savas kémhatás és a tápanyagmegvonás hatására fellépő fehérjeszintű változásokat, és azt tapasztalták, hogy bizonyos fehérjék e különféle stresszhatások mindegyike esetén termelődni kezdenek (24). Ennek oka, hogy a különféle stresszhatások egymáshoz nagyon hasonló reakciót okoznak annak köszönhetően, hogy az általuk a makromolekulák (membrán lipidek, fehérjék, DNS) szintjén kiváltott hatás hasonló (30). Ezáltal, amennyiben a sejt egy bizonyos típusú környezeti hatással szemben védekezik, amelynek során a sejt homeosztázisának fenntartását segítő stresszfehérjék termelődnek, e védekezés egyéb típusú káros környezeti tényezők ellen is hatásos lesz. A stresszelőkezelés hatására termelődött stresszfehérjék ilyen módon biztosíthatnak keresztvédelmet a későbbi rutin feldolgozás során fellépő káros behatásokkal szemben.

A hő sokkfehérjéknek nagy szerepe van a spermiumok és a petesejtek környezeti tényezőkkel szembeni védekezése, valamint később az embriófejlődés során is (42). Emelkedett Hsp70-szint figyelhető meg emlős embriókban az embrionális

A stresszfehérjék az ún. chaperon családba tartoznak

A hő sokkfehérjék segítik az ivarsejtek túlélését

genom aktiválódását megelőzően fellépő környezeti stresszek hatására (9, 16, 40). Antioxidáns hatásának köszönhetően az emelkedett glutationszintézis is fontos szerepet játszik az embriók stresszre adott válaszreakciójában (17).

A PTAT-KEZELÉS HATÁSA, A STRESSZFEHÉRJÉK SZEREPE A SEJTSZINTŰ VÉDEKEZÉSBEN

Több kutatócsoport is foglalkozik kifejezetten a PTAT-kezelés hatásainak molekuláris hátterével a különböző fajok ivarsejtjeiben és embrióiban.

A baktériumok a PTAT-kezelésre csökkent fehérjetermeléssel reagáltak, azonban ötvenöt, főként a stresszfehérjék családjába tartozó fehérje aránya megnövekedett (68). Ugyanezen kezelés hatására a chondrocytákban nagyobb hősokkfehérjeszint volt mérhető, túlnyomórészt transzlációs folyamatok hatására, az mRNS stabilitásának növelése révén (29, 34).

Bár a spermiumok transzkripciós szempontból inaktív sejtek, a PTAT-kezelésen átesett sertésspermiumok esetében is megfigyelhető volt a fehérjeszintbeli különbség a kontrollcsoporttal összehasonlítva, ami a szubletális kezelésre adott válaszreakcióval függ össze, és feltehetően a csökkent lebomlásnak köszönhető (26). E nagyobb mennyiségű fehérjék a lipidek metabolizmusát, a redoxfolyamatok regulációját, a termékenyítőképeséget befolyásolják, valamint kedvező hatással vannak a különböző védekező mechanizmusokra, amelyek megnövekedett felengedés utáni motilitásban és magasabb alomlétszámban érhetőek tetten. Mindezek mellett a Hsp70 és Hsp90 szintjében nem volt változás megfigyelhető (26).

A PTAT-kezelésen átesett egér- és szarvasmarha-embriók génexpressziós eredményei is elősegíthetik a stressz hatására fellépő sejtciklus szabályozás megismérését. A PTAT-kezelés következtében átmenetileg gátlódnak a sejtek növekedéssel, osztódással összefüggő folyamatai, az oxidatív stresszre adott sejt szintű reakciókkal összefüggő génműködései viszont aktiválódnak (5). Hasonlóképpen, a PTAT-kezelésen átesett szarvasmarha-embriók esetében erősebb génexpresszió volt megfigyelhető az antioxidáns védelemmel, a koleszterinszintézissel és a stresszel szembeni ellenállással összefüggő gének működésében (61). Az oxidatív stresszel összefüggő gének erőteljesebb expressziója mind az egér-, mind a szarvasmarha-embriókban egy, a stresszre adott általános válasza utal, ahol a sejt szintű redoxpotenciál a sejtek stresszre adott válaszreakciójának fő szabályozója lehet.

