

Vedecká rada Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre

Ing. Juraj Petrák

**Úloha Inzulínu podobného rastového faktoru - I (IGF-I)  
pri strese u teliat**

Nitra 2006

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V  
NITRE

Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov

Katedra špeciálnej zootechniky

**Úloha Inzulínu podobného rastového faktoru - I (IGF-I)  
pri strese u teliat**

Autoreferát dizertačnej práce  
Na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor  
vo vednom odbore: 41-05-9  
Špeciálna zootechnika

Ing. Juraj Petrák

Nitra 2006

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre špeciálnej zootechniky, Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: **Ing. Juraj Petrák**

Katedra špeciálnej zootechniky  
Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Vedúci dizertačnej práce : **prof. doc. Ing. Ondrej Debrecéni, CSc.**

Katedra špeciálnej zootechniky  
Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Oponenti: prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc - FBP SPU Nitra  
prof. Ing. Ján Frelich, CSc - Jihočeská univerzita České Budejovice  
RNDr. Marián Juráni CSc - Ústav biochémie a genetiky SAV Ivánka pri Dunaji

Autoreferát bol odoslaný dňa .....

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra špeciálnej zootechniky,  
Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity  
v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa ..... o ..... hod.  
Pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 41-05-9 Špeciálna zootechnika  
na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity  
v Nitre.

Miesto konania: Katedra ŠZ  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: .....  
S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte FAPZ SPU v Nitre.

Predseda komisie pre obhajoby vo vednom odbore 41-05-9

**prof. doc. Ing. Ondrej Debrecéni, CSc.**  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

## ABSTRAKT

Počas stresovej záťaže v organizme dochádza k narušeniu homeostázy. Aktivujú sa mechanizmy, ktoré zabezpečujú energiu pre zdlanie záťaže a následne mechanizmy, ktoré zabezpečia obnovu vlastných energetických zdrojov organizmu. Stresová záťaž je regulovaná na viacerých úrovniach organizmu. Regulácia prebieha od vnútrobunkových regulátorov až po centrálnu nervovú sústavu.

Cieľom tejto práce bolo objasniť, či je možné využiť IGF-I ako potencionálny markér pre stres odolné zvieratá a doplniť teóriu excitačných typov na základe molekulárno genetických ukazovateľov riadenia záťaže.

Prvým krokom bolo objasnenie niektorých molekulárno-regulačných mechanizmov v regulácie aktivity IGF-I počas záťaže.

Experimenty boli zamerané na regulátor transkrypcie, a to transkripčný faktor p53, kinázu ASK-I sprostredkujúcu intra a extracelulárne stresové signály, a IGF-I rastový faktor v extracelulárnom a obehovom systéme organizmu s antiapoptotickými účinkami.

Experimenty boli urobené na teľatách plemena holšteinsko frízske a sledovanie molekulárnych mechanizmov aktivity p53 a ASK-I sme realizovali na bunkovej kultúre z granulóznych buniek kráľika. Diferencované teľatá do excitačných skupín boli vystavené psychickej a fyzickej forme záťaže a bola stanovená koncentráciu IGF-I v sére. Psychická forma záťaže predstavoval test habituácie a fyzická forma záťaže 1,5 hodinová imobilizácia. Najvyššie koncentrácie IGF-I mali telatá v sére v kľudovom odbere všetkých excitačných typov. Najvyššie koncentrácie IGF-I mali telatá v sére typu EHb+ po psychickej aj fyzickej forme stresu.

Dalšie výsledky dokazujú výrazný vplyv transkripčného faktora p53 na obmedzenie aktivity IGF-I prostredníctvom jeho väzbového proteínu IGFBP3 a jeho receptoru IGF-IR.

## ABSTRACT

During the stress charge in the organism, the homeostases is disturbed. The mechanisms, which secure the energy for comming through the charge, and then the mechanisms, which secure the renewsation of the own energetic sources. Stress charge is regulated in the organism on several levels. It is from intracellular regulators to central nerves system.

The bases of this work was to get clear, if the course of the research of IGF-I as a potential marker of stress proof animals is convenience and to get more information of the theory of the exciting types on the base of molecular-genetic markers, which regulate the charge.

Our target was the regulator in the core of the cell, the transcribing factor p53, then the kinasis ASK-I, which mediates the intra- and extracellular signals, and the last one was the grow factor IGF-I in the extracellular and circular system in the organism with apoptotical effect.

The first step was, to explain several cellular-regulating mechanisms in the regulation of the activity of the IGF-I during the charge.

The experiments were done on the calfs of the breed holstein-fries and the followings of the molecularr mechanisms of the activity of p53 and ASK-I were made on the cellular culture from the granuloses cells of the rabbit. Calfs, differed to exciting groups, were faced to psychical and physical form of charge and the concentration of the IGF-I in the serum was meassured. The psychical form of charge was the habituation and the physical one was imobilization. Calfs in the calm stadium had the highest concentrations of IGF-I in the serum, what is the same for each exciting type. Calfs of the type Ehb+ after the psychical and physical form of stress had the highest concentrations of IGF-I in the serum.

Other resulsts proved a significant influence of the transcribing factor p53 in limiting of the activity of IGF-I through its binding protein IGFBP3 and its receptor IGF-IR.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>7</b>
<b>3. CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>10</b>
<b>5. DOSIAHNUTÉ VÝSLEDKY.....</b>	<b>13</b>
<b>6. ZÁVERY K ROZVOJU VEDNEJ DISCIPLÍNY A PRÍNOS PRE PRAX.....</b>	<b>19</b>
<b>7. ZOZNA POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>20</b>
<b>8. PUBLIKOVANÉ PRÁCE .....</b>	<b>21</b>

## 1. ÚVOD

Novodobé veľkovýrobné chovateľské podmienky v chovoch hospodárskych zvierat vyžadujú od chovateľov vytvorenie optimálneho prostredia pre dobrý zdravotný a psychický stav zvierat. Odchov teliat vo veľkovýrobných podmienkach vyžaduje sústavné poznávanie ich fyziologických a adaptačných schopností na nové technologické podmienky.

Snahou každého živého organizmu je udržanie si relatívnej stálosti svojho vnútorného prostredia – homeostázy, vo vzťahu k zmenám vnútorného ako aj okolitého prostredia. Zmeny, ktoré narúšajú homeostázu jedinca, dokáže organizmus regulovať určitými regulačnými mechanizmami. Pri prekročení určitej hranice záťaže dochádza k stresovej reakcii, ktorá má rôznu odozvu vo vzťahu k stupňu vývoja daného organizmu, ako aj stresového podnetu.

Odpoveď organizmu na stresový podnet závisí nie len od jeho charakteristiky, ale aj od veľkého počtu ďalších faktorov, ktoré sú podmienené príslušným živočíšnym druhom, pohlavím, vekom, psychickou a fyzickou odolnosťou, genetickou predispozíciou, skúsenosťou s daným stresovým podnetom a zdravotným stavom jedinca.

Rozvinutá stresová reakcia má typický dichotómny charakter. Na jednej strane pod vplyvom stresového podnetu organizmus mobilizuje svoje adaptívne mechanizmy čo predstavuje aktivácia energetických zdrojov a ochranných mechanizmov, ktoré mu pomáhajú vyrovnáť sa so záťažou a sú nevyhnutné pre udržanie vitálnych funkcií a homeostázy organizmu, alebo aspoň jeho prežitie v nepriaznivých podmienkach. Na druhej strane podstata stresovej reakcie môže priamo prispievať k rozvoju najrôznejších patologických stavov, ktoré môžu viesť k ťažkému poškodeniu organizmu. Najčastejšie boli pozorované ochorenia súvisiace s kardiovaskulárnym, autoimunitným systémom, rozvoj rakovinových ochorení, poruchy psychiky a poruchy reprodukcie.

Poznanie fyziológie regulačných mechanizmov zapojených do stresovej reakcie na jednotlivých úrovniach organizmu pomáha pochopiť podstatu týchto regulačných mechanizmov.

Najčastejšie sa organizmus adaptuje na nové podmienky na úrovni CNS-centrálnej nervovej sústavy. CNS reaguje prvá adaptačnými mechanizmami na zmeny vnútorného, alebo okolitého životného prostredia organizmu. Tieto mechanizmy prebiehajú na úrovni nervovej a neurohumorálnej. Pri týchto reguláciách sa využívajú rôzne formy učenia. CNS riadi aj hormonálnu sústavu.

