

**Késői preimplantációs stádiumban lévő egér embriók
fagyasztása – a hidrosztatikus nyomás gyakorlati
alkalmazásának lehetőségei a fagyasztás során**

Dr. Pribenszky Csaba

2004



**Késői preimplantációs stádiumban lévő egér embriók
fagyasztása – a hidrosztatikus nyomás gyakorlati
alkalmazásának lehetőségei a fagyasztás során**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

Prof. Dr. Cseh Sándor

Prof. Dr. Solti László

Dr. Pribenszky Csaba

Prof. Dr. Huszenicza Gyula

2004

TARTALOM

1. BEVEZETÉS

1. BEVEZETÉS

3

2. KIBÚJT EGÉR-BLASZTOCISZTÁK FAGYASZTÁSA

„GYORS” FAGYASZTÁSI ELJÁRÁSSAL

6

3. HIDROSZTATIKUS NYOMÁS HASZNÁLATÁNAK

LEHETŐSÉGEI AZ EMBRIÓ-FAGYASZTÁS

FOLYAMATÁBAN

10

4. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

17

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

19

Az utóbbi években, a tenyésztési körülmények lényeges javulásával mind nagyobb hangsúly helyeződik a blasztociszta, illetve a zóna pellucidával (ZP) nem rendelkező embriók fagyaszthatóságával kapcsolatos vizsgálatokra. A humán gyakorlatban egyre nagyobb teret nyer a blasztociszta embriók beültetése, amitől a szakemberek - a beültetett embriók alacsonyabb száma miatt- az ikerterhességek ritkább előfordulását várják. Ugyanakkor a fagyasztott, ZP-val rendelkező embriók beültetésével kapcsolatban kiderült, hogy a fagyasztás során olyan fiziko-kémiai folyamatok mennek végbe, amelyek gátolhatják a blasztociszta kibújását, ezáltal akadályozva az embrió megtapadását.

A jelen dolgozatban között első kísérletsorozat célja az etilén glikollal (EG), illetve glicerinnel (G) történő gyorsfagyasztás kibújt egér blasztocisztiák in vitro és in vivo túlélésére gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. A fagyasztás előtti különböző ekvibrálattási idők és a fagyasztás utáni rehidrációs idők befolyását is vizsgáltuk.

Egér-blasztocisztiák sikeres fagyasztásáról számos cikk beszámol. A második kísérletsorozatunkkal tehát nem egy jól

működő rendszert szeretnénk volna még hatékonyabbá tenni, hanem egy új, eddig ilyen formában embriófagyasztással kapcsolatban még nem közölt változó, a hidrosztatikus nyomás (HHP) lehetséges hasznosítását vizsgáltuk, két, egymástól alapvetően különböző alapon:

1, HHP hatására a folyadékok fagyáspontja csökken: 210 MPa nyomás alatt a tiszta víz fagyáspontja -21C° . A folyadékok e fizikai tulajdonságát felhasználva célunk az volt, hogy nyomás alatt, a tápfolyadék fagyáspontját számottevően lecsökkentsük, hűtve kísérjük meg az embriók jó hatásfokú, tartós tárolását. Ezáltal az embriókat optimális közegben, a fagyással járó összes károsodástól mentesen lehetne tárolni, feltéve, hogy a jelentősen megemelkedett hidrosztatikus nyomást károsodás nélkül képesek elviselni.

2, HHP hatására biológiai rendszerekben sokk-fehérjék termelődhetnek, melyek más külső behatásokkal szemben is javíthatják az adott rendszer túlélését. Élelmiszer-mikrobiológia témakörben számos dolgozat jelent meg e témában. A kísérletek középpontjában az a megfigyelés volt, hogy szubletális nyomás-sokk és hő-sokk együttes alkalmazása nemhogy csökkentette egy adott élelmiszer patogén csira tartalmát, hanem épp ellenkezőleg, javította

a baktériumok túlélését. A hidrosztatikus nyomás e biológiai hatását kihasználva azt vizsgáltuk, hogy egy, a fagyasztási eljárás előtt alkalmazott nyomás-impulzus javítja-e az embriók fagyasztás utáni túlélését, az említett feltételezett „kereszt-védelem” alapján.