WELCH és mtsai azt figyelték meg, hogy az *Escherichia coli* baktériumok különösen érzékenyek a környezeti tényezőkre életük gyors növekedéssel és osztódással járó szakaszában, ennek megfelelően a védekező mechanizmusok egyike az osztódás átmeneti, reverzibilis leállása (68). Ezzel párhuzamba állítható az az eredmény, amely PTAT-kezelésen átesett egérpetesejtek esetében mutat rá a riboszómát alkotó fehérjék szintézisének átmeneti gátlódására (6). Szintén az anyagcsere-folyamatok átmeneti gátlódásának kedvező hatását bizonyítja az ún. csendes embrió hipotézis. E hipotézis kimondja, hogy annak oka, hogy az embrionális fejlődés első napjai során visszafogottabb, „csendesebb” anyagcseréjű embriók nagyobb arányban érik el a blasztociszta állapotot, az lehet, hogy az alacsonyabb szintű anyagcserével az anyagcsere-termékek között keletkező szabad gyökök mennyisége – és ezáltal azok károsító hatása – is kisebb lesz. A makromolekulák, sejtorganellumok épsége, károsító hatásokkal szembeni védelme az embrionális fejlődés első napjaiban, az embrionális genom aktiválódásának komplex folyamatai során pedig kiemelt jelentőségű (36).

Az előkezelésként alkalmazott stresszhatás típusa és mértéke nemcsak a termelt stresszfehérjék fajtájára és mennyiségére van befolyással, hanem a sejtek életképességére is. A stresszfehérjék legkifejezettebb termelődése azonban olyan mértékű stresszkezelést követően figyelhető meg, amely már jelentős mértékben károsítja a sejtek életképességét (11). Emiatt a stresszelőkezelés mértékének a stresszfehérjék termelődésére alapozott meghatározása nem megfelelő módszer.

A PTAT-kezelés hatására emelkedik a stresszfehérjék termelése a baktériumokban

Leírták a csendes embrió hipotézist

Emellett a tapasztalatok arra utalnak, hogy a stresszelőkezelés akkor a legkedvezőbb hatású, ha az előkezelés (hidrosztatikus nyomás vagy akár ozmotikus kezelés) után 1 vagy 2 óra múlva következik a sejteket érő második behatás (pl. mélyhűtés, parthenogenetikus aktiválás, sejtmagátültetés). Ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a stresszreakcióval összefüggő gének legnagyobb mértékű kifejeződése a PTAT-kezelés után 1 órával volt mérhető szarvasmarha-embriók esetében (61). Hasonló eredményeket hozott egy másik korábbi kutatás is, mely szerint a stresszreakció során szerepet játszó fehérjék termelődésének a csúcsa sejttípusonként és alkalmazott stresszhatásonként némileg eltérhet, azonban az első stresszfehérjeszint-emelkedés 1–2 órával a kezelést követően mérhető (11).

EGYÉB KÖRNYEZETI STRESSZOROK HATÁSAI

A PTAT-tel folytatott kísérletek eredményeinek hatására több kutatócsoport is célul tűzte ki az ozmotikus, az oxidatív, ill. a hőstressz alkalmazhatóságának vizsgálatát a sejtek ellenálló képességének növelése érdekében. E kutatások számszerű eredményeit a **3. táblázat** foglalja össze.

LIN és mtsai kísérleteikben sertéspetesejteket kezeltek nem fiziológiás koncentrációjú NaCl-oldatokkal (593 és 1306 mOsm). Az ezt követő regenerációs idő után a petesejteket vitrifikálták, majd a felmelegítést követően e sejtek parthenogenetikus aktiváláson vagy szomatikus sejtmagátültetésen estek át. A hiperozmotikus oldatban előkezelt petesejtekből szignifikánsan nagyobb arányban keletkeztek blasztociszták, mint a nem kezelt sejtekből (38). Egy további kutatásban az ozmotikus hatást kifejtő különböző ágensek hatását vizsgálták. A petesejteket 588 mOsm-os NaCl-, szacharóz-, ill. trehalózzal helyezették egy óra időtartamra, majd egy újabb órányi regenerációs idő után vitrifikálták, majd parthenogenetikus aktiválták őket. Mindhárom előkezelés hatására nagyobb blasztocisztaarány volt megfigyelhető a kezeletlen csoporthoz képest. Amennyiben a parthenogenetikus aktiválás helyett szomatikus sejtmagátültetést alkalmaztak, szintén mindhárom szubletális hiperozmotikus kezelés megnövekedett blasztocisztaarányt eredményezett, azonban a trehalóz- és szacharózkezelés esetében a blasztociszta embriók sejt száma szignifikánsan lecsökkent (39).