Hormonálne regulačné mechanizmy aktivujú hormóny. Niektoré hormóny pôsobia priamo, ale aj prostredníctvom rastových faktorov. Priamy, ale aj sprostredkovaný účinok bol pozorovaný u STH ktorý účinkuje aj prostredníctvom rastového faktoru IGF-I.

Rastové faktory pôsobia na bunku prostredníctvom špecifických receptorov lokalizovaných na povrchu bunkovej membrány. Vytvorením komplexu rastový faktor - receptor, dochádza k aktivácii ich vnútrobunkových sprostredkovateľov účinku. Patria sem cyklické nukleotidy a rôzne kinázy. Kinázy prenášajú signál na ďalšie kinázy, alebo priamo na transkripčný faktor. Transkripčný faktor aktivuje, alebo inhibuje prepis génov, ktorých produkty v danej záťažovej situácii sú potrebné pre vhodnú fyziologickú odozvu bunky a organizmu.

V našej práci sme sa zamerali na rastový faktor IGF-1, transkripčný faktor p53 a kinázu ASK-I u ktorých predpokladáme, že majú funkčný vzťah počas stresovej reakcii v organizme. Z perspektívneho hľadiska nám ide o vydišerencovanie markérov pre stres odolné zvieratá.

## 2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### Využitie tesu habituácie pre diferenciáciu neuroreflexívnych typov teliat

Habituácia je forma učenia, ktorá stojí na hranici medzi asociatívnymi a neasociatívnymi formami učenia. Habituácia je forma učenia, ktorou sa organizmus učí nereagovať na určitý podnet. Po opakovanom predkladaní určitého podnetu reakcia na tento podnet mizne. Priebeh miznutia reakcie sa popisuje habituácnou krivkou. Po prestávke predkladania podnetu sa reakcia objaví, ale v menšej intenzite, v niektorých prípadoch sa už neobjaví nikdy. Intenzita vzrušenia – excitabilita, meraná počtom reakcií za časovú jednotku a rýchlosť habituácie sa používajú na individuálnu charakteristiku vlastností centrálnej nervovej sústavy. Zvieratá sú triedené na vysoko, stredne a nízkovzrušivé (EHb+, EHb°, EHb-) a zvieratá s vysokou, strednou a nízkou rýchlosťou habituácie (Debreceni a kol. 2001).

Habituáciou hovädzieho dobytku sa zaoberal Kovalčík (1981). Používal metódu open field testu a dve základné kvalifikačné kritériá: intenzitu vzrušenia a rýchlosť habituácie. Zo širokej škály behaviorálnych charakteristík sa ukázalo len málo vhodných pre hodnotenie a porovnávanie zvierat navzájom. Jediné motorická aktivita, či už vyjadrená počtom prechodov štvorcov, alebo celkovým počtom pohybu, bola jednoznačným indikátorom vzrušenia, merateľným u všetkých jedincov.

Senzibilita, a teda aj následky chronických stresov úzko súvisia s dráždivosťou CNS a so schopnosťou jej habituácie v stresovej situácii. Ak sa zviera dostane do novej, preňho neobvyklej situácie, reaguje zvýšenou spontánnou činnosťou centrálnej nervovej sústavy. Tomuto javu hovoríme excitácia CNS. V dôsledku toho vzniká v CNS napätie, ktoré sa kompenzuje spontánnymi motorickými alebo emočnými prejavmi. Pre kvantifikáciu habituácie, v jej zdanlivo diferencovaných fázach – excitačnej a habituáčnej sa používa modifikovaný test otvoreného poľa – open field test. Pre prevedenie testu sa používa habituácný box. Z experimentov vyplynulo, že teľatá s vysokou lokomočnou aktivitou radíme do kategórie: EHb+ typu. Tieto zvieratá sú v testoch habituácie schopné eliminovať málo intenzívne stresové situácie prevažne behaviorálne. Nahromadený reakčný potenciál CNS kompenzuje lokomočnými a motorickými aktivitami. Adaptácia prebehne bez vzniku stresu (všeobecného adaptačného syndrómu) a jeho energetických a fyziologických následkov. Takéto zvieratá sa ľahko adaptujú v chovateľských podmienkach a dosahujú lepšie produkčné ukazovatele. EHb+ zvieratá majú najnižšie kľudové, ale aj po imobilizácii hladiny kortizolu v porovnaní s EHb- a EHb°.

Teľatá EHb- typu zapájajú do kompenzácie záťaže metabolické mechanizmy. Majú nízky prah citlivosti, pre rozvoj stresového syndrómu. V bežných chovateľských situáciách trpia chronickými stresmi so všetkými obehovými, imunitnými a energetickými následkami. Dosahujú nízku úžitkovosť, trpia chorobami s metabolickými ťažkosťami. Nie sú vhodné do veľkovýrobných podmienok chovu. V porovnaní s EHb+ a EHb° majú najvyššie kľudové hladiny adrenalínu v plazme (Debreceni, 1988).

Z poznatkov odbornej literatúry, o pôsobení stresu na organizmus, vyplýva, že stresové zaťaženie zmenou koncentrácie hormónov a živín v krvi a nervovým pôsobením, ovplyvňuje priamo homeostázu, a tým aj stav buniek v jednotlivých tkanivách. Bunky menia syntézu, alebo vylučovanie špecifických proteínov, ktoré majú informačný, alebo metabolický efekt. Úlohou týchto proteínov je opätovne navodiť homeostázu v bunke, v jej blízkom okolí a aj v celom organizme. Ak oprava nie je možná, dochádza k aktivácii apoptózy -bunkovej smrti.

### Apoptóza

Apoptóza je fyziologický proces odstraňovania buniek z organizmu bez príznakov zápalovej reakcie, ako je tomu pri nekróze. Z organizmu sú odstraňované bunky, ktoré boli poškodené



do tej miery, že nedokážu vykonávať svoju funkciu, teda bunky ktoré môžu poškodiť celistvosť organizmu (Waldmeier, 2003).

Proces apoptózy môže byť navodený rôznymi stimulmi. Je to napríklad UV, alebo gama žiarenie, chemoterapeutiká, odstránenie rastových faktorov, proapoptotické cytokíny (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ), FAS (Masopust, 2003). Apoptózu môžu navodiť ďalšie bunkové stresory ako napríklad kyslíkové radikály, Ca<sup>2+</sup>, oxidy dusíka, cytochróm c a ďalšie (Mattson, 2000).

Intracelulárne cesty apoptózy môžu byť navodené extracelulárnymi a intracelulárnymi podnetmi.

**Extracelulárnou** cestou dochádza k aktivácii smrtiacich receptorov proapoptotických cytokínov umiestnených v plazmatickej membráne bunky. Patria sem proapoptotické cytokíny (TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ) a ďalšie. Jednou z intracelulárných kináz z apoptotickým efektom je ASK-I kináza, ktorá je aktivovaná prostredníctvom proapoptotických receptorov, aktivovaných extracelulárnymi podnetmi (Galvan, 2003).

**Intracelulárne** cesty sú spúšťané vnútrobunkovými organelami ktoré môžu narušiť vnútrobunkovú homeostázu. Najčastejšie sú do týchto pochodov zapojené mitochondrie, endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Intracelulárne cesty, spúšťajúce apoptózu, sú tiež aktivované pri poškodení DNA (Zimmermann, 2001).

Väčšina proapoptotických signálov vychádza predovšetkým z mitochondrií. Tieto signály sú riadené vzájomným pôsobením dvoch proteínov a to Bcl-2 a BAX (Masopust, 2003).

Do regulácie veľkosti mitochondriálnych pórov je zapojený proteín BAX Bcl-2. Proteín BAX po interakcii s proteínom mitochondriálneho póru VDAC zmení jeho konformáciu a spôsobí jeho otvorenie. Proteín Bcl-2 má zase opačný účinok a jeho úlohou je zase VDAC zatvárať (Matsuzava, 2001). Po otvorení mitochondriálneho membránového póru mitochondria nabobtnáva a následne sa z jej intermembránového priestoru uvoľňuje cytochróm c do cytoplazmy. Cytochróm c aktivuje kaskádu kaspáz, ktoré proteolyticky štiepia životne dôležité proteíny cytoskeletu a jadra bunky (Masopust, 2003).

## **IGF-I**

IGF-I je rastový faktor, ktorý podporuje rast, obnovu tkanív a metabolizmus v organizme.

IGF-I je zapojený do regulačnej osi apoptózy. Signály sprostredkované prostredníctvom IGF a jeho receptoru podporujú prežívanie buniek a chránia ich pred rôznymi apoptotickými stimulmi (Butt, 1999).