2. KIBÚJT EGÉR-BLASZTOCISZTÁK FAGYASZTÁSA „GYORS” FAGYASZTÁSI ELJÁRÁSSAL

A gyors fagyasztás egyszerű és hatékony módja az embriófagyasztásnak. Gyors fagyasztáskor a felhasznált krioprotektív anyag töménysége a fagyasztó oldatban magasabb a hagyományos fagyasztásban használatnál, viszont alacsonyabb a vitrificáció során alkalmazottnál, ezáltal a toxicitása is csekélyebb. A leírt kísérletben használt gyors fagyasztási módszer összefüzte a nem penetrálódó fagyálló vegyület – szaharóz - dehidrááló hatását a penetrálódó EG vagy GLY hatásával. Vizsgálatainkban csak a ZP-ből elsőként kibújt blasztocisztákat (140-142 órával a hCG beadása után) használtunk, mivel a lassúbb fejlődésű embriók életképessége csekélyebb, és ez még tovább romlik a fagyasztási folyamat során. A kísérletünkben használt két krioprotektív anyagnak az embrió-túlélésre gyakorolt hatását összehasonlítva az EG lényegesen jobbnak bizonyult a GLY-nál. A legmagasabb túlélést (98% és 95%) közvetlen rehidráálással értük el 3 mólos EG-t használva, noha ez az eredmény nem mutatott szignifikáns különbséget a többi 3 M EG csoporthoz hasonlítva.

Az eredmények azt mutatták, hogy az EG számára két perc is elegendő idő a sejtekbe való penetrálódásra, valamint azt is, hogy a 3 mólos töménység toxicitása elhanyagolható, mivel a 2 perces és a 30 perces ekvibrálatás hasonló túlélési eredményeket hozott (95% és 94%).

Vizsgálataink adatai támogatják azt a feltevést, miszerint az embrióknak a különböző anyagokkal szemben mutatott membrán-permeabilitási tulajdonsága a fejlődésük előrehaladtával változik, általában növekszik: EG gyorsabban bejut a kibújt blasztocisztákba, mint a ZP-vel rendelkezőkbe.

A túlélési arány jelentős csökkenése (43 illetve 54 %-ra) az EG töménységének 3M-ról 1.5 M-ra csökkentésekor azt sugallja, hogy a kibújt blasztociszták fagyasztásához kísérletünkben az optimális töménység a 3M.

A glicerollal fagyasztott embriók túlélése lényegesen rosszabb volt a kontroll csoportéhoz képest. Abból, hogy eredményeink szerint az ekvibrálatási időnek nem volt befolyása a túlélésre, arra következtethetünk, hogy a GLY toxicitása lehet a legfőbb oka az embriók szerény túlélési arányának ezekben a kísérleti csoportokban. Az eredményeink azt mutatják, hogy az általunk használt 3 mólos töménység nem optimális kibújt blasztociszták glicerinnel történő gyors fagyasztására. A glicerinnel, a nagyobb

molekulasúlya következtében, lassabban jut be a sejtekbe; ezt támasztotta alá az a megfigyelés, miszerint a csoportok közül a 20 perces ekvibrálási idő adta a (nem szignifikáns) legjobb eredményt.

Shaw és munkatársai (1991) DMSO-val végzett kísérleteikben 0 C°-os ekvibrálás mellett tapasztaltak a miénkéhez hasonló eredményeket, viszont szobahőmérsékleten történt ekvibrálásokor esetükben a túlélés számottevően csökkent.

Az in vivo értékeléskor a kibújt blasztocisztákat, 2 napos asszinkronitást használva 3 napos álvemhes recipiensekbe ültettük be. Kísérletünkben az EG-al elért in vivo túlélési arány, noha nem szignifikánsan, de jobb volt a glicerinnel elért eredményeknél. Zhu és munkatársai nagyobb túlélési arányról számoltak be kibújt blasztocisztákkal 1 illetve 2 napos asszinkronitással történő beültetéseket követően, ami azt jelentheti, hogy a vitrificáció kevesebb károsodással jár, mint a gyors fagyasztás (az irodalomhoz képest szerényebb in vivo eredményeinkhez a beültetéssel és állattartással járó technikai nehézségek is hozzájárultak).

Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a gyors fagyasztási eljárás alkalmas a kibújt egér blasztociszták fagyasztására; ezen belül is jó eredmények érhetők el 3 M töménységű EG-t tartalmazó fagyasztó oldattal, mindössze 2 perces ekvibrálási idővel (mely elegendő

az embriók műszalmába töltésére), akár szobahőmérsékleten. Eredményeink szerint ebben a fejlődési szakaszban már nem számottevő fagyasztáskor a zóna pellucida mechanikai szerepe az embrió védelmében.

3. HIDROSZTATIKUS NYOMÁS HASZNÁLATÁNAK LEHETŐSÉGEI AZ EMBRIÓ-FAGYASZTÁS FOLYAMATÁBAN

Kísérleteink során következő lépéseit mindig az előző vizsgálatok eredményei alapján terveztük, mivel korábbi közleményekre támaszkodni nem tudtunk.

Első lépésként azt kellett megvizsgáljunk, hogy az egér embriók (blasztociszták) túlélését, továbbfejlődését miképp befolyásolja a megnövekedett hidrosztatikus nyomás.

A blasztocisztákat tápfolyadékban buborék nélkül műszalmába szívva nyomáskamrába helyeztük, ahol a nyomást közvetítő közeg víz volt. Ezt követően, kb. 10 MPa/perc sebességgel 10-150 MPa nagyságú hidrosztatikus nyomást generáltunk a nyomáskamrában, melyet 1 s – 3 óráig fenntartottunk (szobahőmérsékleten), majd kb. 2 másodperces dekompresziót követően az embriókat normál légköri nyomásra hozva tápfolyadékban, Petri csészében termosztátba helyeztük és továbbfejlődésüket egészen a kibújt stádiumig figyelemmel kísértük.

A kísérlet során a következőket figyeltük meg:

1. Az embriók túlélését az alkalmazott hidrosztatikus nyomás illetve a nyomás alatt eltöltött idő jelentősen befolyásolja. Az

embriók túlélése és továbbfejlődésük aránya nem különbözött szignifikánsan a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva az 150 MPa/1 s, 90 MPa/30 min, 60 MPa/120 min illetve a 10 MPa/180 min beavatkozásoknál kevesebb ideig tartó vagy kisebb nyomású behatásoknál. Ezen értékeket meghaladó behatás az embriók túlélését szignifikánsan rontotta (pl. 150 MPa/15 min –nél 0% túlélés).

2. A blasztociszták egy bizonyos nyomás/ido értékig (pl. 60 MPa/10 min) morfológiai változás nélkül jöttek elő; ezt meghaladó kezeléssel viszont (pl. 60 MPa/30 min) morfológiai változáson mentek át: a blasztocöl eltűnt, a blasztociszta „kompaktálódott”. Ebből az állapotból, az 1. pontban leirt értékek alatt, 3-4 óras in vitro tenyésztéssel visszaalakultak, és a kontroll embriókkal azonos időben és arányban kibújtak.

3. Az 1. pontban leirt értékekkel kezelt embriók (kompaktálódott és morfológiájában változatlan egyaránt) beültetve a kontroll embriókhoz hasonló arányban tapadtak meg, míg a morfológiailag „nem túlél”-nek ítélt embriók közül megtapadás nem volt az in vivo kísérletekben.

Az első kísérlet sorozatból megtudtuk, hogy az embriók képesek nagy nyomást is túlélni, viszont a számunkra megcélzott nyomástartományban (> 100MPa) a 90 % körüli túlélés csak nagyon rövid ideig tartó behatással tartható. Így a következő sorozatban azt próbáltuk kideríteni, hogy fokozatos dekompreszióval javítható-e az embriók túlélése.

A fent említett körülményeket annyiban változtattuk meg, hogy 2 másodperces dekompreszió helyett 30-180 perces alkalmaztunk. Az eredmények alapján kijelenthettük, hogy a fokozatos felhozatal jelentősen növelte az embriók túlélését. Míg 90 MPa/30 min kb. 50%-os túlélést eredményezett 2 s dekompreszióval, addig 90 és 120 perces dekompresziót követően 98 % túlélést sikerült elérnünk.

A harmadik sorozatban a két „sokk”, a nyomás és az alacsony hőmérséklet együttes hatását vizsgáltuk. Több kísérletet végeztünk 90 MPa, 60 MPa illetve 30 MPa nyomást használva -8, -5 és -2 C°-on, de egyetlen embrió sem élte túl a beavatkozást. 0 C°-on végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy 30, 60 és 90 MPa nyomás hatására az embriók 30, 10 illetve 5 perc után elpusztulnak, noha szobahőmérsékleten a túlélésük nem befolyásolt. A második kísérletben használt szakaszos visszahozatalnak túlélést javító hatása nem volt.

