

**Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Romanek**

**pt: „WPLYW WYSOKIEGO CIŚNIENIA HYDROSTATYCZNEGO (HHP) NA  
JAKOŚĆ KRIOKONSERWOWANYCH MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK  
MACIERZYSTYCH (MSC) ŚWINI”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jolanty Opiełi

Stosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP – ang. high hydrostatic pressure) jest przykładem innowacyjnego podejścia do poprawy efektywności kriokonserwacji komórek. Indukcja reakcji obronnych komórek poprzez poddawanie ich działaniu HHP przed kriokonserwacją prowadzi do zminimalizowania wpływu działania stresu na komórki. Ze względu na fakt udokumentowanego wpływu metody HHP na poprawę kriotolerancji oocytów (Pribenszky i in., 2008a), plemników (Pribenszky i in., 2006, 2009, Huang i in., 2009) oraz bardziej wrażliwych na kriokonserwację blastocyst (Pribenszky i in., 2008c) wnioskowaliśmy, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne może również korzystnie wpływać na jakość mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC – ang. mesenchymal stem cells) poddawanych mrożeniu.

Głównym celem badań było opracowanie efektywnej metody kriokonserwacji komórek MSC świni. Cel ten zamierzono osiągnąć poprzez realizację następujących badań szczegółowych:

- 1) Poddawanie komórek działaniu HHP o pięciu różnych wartościach ciśnienia w celu wyboru najkorzystniejszych, w najwyższym stopniu zwiększających podatność MSC na kriokonserwację;
- 2) Wykazanie wpływu dwóch najkorzystniejszych wartości ciśnienia HHP na jakość i zdolności funkcjonalne MSC poprzez ocenę zmian apoptotycznych oraz jakości zarodków bydłecych uzyskiwanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* i hodowanych w obecności MSC poddawanych działaniu HHP.

Świńskie komórki MSC izolowano z pobranego przyżyciowo szpiku kostnego. Po kilkunastodniowej hodowli *in vitro* MSC poddawano działaniu HHP o ciśnieniu: 20MPa, 30MPa, 40MPa, 50MPa i 60MPa. Następnie komórki kriokonserwowano i po rozmrożeniu poddawano ocenie żywotności, tempa proliferacji, poziomu ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórek oraz poziomu ekspresji transkryptów genów *C-myc*, *Rex1*, *Sox2* a także

*surwiwiny* metodą qRT-PCR. W celu zbadania bezpośredniego wpływu HHP na komórki przeprowadzono ocenę obecności proapoptotycznego białka Bax metodą Western-blotting w komórkach poddawanych HHP z pominięciem kriokonserwacji.

Na podstawie wyników uzyskanych z ww. analiz wybrano najkorzystniejsze wartości ciśnienia HHP. Dalsze analizy przeprowadzono na MSC traktowanych HHP o wartościach ciśnienia 40MPa i 60MPa oraz MSC niepoddanych HHP, stanowiących grupę kontrolną. Ocenie poddano poziom zmian apoptotycznych w fazie inicjacji (kaspaza 8), w fazie wykonawczej (Bax, Bcl<sub>xL</sub>, Bcl<sub>xS</sub> oraz *surwiwina*) oraz w fazie zniszczenia (CAD) na poziomie białek metodami Western-blotting, immunofluorescencyjną i fluorescencyjną.

Z kolei wpływ HHP na zdolności funkcjonalne MSC oceniano pośrednio poprzez ocenę jakości blastocyst uzyskanych we współhodowli z komórkami MSC. Uzyskane bydlęce oocyty po dojrzewaniu *in vitro* zapładniano mrożonym nasieniem buhaja. Zarodki bydlęce podejmujące podziały komórkowe przenoszono do hodowli *in vitro* w 4 grupach doświadczalnych: 1. w pożywce zawierającej syntetyczny płyn jajowodowy (ang. synthetic oviductal fluid) (SOF), 2. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC niepoddawane działaniu HHP (SOF/MSC), 3. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC poddawane działaniu HHP o wartości ciśnienia 40MPa (SOF/MSC/HHP40) oraz 4. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC poddawane działaniu HHP o wartości ciśnienia 60MPa (SOF/MSC/HHP60). Zarodki w stadium blastocysty poddawano analizie TUNEL.