Účinok IGF-I na bunku je regulovaný jeho hlavným väzbovým transportným proteínom IGFBP3. Ďalším hlavným regulátorom účinku IGF-I na bunku je jeho receptor IGF-IR.

Vytvorením väzby IGFBP3 a IGF-I sa znižuje možnosť väzby IGF-I s jeho receptorom na bunkách. Expresia IGFBP3 je aktivovaná transkripčným faktorom p53 (Grinberg, 2000). Expresia génu pre Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) je regulovaná v osteosarkónových bunkách transkripčným faktorom p53. Nemutovaný p53 potláča expresiu IGF-IR a mutovaný jeho expresiu zvyšuje (Ohlsson, 1998).

Transkripcia génu pre receptor IGF-I je inhybovaná transkripčným faktorom p53. Gén pre receptor IGF-IR má v promótorovej časti väzbové miesto pre väzbu nemutovaného transkripčného faktora p53 (Werner, 1996).

## **p53**

Transkripčný faktor p53 je považovaný za jeden z najdôležitejších regulátorov odpovedi na najrôznejšie formy bunkového stresu. Podieľa sa pri riadení viacerých bunkových procesov. Riadi zastavenie bunkového cyklu inhibíciou replikácie DNA, reguluje opravu poškodenej DNA, udržiava stabilitu genómu, aktivuje apoptózu (Uldrian, 2002).

Pri poškodení DNA rôznymi genotoxickými škodlivinami, proteín p53 pozastaví bunkový cyklus pri prechode z G1 fázy do S fázy, až do doby opravenia poškodeného úseku DNA. V prípade neopraviteľného poškodenia DNA proteín p53 navodí apoptózu (Masopust, 2003). Proteín p53 potláča aktivitu proteínu Bcl-2, ktorý patrí do skupiny proteínov s antiapoptotickým účinkom (Zimmermann, 2001). Proteín p53 naopak zvyšuje hladiny proteínu BAX, ktorý aktivuje apoptózu (Waldmeier, 2003).

V bunkách, u ktorých nastal proces apoptózy, sa objavujú apoptotické markéry, medzi ktoré patrí proteín BAX.

V bunkách, ktoré prežívajú, rastú a množia sa, sú aktívne antiapoptotické markéry, medzi ktoré patrí proteín Bcl-2.

### **ASK-I**

Apoptotické signály regulujúca kynáza ASK-I patrí medzi mitogénom aktivované proteínkinázy - (MAP) kinázy. Tieto kinázy vytvárajú jednu zo základných vnútrobunkových signálnych dráh, ktorej aktiváciou dochádza k navodeniu apoptózy v bunke. Prostredníctvom tejto signálnej dráhy apoptózu navodujú cytokíny a stres (Matsuzava, 2001).

Oxidatívny stres ako napríklad reaktívne kyslíkové voľné radikály indukujú aktiváciu ASK-I. (Ichijo, 1997). ASK-I vytvára komplex z IGF-IR a následne dochádza k inhibícii aktivity ASK-I a prerušeniu tejto apoptotickej signálnej dráhy (Galvan, 2003).

## **3. CIEĽ PRÁCE**

Experimentálne overiť :

1. Možnosť využitia koncentrácie IGF-I v krvnom sére teliat ako markéra pre predikciu odolnosti teliat voči stresu.
2. V modelovom experimente na granulóznych bunkách kráľika preskúmať zmeny v produkcii proteínu BAX a Bcl-2. Objasniť potenciálny mechanizmus inhibície receptora pre IGF-I a aktiváciu IGFBP3 počas stresovej záťaže a čiastočne pochopiť vnútrobunkové regulačné mechanizmy pri záťaži.

Vnútrobunkové regulačné mechanizmy sledovať na úrovni kináz (ASK-1) a na úrovni transkripčných faktorov (p53).

Čiastkovými cieľmi práce sú dva experimenty, zamerané na:

1. Modelové štúdium sledovania hladín apoptotického markéra BAX a antiapoptotického markéra Bcl-2 po hyperprodukcii transkripčného faktoru p53 a ASK-I kinázy v granulóznych bunkách kráľika.
2. Zhodnotiť vplyv p53 na aktivitu ASK-I.
3. Zistiť zmeny sérovej koncentrácie IGF-I, ako potenciálneho markéra pre stres odolnosť, u teliat vystavených záťaži v teste habituácie a v imobilizácii.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Biologický materiál

- V prvej etape in vitro experimentoch boli ako experimentálny biologický model, použité samice králikov plemena Nitriansky biely. Zvieratá boli v priemernom veku 6 mesiacov. Tieto zvieratá pochádzali z chovu Výskumného ústavu živočíšnej výroby v Nitre. Zvieratá sme použili ako donorky granulóznych buniek z vaječníkov, z ktorých sa zakladali bunkové kultúry a následne sa s nimi experimentovalo in vitro.

- V druhej etape bolo do experimentu zaradených 10 teliat, 5 samcov a 5 samíc. Jednalo sa o holšteinske plemeno. Zvieratá pochádzali z chovu Vysokoškolského poľnohospodárskeho podniku Oponice, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity, Nitriansky okres, Slovenská republika. Teľatá boli vo veku 3-4 mesiace. Živá hmotnosť testovaných teliat sa pohybovala v rozpätí od 70 do 90 kg. Teľatá boli pred zvozom veterinárne vyšetrené. Do priestorov výskumnej stanice katedry špeciálnej zootechniky dovezené všetky naraz v počte 10 kusov. Boli skupinovo ustajnené počas 7 dňového adaptačného obdobia.

### 4.2. Použité metódy

#### 4.2.1. Prvá etapa

##### 4.2.1.1. Získavanie granulóznych buniek

Vaječníky pre jeden experiment sme získali v časovom intervale 30 minút. V priemere sa zabíjali 4 (kusy) králikov samičieho pohlavia v priemernom veku 6 mesiacov, od ktorých sme získali 8 vaječníkov. Vaječníky sme vypreparovali z mŕtveho tela vo vise do 10 minút po elektrickom omráčení, odkrvení, stiahnutí kože a otvorení brušnej dutiny. Do 15 minút od získania posledného vaječníku na bitunku sme vaječníky prepravili do laboratória vo fyziologickom roztoku, kde sme ich hneď začali spracovávať.

##### 4.2.1.2. Spracovanie granulóznych buniek

Vaječníky sme v sterilných podmienkach opláchli v 70% etanole a premyli vo fyziologickom roztoku. Granulózne bunky králika sme získali resekciami vaječnickových folikulov. Resekciu ovárií sme prevádzali v petriho miskách s premývacím médiom Bio-rich1 s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra (Inštitút Veterinárnej medicíny v Brne, Česká Republika). Potom sme prefiltrovali bunky cez sitko do sklenenej kadičky a homogénnu suspenziu buniek sme prepipetovali zrezanou plastikovou špičkou do sklenených skúmaviek v rovnakom objeme. V ďalšom kroku sme ich koncentrovali odstredovaním 2krát 10 min pri 1200 ot/min. Po prvom odstredovaní po pridaní preplachovacieho média sme špičkou jemne rozsuspendovali pelet z buniek v médiu a toto médium už neobsahovalo prídavok séra. Po druhom odstredovaní sa znovu médium zlialo a do skúmaviek sa pridal 1 ml oplachovacieho bezsérového média. Pelet buniek sa znovu jemne rozsuspendoval a celý objem sa prepipetoval do ependorfiek a odstredovali v mikrocentrifuge 10 min pri 2500ot/min. Po odstredení sme médium odsali pipetou a bunkový pelet sme rozsuspendovali v 150mikrolitroch bezsérového média. Takto sme mali bunky pripravené na transfekciu.

Počas prípravy lipokomplexov s génovými konštrukciami sme ependorfky s bunkami uložili do termostatu s teplotou 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Bunky sme rozdelili na 4 skupiny.

#### **4.2.1.3. Použité plazmidy pre transfekciu**

Plazmid so sekvenciou pre Apoptotické signály stimulujúcu kinázu-1 ASK-I, pcDNA3 HA-ASK1-WT sme získali od Atsushi Matsuzawa, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japonsko.

Plazmid pEGFP-N1 od firmy clontech.com je to komerčný plazmid a získal som ho z Ústavu virológie Slovenskej Akadémie vied v Bratislave.