VANDEALE és mtsai a rövid (67) ideig tartó hidrogén-peroxid- (H_2O_2) kezelés hatásait vizsgálták szarvasmarha *in vitro* érlelt, kumuluszsejtekkel borított petesejtek esetében. A termékenyítésre kész, érett petesejteket előkezelés céljából

Számos egyéb környezeti stresszor hatását vizsgálták az embriológusok

3. TÁBLÁZAT. Ivarsejtekkel és embriókkal elért kutatási eredmények hiperozmotikus, ill. oxidatív stresszelőkezelést követően

TABLE 3. Summary of research results obtained following hyperosmotic or oxidative stress pretreatment

A kezelt sejt típusa	A kezeléssel elérni kívánt cél	A hiperozmotikus ill. oxidatív stresszelőkezeléssel elért eredmény (kezelt vs. kontroll)
<i>In vitro</i> maturáción átesett sertéspetesejtek	a mélyhűtést követő túlélés javítása	*6%, *6%, *7% (sorrendben: NaCl, szacharóz, trehalóz) vs. 1%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává vitrifikációt, majd parthenogenetikus aktiválást követően (63)
	a szomatikus sejtmagátültetéses klónozás eredményességének javítása	*64%, *69%, *65% (sorrendben: NaCl, szacharóz, trehalóz) vs. 47%-a a petesejteknek fejlődött blasztocisztává (Large white sejtvonal) (63) 62, *48, *47 (sorrendben: NaCl, szacharóz, trehalóz) vs. 62 blasztociszta sejt szám (Large white sejtvonal) (63)
<i>In vitro</i> maturáción átesett szarvasmarha-petesejtek	az <i>in vitro</i> tenyésztés eredményességének növelése	*47% vs. 32%-a az embrióknak fejlődött blasztocisztává a H_2O_2 előkezelést követően (64)

* Szignifikáns különbség ($p < 0,05$); statisztikai módszer: generalizált lineáris modell.

0,01–100 $\mu\text{l/l}$ közötti koncentrációjú hidrogén-peroxid-oldatba helyezték, majd a termékenyítést követően *in vitro* tenyésztették a blasztociszta állapot eléréséig. Az 50–100 $\mu\text{l/l}$ közötti koncentrációjú oldatban előkezelt petesejtekből szignifikánsan nagyobb arányban fejlődtek blasztociszták, mint a kezelésen át nem esettekből, míg az apoptózis jeleit mutató sejtek aránya a nagyobb koncentrációjú oldattal kezelt embriókban alacsonyabb volt (67).

Isom és mtsai a hőmérséklet hatásait vizsgálták. Megnövekedett fejlődési potenciált tapasztaltak azoknál a parthenogenetikusan aktivált sertéspetesejtek-nél, amelyeket az aktiválás után 9 órán keresztül 42 °C-ra emelt hőmérsékletű tenyésztőoldatban tartottak (27).

A fenti eredményekkel ellentétben több tanulmány is bizonyította, hogy a petesejtek és embriók igen érzékenyek, így gyengébb fejlődéssel reagálnak a hőmérséklet változásaira (28, 58, 66). Hasonlóképpen, több kutatás során is károsnak bizonyult a LIN és mtsai által alkalmazotthoz hasonló mértékű, bár eltérő időtartamú hiperozmotikus kezelés petesejtek esetében (2, 41). Érdeemes azonban figyelembe venni, hogy ezen kutatásokban a szerzők nem szándékoztak a hőstresszt és az ozmotikus stresszt mint további ellenálló képességet javító előkezelést felhasználni, ezért nem is tettek erőfeszítést abba az irányba, hogy megtalálják az optimális mértékű kezelést. Továbbá: ezek a változatos eredmények, amelyek esetenként a fent említett környezeti stresszoroknak nemhogy a kedvező, hanem éppen a károsító hatását bizonyítják, részben a sejtek fenti tényezőkre való érzékenységének lehetnek köszönhetőek. Ezen környezeti hatások esetében ugyanis igen szűk az az alkalmazhatósági zóna, amely az *in vivo* tapasztalt, azaz optimális, és a sejtek, ill. embriók szempontjából letális értékek között található. Ugyanez a tartomány a PTAT-kezelés esetében igen tág, amelynek köszönhetően könnyen lehetséges olyan kezelési protokoll kiválasztása, amely a kedvező hatások kiváltására képes, de a sejteket nem károsítja.