Wszystkie analizy przeprowadzono w minimum trzech powtórzeniach. Przy ocenie zdolności do rozwoju zarodków uzyskanych z IVF/IVC w różnych systemach hodowli *in vitro* wykorzystywano test  $\chi^2$ . W przypadku pozostałych obliczeń wykorzystywano test jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post hoc: testem Tukey'a.

Analizując wyniki uzyskane dla komórek MSC niepoddanych kriokonserwacji stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji proapoptotycznego białka Bax pomiędzy analizowanymi grupami doświadczalnymi

Ocena żywotności MSC badana bezpośrednio po rozmrożeniu komórek wykazała statystycznie wysoce istotne różnice ( $P < 0,001$ ) między MSC poddanymi działaniu HHP o ciśnieniu 60MPa a kontrolą. Statystycznie istotne różnice ( $P < 0,05$ ) zaobserwowano pomiędzy komórkami podawanymi HHP o ciśnieniu 50MPa i 40MPa a kontrolą. Przyrost MSC poddawanych działaniu HHP o wartości 40MPa był wysoce statystycznie istotnie wyższy ( $P < 0,02$ ) w porównaniu do MSC kontroli oraz MSC poddanymi HHP o wartości 30MPa. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w żywotności MSC po 8 dniach hodowli *in vitro*, w ekspozycji PS oraz w poziomie transkryptów genów *C-myc*, *Rex1*, *Sox2* oraz

*surwiwiny* pomiędzy MSC poddanymi działaniu HHP a MSC kontrolnymi. Dodatkowo nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie aktywności kaspazy 8 oraz w poziomie ekspresji białek CAD, *surwiwiny*, Bax, Bclx<sub>L</sub>, Bclx<sub>S</sub> pomiędzy badanymi grupami doświadczalnymi (40MPa, 60MPa) a kontrolą. Statystycznie istotnie wyższą ekspresję genu *Rex1* zaobserwowano pomiędzy komórkami poddanymi działaniu HHP o wartości ciśnienia 60MPa a MSC traktowanymi HHP o ciśnieniu 30MPa ( $P<0,002$ ) oraz pomiędzy komórkami poddawanych działaniu HHP o wartości ciśnienia 60MPa a MSC traktowanymi HHP o wartości 20MPa ( $P<0,05$ ). Dodatkowo zaobserwowano, że komórki poddawane działaniu HHP o wartości 60MPa wykazywały statystycznie istotnie wyższy poziom ekspresji genu *surwiwiny* w porównaniu do MSC traktowanych ciśnieniem 30MPa ( $P<0,05$ ). W kontrolnej pożywce SOF uzyskano wysoce statystycznie istotnie wyższą liczbę blastocyst ( $P<0,005$ ) w porównaniu do liczby blastocyst wyhodowanych w SOF/MSC oraz w SOF/MSC/HHP60 oraz statystycznie istotnie wyższą ( $P<0,05$ ) w porównaniu do liczby blastocyst hodowanych w SOF/MSC/HHP40. Ze względu na procentowo niski uzysk blastocyst w grupach zarodków hodowanych w SOF/MSC/HHP40 i SOF/MSC/HHP60, analizie TUNEL poddano tylko odpowiednio 8 i 4 blastocysty. Blastocysty uzyskane z hodowli w SOF/MSC/HHP40 oraz SOF/MSC/HHP60 charakteryzowały się statystycznie niższym indeksem apoptotycznym ( $P<0,05$ ) w stosunku do zarodków uzyskanych z hodowli w SOF/MSC oraz SOF, jednak zbyt mała liczba ocenianych blastocyst nie pozwalała na formułowanie wiarygodnych wniosków.

Reasumując, stosowanie HHP przed kriokonserwacją o wartościach 40MPa, 50MPa i 60MPa zwiększa żywotność MSC ocenianą bezpośrednio po rozmrożeniu, a HHP o wartości 40MPa zwiększa tempo proliferacji komórek ocenianej w 8 dniu hodowli *in vitro*. Ponadto HHP nie wykazuje negatywnego wpływu na jakość komórek i nie indukuje apoptozy w komórkach. Z kolei stosowanie MSC do współhodowli zarodków bydłych *in vitro* wpływa niekorzystnie na liczbę uzyskiwanych blastocyst przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na ich jakość.

Data utworzenia: 26 czerwca 2016