Plazmid pC53-SN3 zo sekvenciou pre proteín p53 som získal z Ústavu virológie Slovenskej Akadémie vied v Bratislave. Tento plazmid bol vyrobený a darovaný Slovenskej Akadémie vied v Bratislave Ústavu virológie B. Vogelstein-om z Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore USA.

#### **4.2.1.4. Príprava génových konštrukcií**

Génové konštrukcie nám boli dodané v roztoku TE pufor ( 10mM TRIS.CL pH 8.0 , 1 mM EDTA pH 8.0 ) DNA alebo na sterilnom papieriku v sušenej forme.

Na klonovanie génových konštrukcií som použil bunky DH5-alfa Esherichie coli.

V prvom kroku sa pripravili kompetentné bunky aby boli schopné prijať plazmid. Transformáciu buniek sme previedli pomocou CaCL<sub>2</sub> procedúry podľa Pracovného návodu (Maniatis, Cold Spring Harbor laboratory 1982). Po vyrastení bakteriálnych kolónií na kultivačných platničkách sme na vyselektovanie rezistentných buniek použili ampicilín v koncentrácii (100µg/ml), alebo kanamycín v koncentrácii (50µg/ml) kultivačného LB média podľa (Maniatis 1982) v závislosti od druhu klonovaného plazmidu. Kultivačné LB médium sme pripravovali v objeme 1 liter. Na jeho prípravu sme použili 10g NaCl, 5g Kvasničného extraktu, 10g Peptónu ( Bactro-trypton). Všetko sme to rozpustili v 0,8L H<sub>2</sub>O a upravili pH na 7,5 roztokom NaOH a doplnili do výsledného objemu 1liter. Pre vytvorenie pevnej kultivačnej fázy na bunkové kolónie z LB média sme použili Agarový prášok do výslednej koncentrácie 1,5% z objemu. Agar sme rozpúšťali 30min. autoklávaním. Po vychladení LB média pod 50°C pridávam antibiotiká v horeuvedenej koncentrácii. Následne LB médium rozliavam v sterilnom boxe do kultivačných petriho misiek, v ktorých necháme médium vychladnúť. Misky boli pri chladnutí zatvorené.

#### **4.2.1.5. Prevedenie transfekcie**

Bunky boli rozdelené na 3 skupiny.

Prvá skupina bola považovaná za kontrolnú a bola vystavená transfekcii plazmidom pEGFP-N1. nesúcim genetickú informáciu pre zelený floreskujúci proteín. Plazmid pEGFP-N1. sme použili pre rýchlu kontrolu úspešnosti transfekcie po ukončení kultivácie. Bunky pod fluorescenčným mikroskopom svietili na zeleno.

Druhú skupinu buniek sme vystavili kotransfekcii plazmidom so zabudovanou sekvenciou pre pC53-SN3 zo sekvenciou pre proteín p53 spolu s plazmidom pre pEGFP-N1.

Tretiu skupinu buniek sme vystavili kotransfekcii plazmidom pcDNA3 so zabudovanou sekvenciou pre proteín ASK-1 HA-ASK1-WT a plazmidom pre pEGFP-N1.

Transfekciu sme robili systémom vytvárania lipokomplexov s plazmidovou DNA. Na vytvorenie lipokomplexov sme použili súpravy Geneporter 2, GTS ( Genetherapy systems). DOTAP ( Carl Roth GmbH+Co. Karlsruhe Nemecko), a Roti-Fect ( Carl Roth GmbH+Co. 76231 Karlsruhe Nemecko ).

Prípravu lipokomplexov dávkovanie príslušnej plazmidovej cDNA a ošetrovanie buniek pred transfekciou sme previedli podľa priloženého pracovného protokolu v súprave pre transfekciu bunkovej suspenzie.

Po transfekcii bunky určené na imunocytochemické spracovanie boli kultivované v chamberslidoch- 8 jamkových kultivačných komôrkach pripevnených na podložnom sklíčku ( Nunc Inc., Naperville, USA ) v objeme 200 mikrolitrov kultivačného média DMEM-F-12 ( Sigma, St Louis, MO, USA ) s prídavkom 10% fetálneho bovinného séra (Inštitút Veterinárnej medicíny v Brne ) a 1% roztokom antibiotík a antimykotík ( Sigma ) na jednu jamku. Po rozpipetovaní chamberslidy boli umiestnené v kultivačnom boxe pri teplote 37°C v bežnej atmosfére s prídavkom 5% CO<sub>2</sub> v sterilných podmienkach 5 dní. Po 5 dňoch bunkovej predkultúry bolo médium kultivačných platničiek odsaté a doplnené v rovnakom objeme a zložení.

#### **4.2.1.6. Imunocytochemická analýza**

Po 2 dňovej kultivácii buniek v chamberslidoch po výmene média sme bunky hneď po vybratí z termostatu opláchli trikrát v chladenom fyziologickom roztoku 4°C a zafixovali v 4% paraformaldehyde pri 4°C ( pH 7,2 ) v ktorom boli uložené celú noc pri 4°C v chladničke. Na druhý deň boli sklíčka s bunkovou kultúrou opláchnuté v PBS ( pH 7,4 ) 1 krát 10 minút. Potom boli sklíčka inkubované 10 minút v 70% etanole. Ďalej v 80% etanole 15-30 minút a následne 96% etanole 30-60 minút. V ďalšom kroku boli sklíčka prenesené do 100% etanolu kde sa inkubovali 60 minút. ( Lachema, Brno, Česká republika ). Ak sa v ten deň už sklíčka imunocytologicky nespracovávali ostali uložené pri teplote 4°C v 100% etanole do ďalšieho spracovania. Ak sa v ten deň bunky ďalej imunocytochemicky spracovávali, po inkubácii v 96% etanole sa sklíčka opláchli v PBS a nasledovalo samotné imunocytochemické farbenie buniek.

#### **4.2.1.7. Imunocytochemické spracovanie preparátov**

-Na imunocytochemické spracovanie sme použili imunocytochemickú súpravu Santa Cruz Biotechnology Inc. ( Santa Cruz USA ). Bunky boli spracované podľa pracovného návodu podľa ktorého bolo predpísané pracovať zo súpravou. V rámci imunocytochemického spracovania sme na identifikáciu buniek produkujúcich proteín BAX použili protilátku anti-BAX a protilátku anti- ASK-I , anti- p53, anti Bcl-2, Po zafarbení sme pod mikroskopom spočítali zafarbené bunky a percentuálne vyhodnotili počet zafarbených k počtu nezafarbených buniek.

### **4.3.2. Druhá etapa**

#### **4.3.2.1. Diferenciácia excitačných typov teliat**

Manipulácia s teliatami prebiehala nasledovne:

- Po dovezení teliat do nových ustajňovacích priestorov nasledovalo 7 dňové adaptačné obdobie na nové podmienky. Po dovezení dostali zvieratá len napit'. Kŕmené senom a granulami boli až na ďalší deň. Seno a voda ad libidum, granule 2.5kg na den a kus rozdelené v dvoch dávkach ráno a večer.

- V prvom dni experimentu kontrolný-kľudový odber od všetkých zvierat medzi 8.00 – 9.00 hodinou rannou. Po odbere boli dva jedince, s ktorými sa v ten deň plánovalo experimentovať, oddelené do vedľajšieho koterca, kde mali prístup k vode a senu. Kŕmne granule nedostali. Ostatné zvieratá s ktorými sa v ten deň neexperimentovalo dostali aj granule.

- Zvieratá v prvom kroku experimentu boli vystavené rutinnému testu habituácie a testované v habituáčnej komore, kde zotrvali 20 min a merala sa intenzita prechodu štvorcov. Na základe týchto údajov sa stanovil excitačný typ zvierat'a. Habituáčna komora má štandardné parametre 16°C-20°C, 75%-80% vlhkosť vzduchu, je zvukotesná, štandardne osvetlená,

podlaha je rozdelená na rovnaké opticky zvýraznené štvorce ktorých veľkosť zhruba zodpovedá dĺžke tela zvierat'a. Pohyb zvierat'a v komore sa sleduje prostredníctvom web kamery. Pozorovateľ zaznamenával výsledky pozorovania vo vedľajšej miestnosti.

- Po habituácii bola zvieratám odobratá krv z vény juguláris a zviera bolo fixované na drevenej fixačnej doske 1,5 hod. Zviera bolo zvalené na svoj pravý bok na fixačnú dosku a pripútané koženými remeňmi v oblasti zápastia a predkolenia ďalej remeňom v hrudnej oblasti a remeňom tesne za hlavou. Pre zvýšenie stresového efektu boli zvieratám zakryté oči tkaninou.