A KUTATÁSOK PERSPEKTÍVÁI

A jelen áttekintésben felsorolt kutatások az embriológiában használatos *in vitro* módszerek mellé egy alapjaiban új eszköztárat kínálnak fel. Eszerint nem csupán passzív módon elégíthetjük ki a sejtek igényeit és védhetjük meg őket a számukra potenciálisan káros hatásoktól a feldolgozásuk során, hanem – kontrollált környezetben kontrollált módon alkalmazott stresszelőkezeléssel – aktiválhatjuk a sejtek saját védekező mechanizmusait. A stresszreakció eredménye így a károsító hatással szemben megnövekedett ellenálló képesség lesz. Ez a védekező reakció azonban jellegéből adódóan nem specifikus a kiváltó stresszorra vonatkozóan, hanem keresztvédezettséget biztosít egyéb tényezőkkel szemben is. Ez adhat magyarázatot arra, hogy a magas hidrosztatikus nyomás előkezelés miként biztosíthat védelmet egy gyökeresen más jellegű, a sejtek feldolgozásával együtt járó stresszel szemben, mint amilyen a mélyhűtés és a különböző *in vitro* manipulációk.

Az itt bemutatott új módszer, amelynek segítségével javítható az ivarsejtek és embriók minősége – ezen belül a mélyhűtést követő túlélése, termékenyítő képessége, fejlődési potenciálja – új távlatokat nyithat meg az embriológiában. Bár a jelenség pontos molekuláris biológiai hátterének felderítése még további kutatásokat igényel, az eddigi eredmények azt mutatják, hogy egy bizonyos, pontosan meghatározott mértékű stresszelőkezelés – a PTAT – alkalmas lehet a sejtek életképességének növelésére. A kezelés segítségével a jövőben esély van arra, hogy gazdasági szempontból is jelentős teljesítménynövekedés legyen elérhető az emlős asszisztált reprodukció, ezen belül pedig a sertés, szarvasmarha, ló mesterséges termékenyítés és spermamélyhűtés, *in vitro* embrió-előállítás és embriótranszfer, a sejtmagátültetési klónozás, de akár a humán meddőségi kezelések területén is.