A tapasztalatok alapján megállapíthatjuk, hogy az adott gondolatmenet alapján az embriók tartós tárolása ily módon nem ésszerű, hiszen a nyomás illetve az alacsony hőmérséklet együtt túl nagy sokknak bizonyult. A negatív eredmények ellenére a kísérlet tanulságai felhasználhatóak egyéb biológiai anyag fagyasztási kísérleteihez.

A sokk-fehérjék termelődésének indukálásán alapuló kísérletekben az első sorozatra alapozva kiválasztottunk egy paraméter-párt, melynél a morfológiai átalakulása a blasztocisztáknak már 90-100 %-ban megtörtént, viszont az in vitro (és in vivo) túlélés és továbbfejlődés a kontroll embriókétól nem különbözik (90-100%). Arra a feltételezésre alapoztuk a választást, hogy mivel a hidrosztatikus nyomás a folyadékokban minden ponton, minden irányból hat, ezért nem lehet oka a blasztociszták morfológiai átalakulásának: tehát a kompaktalódást a fehérjék nyomás hatására történő reverzibilis átalakulásának illetve fehérjék (sokk-fehérjék) termelődésének következményeként értékeltük.

Hatvan MPa nyomást alkalmaztunk szobahőn, 30 percig. A két másodperces dekompresziót követően a kompaktalódott blasztocisztákat Nowshari és Brem által 1998-ban közölt módszer

EREDMÉNYEK, ÚJ MEGOLDÁSOK ÖSZEFoglalása

szerint fagyasztottuk (7 M etilén glikol, 0,5 M szaharóz), majd a felengedés után termosztátban tenyésztettük a kibújt stádiumig.

Az eredmények azt mutatták, hogy a nyomással előkezelt embriók a felengedést követő 6 órával már 98 %-ban re-expandálódtak, 20 órával pedig 95 % kibújít, míg a nyomás előkezelés nélkül fagyasztott embrióknak 6 %-a a felengedést követő 6. órában volt még csak 1/2 expandált, 20 óra elteltével 29 % volt legalább 2/3 expandált és 0 % kibújít.

Nyomás előkezeléssel tehát az embriók visszaalakulásának sebessége gyorsult, a túlélés illetve a kibújás aránya jelentősen javult. Mivel eredményeink illetve a feltételezett biológiai háttér nincsenek molekulár-biológiai módszerekkel alátámasztva, indokolt lenne a nyomás hatására bekövetkezett biológiai, biokémiai változások behatóbb vizsgálata (nyomás hatására bekövetkező anyagszere változásainak vizsgálata, fehérjék tulajdonságainak vizsgálata.); illetve a módszer szélesebb körű (nagyobb esetszám, más fejlődési stádium, más faj, más biológiai anyag) kipróbálása.

1 Kibújt egér-blasztociszták jó hatásokkal fagyaszthatók egyszerű gyors-fagyasztásos módszerrel, 3 másos töménységű etilén glikol alkalmazásával. Kettő perces ekvibrálás elegendő időt biztosít a krioprotektánsnak a sejtekbe történő penetrálására.

2 Hidrosztatikus nyomás sikeres beillesztése a krioprezerváció folyamatába.

3 Expandált blasztociszták minden látható morfológiai változás nélkül igen nagy hidrosztatikus nyomást képesek elviselni. A nyomásérték illetve a nyomás alatt eltöltött idő növekedésével az embriók túlélési aránya csökken. Nyomással kezelt embriók, melyek in vitro továbbfejlődnek, beültetve a kezeletlen kontrollokhoz hasonló arányban születnek meg.

4 Az alkalmazott nyomás nagyságától és idejétől függően az embriók reverzibilis morfológiai változáson mennek át: kollabálnak.

5 A nyomással kezelt embriók túlélése szakaszos dekompreszióval szignifikánsan javítható.

- 6 Ha a nyomáskezelés alacsony hőmérsékleten (0 °C –on) zajlik, az embriók túlélése szignifikánsan rosszabb.
- 7 A fagyasztási protokollt megelőző nyomás-impulzus szignifikánsan növeli az embriók felengedést követő túlélését, in vitro továbbfejlődését (reexpandálódás sebessége és hatching).

4. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

CIKKEK

Cs. PRIBENSKZY, S. CSEH, Zs. ABONYI-TÓTH AND L. SOLT: SURVIVAL OF RAPIDLY FROZEN HATCHED MOUSE BLASTOCYSTS. ZYGOTE 2003. 11. PP. 361-366.

Cs. PRIBENSKZY, M. MOLNÁR, S. CSEH, L. SOLT: SURVIVAL OF MOUSE BLASTOCYSTS AFTER LOW TEMPERATURE PRESERVATION UNDER HIGH PRESSURE. ACTA VETERINARIA HUNGARICA 2004. 52. (NYOMDÁBAN)

PRIBENSKZY CSABA, CSEH SÁNDOR, ABONYI-TÓTH ZSOLT, SOLTI LÁSZLÓ: KIBÚJT EGÉR-BLASTOCISZTÁK GYORS FAGYASZTÁSA - MÁSODKÖZLÉS. MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA 2004. (PUBLIKÁLÁSRA ELFOGADVA)

Cs. PRIBENSKZY, M. MOLNÁR, S. CSEH, L. SOLT: IMPROVING POST-THAW SURVIVAL OF CRYOPRESERVED MOUSE BLASTOCYSTS BY HYDROSTATIC PRESSURE CHALLENGE. 2004. ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE (PUBLIKÁLÁSRA ELFOGADVA)

EGY OLDALAS KÖZLEMÉNYEK

Cs. PRIBENSKZY, S. CSEH, L. SOLT: IN VITRO SURVIVAL OF EXPANDED, HATCHING OR HATCHED BLASTOCYSTS FROZEN RAPIDLY IN ETHYLENE GLYCOL AND RE-HYDRATED IN SUCROSE OR DPBS. PROCEEDINGS OF THE 5TH ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION, 2001, AUSTRIA, VIENNA

Cs. PRIBENSKZY, S. CSEH, L. SOLT: IN VITRO SURVIVAL OF HATCHING AND HATCHED MOUSE BLASTOCYSTS CRYOPRESERVED BY RAPID FREEZING. THERIOGENOLOGY, 2002. Vol. 57. No.1. p. 476.

M. MOLNÁR, Cs. PRIBENSKZY, S. CSEH, L. SOLT: INVESTIGATION ON VIABILITY OF EMBRYOS AFTER EXPOSING TO HIGH HYDROSTATIC PRESSURE. THERIOGENOLOGY, 2002. Vol. 57. No.1. p. 506.

Cs. PRIBENSKY, S. CSEH, L. SOLT: IN VITRO SURVIVAL OF EXPANDED MOUSE BLASTOCYSTS PRESSURIZED AT ROOM TEMPERATURE AND AT 0°C: REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, 2002. VOL. 37., No. 4. P. 247.

Cs. PRIBENSKY, M. MOLNÁR, S. CSEH, L. SOLT: VIABILITY OF EMBRYOS AFTER EXPOSING TO HIGH HYDROSTATIC PRESSURE. THERIOGENOLOGY 2003. JAN. VOL.59. No.1. P. 329.

Cs. PRIBENSKY, S. CSEH, L. SOLT: RAPID FREEZING OF HATCHED ZONA-FREE MOUSE BLASTOCYSTS. THERIOGENOLOGY 2003. JAN. VOL.59. No.1. P. 309.

C. PRIBENSKY, M. MOLNAR, S. CSEH AND L. SOLT: EFFECTS OF PREVIOUS PRESSURE TREATMENT ON THE SURVIVAL AND DEVELOPMENTAL SPEED OF EXPANDED MOUSE BLASTOCYSTS FROZEN RAPIDLY (PILOT STUDY). REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT 2004. VOL. 16. No. 1 & 2 P. 181.

Cs PRIBENSKY, M MOLNAR, L SOLT, J DENG, J LEDERER: THE EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE MOTILITY OF FRESH AND FROZEN-THAWED BULL SEMEN. REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT 2005 (ELBÍRÁLÁS ALATT)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Témavezetőmnek, Prof. Dr. Cseh Sándornak
illetve Prof. Dr. Solti Lászlónak;
munkatársamnak és barátomnak Molnár Miklósnak;
barátaimnak, kollégáimnak és családomnak