Po 1,5 hodinovej fixácii sa zvierat'u znovu odobrala krv z véna juguláris a jedinec bol presunutý do ustajňovacích priestorov.

Za jeden stresor sa považoval pobyt v habituáčnej komore a ďalší fixácia na doske.

V priebehu vykonávania experimentov denne boli podrobené dva jedince habituácii a následne fixácii v dopoludňajších hodinách. Vybrané jedince boli zo skupiny ráno oddelené do susedného boxu kde nedostali kŕmne granule. Voda a seno bolo ad libidum.

#### **4.3.2.2. Spracovanie krvných vzoriek**

Krv teliat sa odoberala z vena juguláris hemoskou (jednorázová samonasávacía plastická odberka zo sterilnou ihlou). Krv po odbere sa nechala zrážať v chladničke pri 4°C a po 4 až 6 hodinách bola centrifugovaná pri 1200 ot za min 10 min. Potom z hemosky bolo odsaté sérum a zamrazené na -20°C. Takýmto spôsobom bola spracovaná krv po jednotlivých odberoch v priebehu experimentov.

#### **4.3.2.3. Spracovanie vzoriek imunoenzymatickým kvantitatívnym rozborom**

Vzorky séra od teliat som spracoval eliza testom. Na spracovanie IGF-I som použil súpravu Octeia Insulin like growth factor-1, IGF-I AC-27F1 ELISA (IDS Ltd. Boldon, England). Spracovanie vzoriek sa previedlo podľa príslušného pracovného návodu pre túto súpravu.

Meranie optickej absorbancie som robil na (Microplate Reader Model DV 990BV4, UniEquip Deutschland).

#### **4.4. Štatistické spracovanie**

Spracovanie výsledkov sme previedli pomocou štatistického počítačového programu Sigma Plot 2 Win a Excel.

Štatistické spracovanie sme previedli na základe:

- variačnej štatistiky
- smerodajnej odchýlky
- analýzou variancií
- korelácií
- t-test

Získané hodnoty boli zobrazené pomocou grafov a tabuliek.

Štatistická signifikantnosť :

p = alebo pod 0,05 \*, p = alebo pod 0,01 \*\*, p = alebo pod 0,001 \*\*\*.

## **5. DOSIAHNUTÉ VÝSLEDKY**

### **5.1. Prvá etapa: Vplyv p53 a ASK-I na vybrané ukazovatele**

5.1.1. Zmeny hladín sledovaného proapoptotického proteínu BAX a antiapoptotického proteínu Bcl-2 po transfekcii buniek p53

Počas stresovej záťaže organizmu nastávajú zmeny v bunkovom metabolizme. Bunky sú vystavené viacerým rizikovým faktorom, ktoré ich môžu poškodiť, alebo usmrtiť. Počas záťaže bunky aktivujú svoj metabolizmus na zabezpečenie navodenia pôvodných fyziologických podmienok - homeostázy. Tento proces je spojený s výdavkom energie

aktiváciou reparačných mechanizmov a vznikom rôznych metabolických komponentov, ktoré sú pre oslabenú bunku nebezpečné.

Z hľadiska rozvoja apoptózy v bunkách podľa dostupných literárnych zdrojov pozorujeme hromadenie určitých špecifických proteínov, ktoré sú zapojené do tohto procesu. Medzi proteíny, ktoré sú zapojené do rozvoja apoptózy patrí proteín BAX. Naopak pri prežívaní buniek a ich proliferácii sa aktivujú proteíny s antiapoptotickými vlastnosťami, medzi ktoré patrí Bcl-2.

V našom pracovnom modeli sme vychádzali z dostupných informácií o metabolických zmenách v bunkách vystavených záťaži. Dochádza k aktivácii proteínu p53, ktorého úlohou je zabezpečiť bunke dostatok času na odstránenie škôd vzniknutých záťažou. Proteín p53 je hlavne aktivovaný pri poškodení, ktoré vznikli na DNA. V prípade neopraviteľných porúch ďalšou funkciou p53 je navodiť v bunke apoptózu.

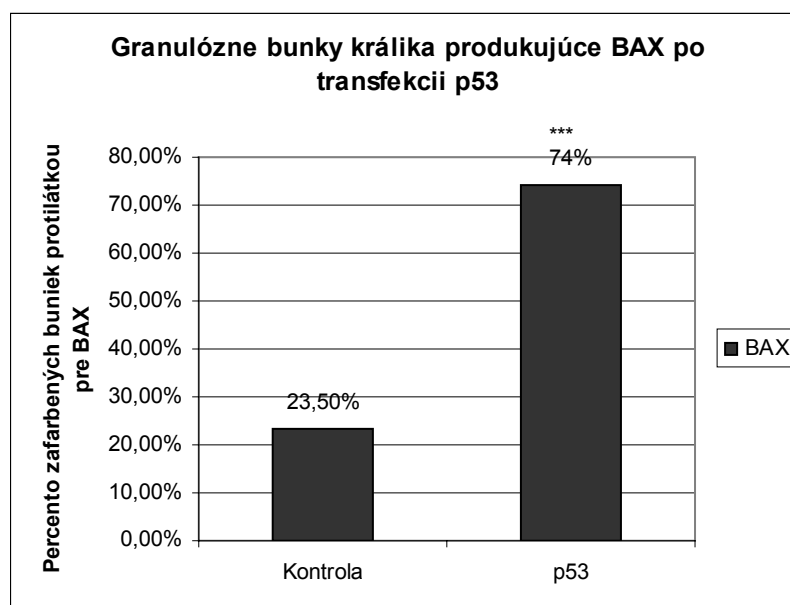
Testovaná granulózne bunky kráľika sme podrobili transfekcii s génovou konštrukciou nesúcou genetickú informáciu pre funkčný p53. Potom sme sledovali produkciu proteínu BAX a Bcl-2.

Po imunocytochemickom spracovaní buniek sme spočítali koľko percent buniek bolo zafarbených – teda obsahovali sledovaný proteín a dosiahli sme takéto výsledky.

### **Percento buniek produkujúcich proapoptotický proteín BAX v granulóznych bunkách kráľika po transfekcii p53.**

V bunkovej kultúre, v ktorej sme simulovali záťažovú situáciu respektíve stresovú situáciu zo zameraním na pôsobenie genotoxických stresorov vyvolávajújúcich poškodenie DNA a následnou hyperprodukciou p53. Pozorovali sme nasledovné zmeny hladín v produkcii proapoptotického proteínu BAX. Dosažené hodnoty sú uvedené v grafe č.1.

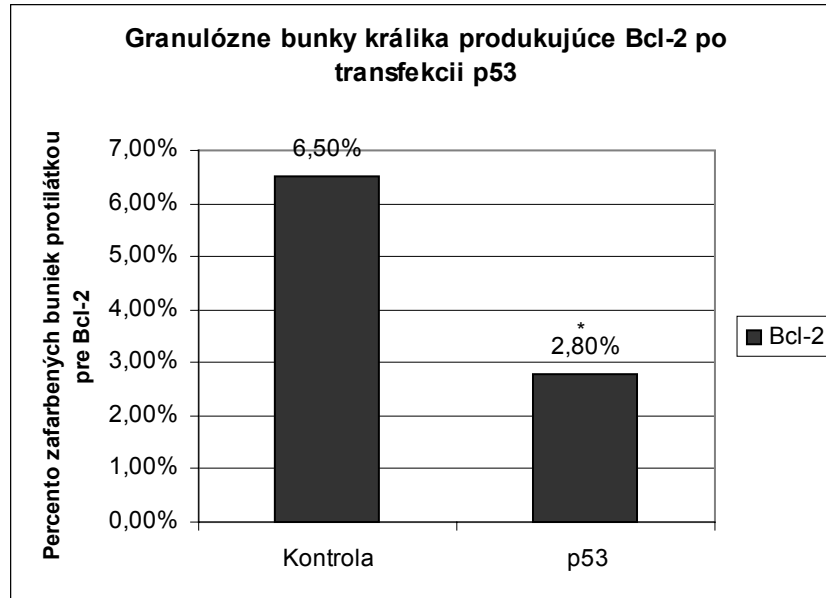
**Graf č.1.**



### Percento buniek produkujúcich antiapoptotický proteín Bcl-2 v granulóznych bunkách kráľíka po transfekcii p53.

Pri sledovaní bunkovej kultúry v ktorej sme simulovali záťažovú situáciu so zameraním na poškodenie DNA a následnou hyperprodukciou p53, dosiahli sme nasledovné zmeny v produkcii antiapoptotického proteínu Bcl-2. Výsledky sú uvedené v grafe č.2.