A stresszelőkezelés előnyös lehet a sejtek ellenálló képességének fokozása által

IRODALOM

1. ADAMS, C. E.: *Artificial Insemination*, 5. Third International Congress on Animal Reproduction, Cambridge, 1956.
2. AGCA, Y. – LIU, J. et al.: Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000. 55. 212–219.
3. ARYA, R. – MALLIK, M. – LAKHOTIA, S. C.: Heat shock genes—integrating survival and death. *J. Biosci.*, 2007. 32. 595–610.
4. BIGGERS, J. D. Thoughts on embryo culture condition. *Reprod. Biomed. Online*, 2001. 4. 30–38.
5. BOCK I. – LOSONCZI E. – MAMO S., POLGÁR Z. – HAMOS A. – DINNYÉS A. – PRIBENSKY C.: Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. *Cryo Letters*, 2010. 31. 401–412.
6. BOCK, I. – RAVEH-AMIT, H. et al.: Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in pre-implantation embryos: a possible protection mechanism? *Reprod Fertil Dev.*, 2016. 28. 776–784
7. BOGLIOLO, L. – ARIU, F. et al.: High hydrostatic pressure treatment improves the quality of *in vitro* produced ovine blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010. 22. 202.
8. CANNON, W. B.: *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement*. Appleton, New York, 1915.
9. CHRISTIANS, E. S. – ZHOU, Q. et al.: Heat shock proteins in mammalian development. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2003. 14. 283–290.
10. CSERMELY P. – SCHNAIDER T. – SÓTI CS. – PROHÁSZKA Z. – NARDAI G.: The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 1998. 79. 129–168.
11. DILLER, K. R.: Stress protein expression kinetics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2006. 8. 403–424.
12. DINNYÉS A. – POLGÁR Z. – PRIBENSKY C. – PIRITY M. K.: Improved embryoid body cryopreservation and cardiomyocyte differentiation following high hydrostatic pressure treatment. *Proceedings of The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia, Spain (CometMed, Israel)*, 2010. A-7.
13. DU, Y. – LIN, L. et al.: High hydrostatic pressure improved developmental competence of porcine oocytes for handmade cloning. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2008. 20. 94–95.
14. DU, Y. – LIN, L. et al.: High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells*, 2008. 10. 325–330.
15. DU, Y. – PRIBENSKY C. et al.: High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, 2008. 135. 13–17.
16. EDWARDS, J. L. – HANSEN, P. J.: Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997. 46. 138–145.
17. EDWARDS, J. L. – KING, W. A. et al.: Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology*, 2001. 55. 209–223.
18. GARDNER, D. K.: Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009. 20. 9–18.
19. GARRIDO, C. – BRUNET, M. et al.: Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, 2006. 5. 2592–2601.
20. HAMMOND, J.: Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1949. 163. 28–29.
21. HANSEN, P. J.: To be or not to be—determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 2007. 68. 40–48.
22. HEAPE, W.: Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1891. 48. 257–458.
23. HITE, B. H.: The effects of pressure in the preservation of milk. *W. Va. Agric. Exp. Station Bull.* 1899. 58. 15–35.
24. HÖRMANN, S. – SCHEYHING, C. et al.: Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451(T). *Proteomics*, 2006. 6. 1878–1885.
25. HORVÁTH A. – SZENCI O. – NAGY K. – PRIBENSKY C.: Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. *Reprod Fertil Dev.*, 2016. 28. 475–481.
26. HUANG S. Y. – PRIBENSKY C. – KUO Y. H. – CHIU Y. F.: Hydrostatic pressure affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009. 112. 136–149.
27. ISOM, S. C. – LAI, L. et al.: Heat shock of porcine zygotes immediately after oocyte activation increases viability. *Mol. Reprod. Dev.*, 2009. 76. 548–554.
28. JU, J. C. – PARKS, J. E. – YANG, X.: Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, 1999. 53. 336–340.
29. KAARNIRANTA, K. – ELO, M. et al.: Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. 95. 2319–2324.
30. KÜLTZ, D.: DNA damage signals facilitate osmotic stress adaptation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2005. 289. 504–505.
31. KÜLTZ, D.: Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *J. Exp. Biol.*, 2003. 206. 3119–3124.
32. KUO, Y. H. – PRIBENSKY C. – HUANG, S. Y.: Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology*, 2008. 70. 1395.
33. KÚTVÖLGYI G. – HORVÁTH A. – OLÁH I. – PÁLINKÁS P. – MERÉSZ L. – MOLNÁR M. – PRIBENSKY C. – SZENCI O.: High hydrostatic pressure treatment of fresh bull semen increases the proportion of cells surviving the freezing-thawing procedure in a Hungarian Holstein Friesian bull population. *25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*. 2008. *Magy. Állatorv. Lapja* 130(SII). 217.
34. LAMMI, M. J. – ELO, M. A. et al.: High hydrostatic pressure-induced changes in cellular protein synthesis. *Biorheology*, 2004. 41. 309–313.
35. LEDDA, S. – BOGLIOLO, L. et al.: High hydrostatic pressure treatment prior to vitrification improves the re-expansion speed and