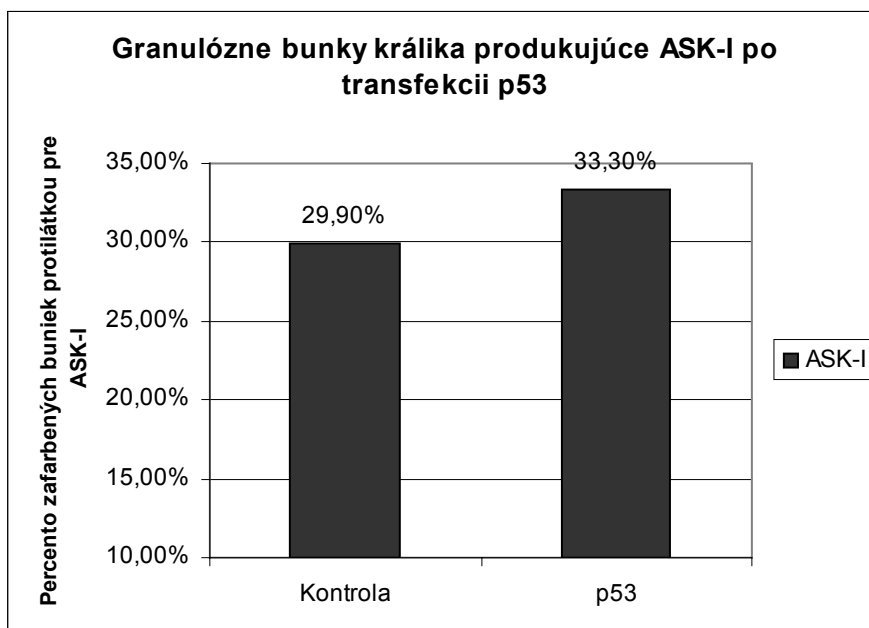
Graf č.2.



### Percento buniek produkujúcich proapoptotickú kinázu ASK-I v granulóznych bunkách kráľíka po transfekcii p53.

V experimentoch zameranom na produkciu ASK-I v bunkovej kultúre v ktorej sme navodili simulovanú záťažovú situáciu so zameraním na poškodenie DNA a následnou hyperprodukciou p53, dosiahli sme nasledovné zmeny v produkcii ASK-I uvedené v grafe č.3.

Graf č.3





### 5.1.2. Zmeny hladín sledovaného proapoptotického proteínu BAX a antiapoptotického proteínu Bcl-2 po transfekcii buniek ASK-I

ASK-I je v bunkách aktivovaná viacerými intracelulárnymi a extracelulárnymi signálmi. Z hľadiska rozvoja apoptózy v bunkách pozorujeme hromadenie určitých špecifických proteínov ktoré sú zapojené do tohto procesu. Medzi proteíny ktorý je spojený s rozvojom apoptózy patrí proteín BAX. Naopak pri prežívaní buniek a ich proliferácii sa aktivujú proteíny s antiapoptotickými vlastnosťami medzi ktoré patrí aj proteín Bcl-2.

V našom modeli ktorý sme zvolili na otestovanie efektov ASK-I na vybrané proteíny vo vzťahu k metabolickým zmenám v bunkách vystavených záťaži. Podľa dostupných literárnych informačných zdrojov, dochádza k aktivácii ASK-I, ktorej úlohou je aktivovať sa prostredníctvom extracelulárnych signálov prostredníctvom smrtiacich receptorov umiestnených na bunkovej membráne, alebo intracelulárnym signálom spojených so zvyšovaním oxidačných radikálov, vznikajúcich pri rôznych metabolických procesoch v bunke.

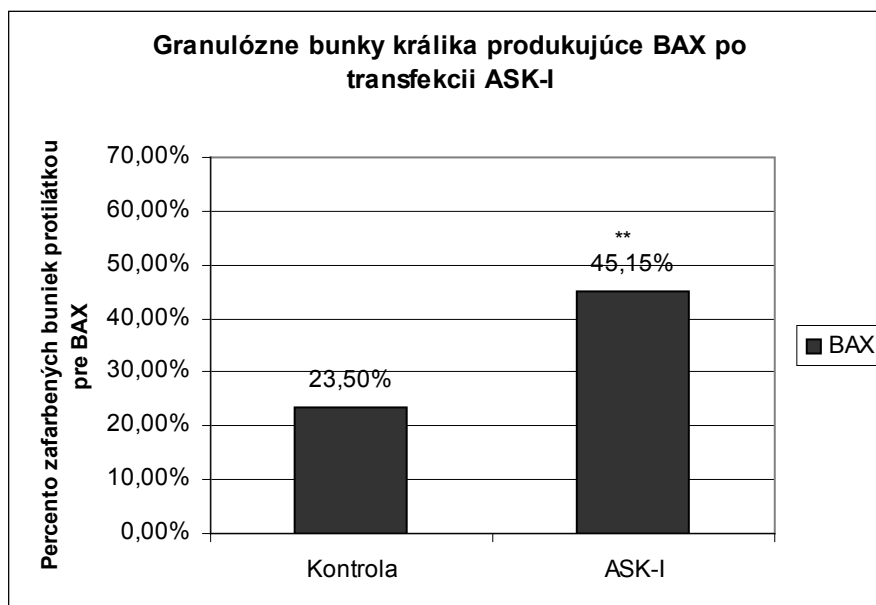
Testovaná granulózne bunky kráľika sme podrobili transfekcii s génovou konštrukciou nesúcou genetickú informáciu pre funkčnú ASK-I. Potom sme sledovali produkciu proteínu BAX a Bcl-2.

Po imunocytochemickom spracovaní buniek sme spočítali koľko percent buniek bolo zafarbených – teda obsahovali sledovaný proteín a dosiahli sme takéto výsledky.

#### **Percento buniek produkujúcich proapoptotický proteín BAX v granulóznych bunkách kráľika po transfekcii ASK-I.**

V bunkovej kultúre, v ktorej sme navodili záťažovú situáciu respektíve stresovú situáciu aktivovanú extracelulárnymi signálmi sprostredkovanú cez smrtiace receptori a intracelulárnymi signálmi aktivujúcimi oxidačný stres z následnou produkciou ASK-I, pozorovali sme zmeny v produkcii proapoptotického proteínu BAX graf č. 6.

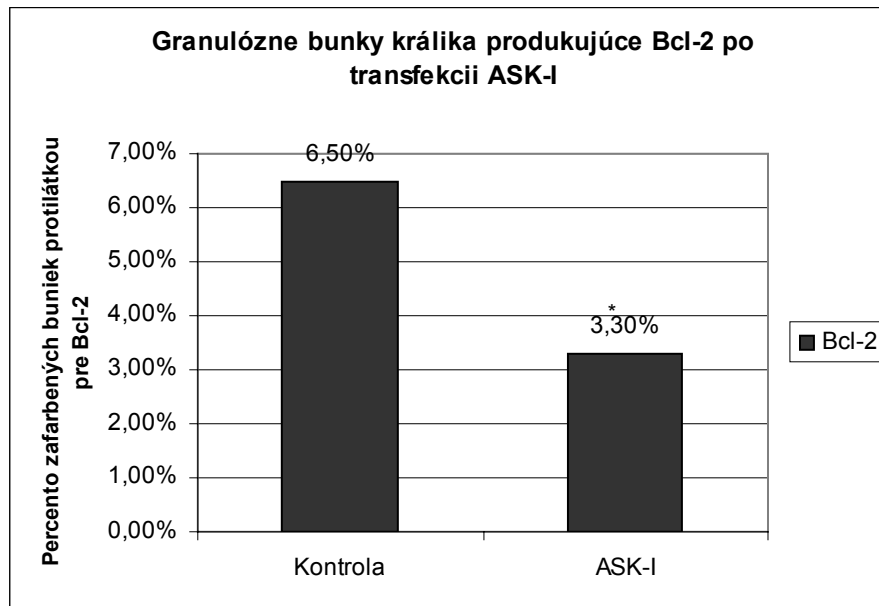
**Graf č.6.**



## Percento buniek produkujúcich antiapoptotický proteín Bcl-2 v granulóznych bunkách kráľíka po transfekcii ASK-I.

V bunkovej kultúre v ktorej sme umelo vytvorili záťažovú situáciu respektíve stresovú situáciu indukovanú extracelulárnymi signálmi sprostredkovanú cez smrtiace receptori a intracelulárnymi signálmi aktivujúcimi oxidačný stres z následnou hyperprodukciou ASK-I a pozorovali sme nasledovné zmeny v produkcii antiapoptotického proteínu Bcl-2 graf č. 8.

Graf č.8.



## 5.2. Druhá etapa: Hladiny IGF-I v sére teliat rôznych excitačných typov.

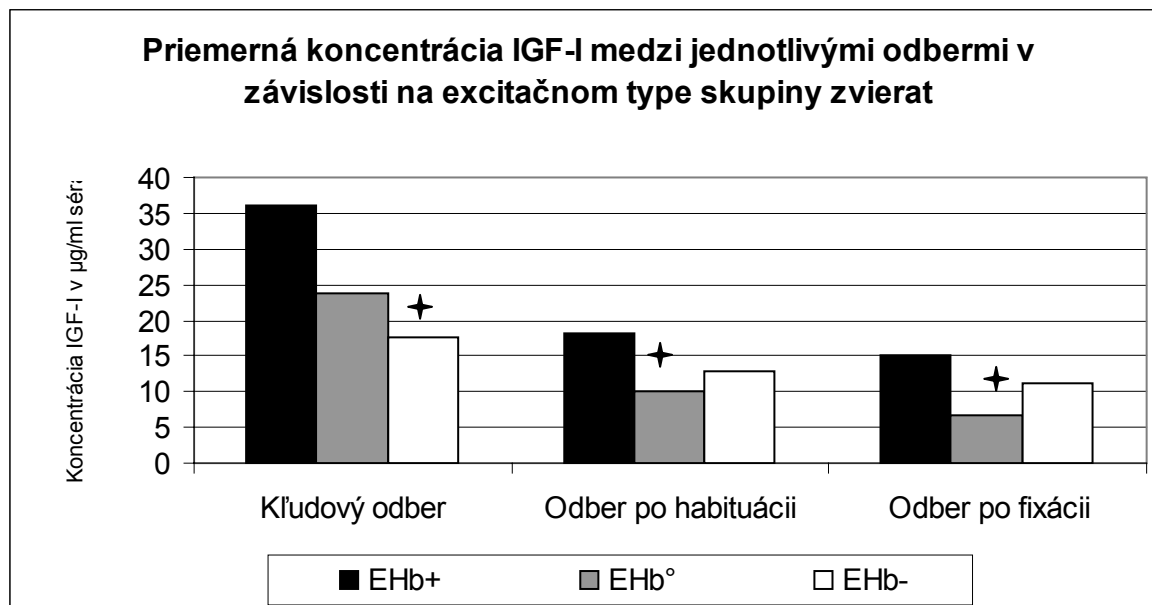
### 5.2.1. Diferenciácia excitačných typov teliat na základe IGF-I v sére diferencovaných po 20 minútového testu habituácie.

Rozdelenie zvierat podľa vzrušivosti ich nervovej sústavy do excitačných typov do kategórií EHb+, EHb-, EHb° sme previedli metódou diferenciácie excitačných typov podľa Debrecení a kol. (1990). Údaje pre diferenciáciu sme získali podľa počtu prejdenných štvorcov jednotlivých zvierat získaných v habituáčnej komore počas 20 minútového habituáčného testu.

### Priemerná koncentrácia IGF-I medzi jednotlivými odbermi v závislosti na excitačnom type skupiny zvierat po 20 minútovej habituácii.

Hodnoty priemerných koncentrácií IGF-I  $\mu\text{g/ml}$  medzi jednotlivými excitačnými skupinami teliat po 20 minútovej habituácii sú uvedené v tabuľke č.3. Najvyššiu priemernú kľudovú hodnotu koncentrácie IGF-I  $\mu\text{g/ml}$  dosahovali zvieratá zaradené do EHb+. Naopak najnižšiu priemernú kľudovú hodnotu IGF-I dosahovali zvieratá zaradené do EHb-. Najvyššia priemerná hodnota IGF-I v odberoch po habituácii bola u teliat EHb+ a najnižšia u teliat zaradených do typu EHb°. Priemerná hodnota koncentrácie IGF-I po fixácii bola u teliat EHb+, čo predstavovalo najvyššiu koncentráciu v porovnaní s EHb- a EHb° čo predstavovalo najnižšiu hodnotu. Grafické znázornenie priemerných hodnôt koncentrácie IGF-I medzi jednotlivými excitačnými typmi teliat po 20 minútovej habituácii a následnej fixácii je uvedená v grafe č.10.

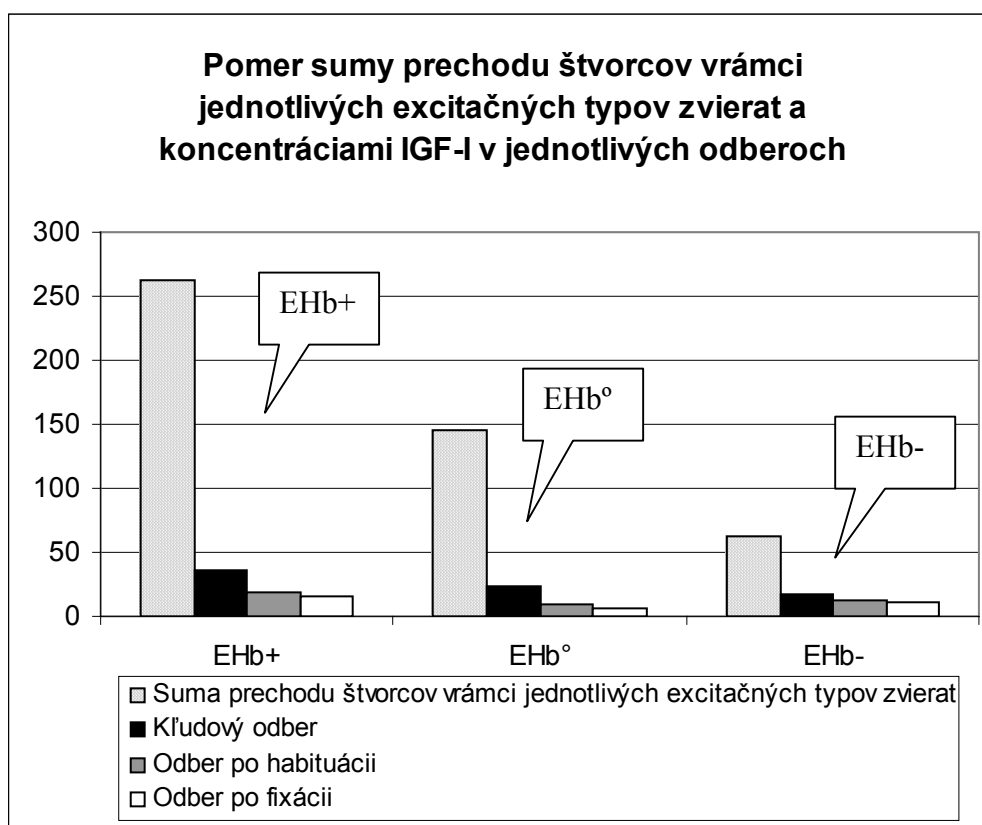
Graf č.10



5.2.2. Pomer sumy prechodu štvorcov vrámci jednotlivých excitačných typov zvierat a koncentraciami IGF-I v jednotlivých odberoch

V tejto kapitole hodnotíme pomer sumy prechodu štvorcov všetkých zvierat jednotlivých excitačných typov k priemernej hodnote kľudového odberu, odberu po habituácii a odberu po fixácii jednotlivých excitačných typov teliat rozdiferencovaných podľa 20minútového testu habituácie. Graficky sú hodnoty znázornené na grafe č. 18.

Graf č.18.



## 6. ZÁVERY K ROZVOJU VEDNEJ DISCIPLÍNY A PRÍNOS PRE PRAX

### Závery k rozvoju vednej disciplíny

Na základe zhodnotenia dosiahnutých výsledkov je možné urobiť nasledovné závery:

1. P53 viacerými mechanizmami inhybuje účinok IGF-I prostredníctvom jeho IGF-IR a IGFBP3.

Pri sledovaní antiapoptotického markérového proteínu Bcl-2 u buniek s hyperprodukciou p53 dochádza k jeho potláčaniu na polovičnú hodnotu v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Pri sledovaní proapoptotického markérového proteínu BAX u buniek s hyperprodukciou p53 dochádza k jeho trojnásobnému nárastu v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Transkripčný faktor p53 rozhodujúcim prvkom pre reguláciu IGF-I systému počas pôsobenia genotoxického stresu na bunku a v organizme.