- quality of *in vitro*-produced ovine embryos. *Proceedings of The 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia, Spain*, 2010.
36. LEESE, H. J.: Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, 2012. 143. 417–427.
37. LEESE, H. J. – HUGENTOBLER, S. A. et al.: Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2008. 20. 1–8.
38. LIN, L. – DU, Y. et al.: Elevated NaCl concentration improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 2009. 18. 360–366.
39. LIN, L. – KRAUGH, P. M. et al.: Osmotic stress induced by sodium chloride sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009. 21. 338–344.
40. LUFT, J. C. – DIX, D. J.: Hsp70 expression and function during embryogenesis. *Cell Stress Chaperones*, 1999. 4. 162–170.
41. MULLEN, S. F. – AGCA, Y. et al.: The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 2004. 19. 1148–1154.
42. NEUER, A. – SPANDORFER, S. D. et al.: The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 2000. 6. 149–159.
43. PINCUS, G.: The eggs of mammals. *Exp. Biol. Monographs*. Macmillan Co., New York, 1936.
44. POPOVIC, L. – BERG, D. K. et al.: High hydrostatic pressure treatment increases cryo-tolerance of *in vitro* produced bovine embryos. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 2013. 73. 83–85.
45. PRIBENSKY C. – DU, Y. – MOLNÁR M. – HARNOS A. – VAJTA G.: Increased stress tolerance of pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 2008. 106. 200–207.
46. PRIBENSKY C. – DU, Y. – MOLNÁR M. – VAJTA G.: Sublethal stress on porcine oocytes enhances the efficacy of ART procedures. *Human Reprod.*, 2008. 23. 161.
47. PRIBENSKY C. – LIN L. – DU Y. – LOSONCZI E. – DINNYÉS A. – VAJTA G.: Controlled stress improves oocyte performance – cell preconditioning in assisted reproduction. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012. 47. 197–206.
48. PRIBENSKY C. – MÁTYÁS S. – LOSONCZI E. – STANCA C. – BOCK I. – VAJTA G.: Stress for stress tolerance: Improving cell survival by sublethal stress treatment of eggs before vitrification – pilot study. *Fertil. Steril.* 2010. 94. S32.
49. PRIBENSKY C. – MOLNÁR M. – HORVÁTH A. – HARNOS A. – SZENCI O.: Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2006. 18. 162–163.
50. PRIBENSKY, C. MOLNÁR, M. HORVÁTH A., KÚTVÖLGYI G., HARNOS A., SZENCI O., DENG G. J., LEDERER J.: Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007. 19. 181–182.
51. PRIBENSKY C. – MOLNÁR M. – CSEH S. – SOLT L.: Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005. 87. 143–150.
52. PRIBENSKY C. – MOLNÁR M. – ULRICH P. – BARBOSA C.C. – HATAMOTO L.K. – SANTO, C.E.P.: Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 2005. 40. 338.
53. PRIBENSKY C. – MOLNÁR M. – KÚTVÖLGYI G. – HARNOS A. – HORVÁTH A. – HÉJJA I.: Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality *in vitro* and *in vivo*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2009. 21. 107.
54. PRIBENSKY C., VAJTA G.: Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011. 23. 48–55.
55. PRIBENSKY C. – VAJTA G. – MOLNÁR M. – DU Y. – LIN L. – BOLUND L. – YOVICH J.: Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol. Reprod.*, 2010. 83. 690–697.
56. RINGER, S. – SAINSBURY, H.: Concerning the action of salts of potash, soda, and ammonia on the frog's heart. *Med. Chir. Trans.*, 1882. 65. 191–224.
57. RITOSSA, F. A.: A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962. 18. 571–573.
58. RIVERA, R. M. – DAHLGREN, G. M. et al.: Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. *Reproduction*, 2004. 128. 33–42.
59. SELYE, H. A.: Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 1936. 138. 32–32.
60. SIQUEIRA FILHO, E. – CAIXETA, E. S. et al.: Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011. 23. 585–590.
61. SIQUEIRA, F. M. – SIQUEIRA, C. E. et al.: Sublethal hydrostatic pressure pre-treatment: effect in bovine embryos' gene expression. *Biol. Reprod.*, 2009. 81. 629.
62. SÓTI C. – CSERMELY P.: Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease. *J. Biosci.*, 2007. 32. 511–515.
63. THOMPSON, J. G. – MITCHELL, M. – KIND, K. L.: Embryo culture and long-term consequences. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007. 19. 43–52.
64. TISSIERE, A. – MITCHELL, H. K., – TRACY, U.: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. *J. Mol. Biol.*, 1974. 84. 389–398.
65. TRIGAL – B., MUÑOZ, M. et al.: Cell counts and survival to vitrification of bovine *in vitro* produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure. *Reprod. Domest. Anim.*, 2013. 48. 200–206.
66. TSENG, J. K. – TANG, P. C. – JU, J. C.: *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. *Theriogenology*, 2006. 66. 1073–1082.
67. VANDAELE, L. – THYS, M. et al.: Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. *Reproduction*, 2010. 139. 505–511.
68. WELCH, T. J. – FAREWELL, A. et al.: Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.*, 1993. 175. 7170–7177.
69. WEMEKAMP-KAMPHUIS, H. H. – KARATZAS, A. K. et al.: Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002. 68. 456–463.
70. WHITTEN, W.: Culture of Tubal Mouse Ova. *Nature*, 1956. 177. 96.

Közlésre érkező: 2016. június 08.