2. Produkcia ASK-I v granulóznych bunkách kráľika po transfekcii p53 nebola štatisticky významne rozdielna v porovnaní s kontrolou. Vo všetkých experimentoch bola zistená mierne zvýšená produkcia ASK-I v skupine buniek s hyperprodukciou p53.

Z tohto vyplýva, že ASK-I pravdepodobne nie je regulovaná regulačným systémom signálnych dráh, ktorých je hlavným aktivátor p53.

3. Produkcia markérového proapoptotického proteínu BAX v granulóznych bunkách kráľika bola po transfekcii ASK-I signifikantne zvýšená. Produkcia antiapoptotického markérového proteínu Bcl-2 v granulóznych bunkách kráľika po transfekcii ASK-I bola signifikantne znížená.

ASK-I je aktivátorom mitochondriálnu formu apoptózy prostredníctvom aktivácie BAX a potlačenia Bcl-2. Avšak tieto regulačné systémy nie sú pravdepodobne spojené s proteínom p53.

4. Bazálne hladiny IGF-I u jednotlivých excitačných typov zvierat sú rozdielne.

Zvieratá z najvyššou motorickou aktivitou (EHb+) v teste habituácie mali aj najvyššie priemerné hladiny - kľudové 36 µg/ml, - po-habitučné 18,14 µg/ml, a po-fixáčné 15,22 µg/ml hladiny IGF-I v sére.

Zvieratá z najnižšou motorickou aktivitou EHb- mali aj najnižšie kľudové 17,68 µg/ml, hladiny IGF-I v sére.

Kľudová hladina cirkulujúceho IGF-I je najvyššia u teliat zaradených do EHb+ typu. Tento typ teliat sa dokáže najjednoduchšie adaptovať na zmeny v chovateľskom prostredí

Naopak kľudová hladina cirkulujúceho IGF-I je najnižšia u teliat zaradených do EHb- typu. Tento typ teliat sa ťažšie adaptuje na zmeny v chovateľskom prostredí a často už v bežných chovateľských podmienkach teliat trpí chronickými stresmi.

5. IGF-I je možné považovať za markér využiteľný na selekciu zvierat s predpokladmi dobrej adaptácie na záťažové podmienky na úrovni CNS, čo je z biologického aj chovateľského hľadiska najefektívnejšie riešenie.

Vyššie bazálne fyziologické hladiny IGF-I sú spojené s celkovou vyššou vitalitou organizmu. Znížené fyziologické hladiny IGF-I súvisia so zhoršeným zdolávaním záťaže, s rozvojom rôznych ochorení a celkovo zhoršenou vitalitou organizmu.

### Prínos pre prax

1. P53 môže byť použitý ako ukazovateľ obmedzenia účinku IGF-I v organizme prostredníctvom priameho účinku na jeho IGF-IR a IGFBP3.
2. ASK-I pravdepodobne nebude regulovaná regulačným systémom signálnych dráh, ktorých hlavným aktivátorom je p53.
3. ASK-I aktivuje kaskádu mitochondriálnej formy apoptózy prostredníctvom aktivácie BAX a potlačenia Bcl-2.
4. Poznanie regulačných mechanizmov počas záťaže na molekulárnej úrovni v bunke nám umožňuje aktívne usmerňovať metabolické procesy počas záťažových situácií v organizme a následne znižovať nepriaznivé vplyvy chovateľských podmienok na hospodárske zvieratá. Zámerom tejto práce bolo objasniť, či smer výskumu určenia IGF-I ako potencionálneho markéra pre stresu odolné zvieratá je vhodná.
5. Hlavným prínosom tejto práce je, na základe dosiahnutých výsledkov, objasnenie niektorých vnútrobunkových regulačných mechanizmov počas záťaže, a získanie teoretických ako aj praktických výsledkov pre stanovenie potencionálneho markéra IGF-I, na stanovenie stresovej záťaže odolných zvierat, delených podľa excitačných typov. Pre potvrdenie IGF-I, ako markéra stresu odolných zvierat, bude potrebné overiť tieto výsledky na väčších súboroch.
6. Výsledky dizertačnej práce dopĺňajú a verifikujú teóriu excitačných typov a vysvetľujú niektoré regulačné mechanizmy na molekulárnej úrovni počas pôsobenia záťaže.

## 7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. Butt, A. J., Firth, S. M., Baxter, R. C.: The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol*, 77, (3), Jun, 1999, s.256-262.
2. Debrecéni, O. a kol. : Etológia a adaptabilita hovädzieho dobytku. Nitra, 1988.
3. Debrecéni, O. a kol.: Etológia hospodárskych zvierat. Vydala Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra 2001.
4. Debrecéni, O. a kol.: Návod na praktické a seminárne cvičenia z etológie a adaptácie hospodárskych zvierat. Vydala Vysoká škola poľnohospodárska Nitre 1990.
5. Galvan, V., Logvinova, A., Sperandio, S., Ichijo, H., Bredesen, D. E.: Type 1 insulin like receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-I). *J. Biol. Chem.*, roč. 15, 2003., s.13325-32.
6. Grinberg, A.: P 53 and IGFBP-3: apoptosis and cancer protection. *Mol. Genet. Metab.*, 2000, jun, 70(2), s.85-98
7. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. And Gotoh, Y.: Induction of apoptosis by ASK-I, a mammalian MAP-KKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275, 1997, s.90-94.
8. Kovalčík, K.: Vplyv technológie chovu na etológiu a úžitkovosť hovädzieho dobytku. Doktorská dizertačná práca, Nitra, VÚŽV 1981, s.293.
9. Masopust, J. a kol.: Patobiochemie buňky, Univerzita Karlova v Praze 2.lékařská fakulta, (Fakulty dětského lékařství) . Praha 2003.
10. Matsuzava, A., Ichijo, H.: Molecular Mechanism of the Decision between Life and Death: Regulation of Apoptosis by Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1. *J. Biochem.* 130, 2001. s 1-8.
11. Mattson, M. P., Culmsee, C. and Yu, Z. F.: Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in

- stroke. *Cell Tissue Res.* 301, 2000. s 173-187.
12. Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H., LeRoith, D.: P53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology* 139, (3) Mar. 1998, s.1101-1107
  13. Uldrian, S., Kotala, V., Vojtěšek, B.: Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické Listy*, 96, 2002, s. 145-149.
  14. Waldmeier, P., C.: Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 27, April 2003, s. 303-321.
  15. Werner, H., Karnieli, E., Rauscher, F., LeRoith, D.: Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, August 1996, s.8318-8323.
  16. Zimmermann, K. C., Bonzon, C. and Green, D. R., The machinery of programmed cell death. In *Pharmacol. Ther.* 92, 2001. s 57-70.

## 8. PUBLIKOVANÉ PRÁCE

- Účast IGF-II a rozličných proteínkináz v regulácii proliferácie, apoptózy a steroidogenézy ovariálnych buniek.: Sanislo.P., Sirotkin. A., Schaeffer.H-J., Budáčová.A., Florkovičová.I., Petrák.J. V. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů Brno 2001.
- Vzájomné vzťahy ovariálnych folikulov in vitro sprostredkované inzulínu podobným rastovým faktorom typu I a oxytocínom. : Florkovičová.I., Sirotkin. A., Budáčová.A., Sanislo.P., Petrák.J. V. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů Brno 2001.
- Vplyv transkripčného faktora p53 na produkciu apoptotických proteínov zapojených do stresovej odpovede granulóznych buniek kráľika.: Petrák.J., Debrecéni.O. ŠVOČ 2003.
- Regulators of ovarian function.: Sirotkin. A., Makarevich. A., Grossman. R., Kotwica.J., Schaeffer.H-J., Marnet P-G., Kwon. H., Sanislo.P., Florkovičová.I., Petrák.J. Rafay. J., Pivko. J., Hetényi. L., in REgulation and evaluation of ovarian function and embryogenesis in normal and transgenic animals in vitro and in vivo. Publications of RIAP Nitra No. 8, 2003.
- Effect of hypergravity on catecholamine levels telemetrically collected blood of rats during centrifugation.: Kvetnansky. R., Petrák. J., Mravec. B., Tllinger. A., Jurani. M., Baranovská. M., Hapala. I., Frollo. I. *Journal of Gravitational Physiology.* 12, (1) July 2005.