

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
Katedra fyziológie živočíchov

Vplyv hypertermie na vývoj preimplantačných embryí hospodárskych
zvierat *in vitro*

Autoreferát dizertačnej práce
na udelenie akademického titulu „doktor“ („philosophiae doctor“)
v študijnom programe doktorandského štúdia biotechnológie v
študijnom odbore 5.2.25 biotechnológie.

Ing. Lucia Olexiková

Nitra, 2009

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre fyziológie živočíchov Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Lucia Olexiková
Katedra fyziológie živočíchov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Školiteľ dizertačnej práce: prof. MVDr. Juraj Pivko, DrSc.
Ústav genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat
Centrum výskumu živočíšnej výroby v Nitre

Oponenti: prof. RNDr. Michal Zeman, DrSc.
Katedra živočíšnej fyziológie a etológie
Prírodovedecká fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave

doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc.
Ústav genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat
Centrum výskumu živočíšnej výroby v Nitre

prof. MVDr. Imrich Maráček, DrSc.
Katedra anatómie, histológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

Autoreferát bol rozoslaný dňa.....

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra fyziológie živočíchov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertačnej práce sa koná dňa.....2009 ohod pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác doktorandského študijného programu biotechnológia v študijnom odbore 5.2.25 biotechnológie na FBP SPU v Nitre.

Miesto konania: Katedra fyziológie živočíchov - zasadačka
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre.

.....
prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.
predseda komisie

ABSTRAKT

Preimplantačné embryá sú citlivé na rôzne environmentálne vplyvy, ktorých pôsobenie môže vyvolať rôzne druhy poškodení až bunkovú smrť, čo znižuje efektivitu viacerých embryotechnológií. Jedným z takých vplyvov je pôsobenie zvýšenej teploty – hypertermia. Na základe doterajších poznatkov predpokladáme, že charakteristiky odpovede embryí na hypertermiu sú významné aj pri odpovedi na iné druhy stresu. Hypertermia môže byť považovaná za vhodnú modelovú situáciu pre skúmanie mechanizmov odpovede týchto embryí na stres, pri zohľadnení určitých odlišností jednotlivých druhov stresu. Cieľom našej práce bolo charakterizovať reakciu preimplantačných embryí králikov, ošípanej a hovädzieho dobytku na hypertermický stres, a úlohu proteínu Hsp 70 v adaptačnej reakcii preimplantačných embryí. Sledovali sme vývoj, výskyt bunkovej smrti (TUNEL), stav aktínového cytoskeletu (farbenie TRITC- phaloidínom), tvorbu proteínu Hsp 70 (Western- blotting) a zmeny ultraštruktúry významných bunkových organel (mitochondrie, tukové kvapky, jadierko a.i.) v odpovedi embryí na hypertermické podmienky *in vitro* a protilátku anti-Hsp 70. Zistili sme, že 6 hodinová expozícia embryí králikov, ošípanej a hovädzieho dobytku pri teplote 41,5 °C neovplyvňovala embryonálny vývoj a bola u králikov spojená s tvorbou proteínov Hsp 70. Avšak expozícia pri teplote 42,5 °C viedla k poškodeniam embryí, čo malo za následok pozastavenie preimplantačného vývoja embryí, zvýšenie výskytu bunkovej smrti, zníženie celkového počtu buniek a poruchy v štruktúre aktínového cytoskeletu. Tieto výsledky demonštrujú prah termotolerancie preimplantačných embryí králikov a HD k hypertermickým podmienkam *in vitro*. Navyše výsledky ukázali, že embryá králikov sú, pred aktiváciou embryonálneho genómu, citlivejšie na zvýšené teploty a blokovanie tvorby Hsp 70 vyvoláva u nich poruchy vývoja. Termorezistencia embryí v období po aktivácii embryonálneho genómu nebola úplne narušená blokovaním Hsp 70. Tieto výsledky naznačujú, že odolnosť embryí voči hypertermii pred aktiváciou genómu je spojená s určitou funkciou proteínu Hsp 70, zatiaľ čo v období po aktivácii genómu táto bielkovina pravdepodobne už nie je kľúčovým faktorom termotolerancie a predpokladá sa existencia iného (alebo iných) protekčných mechanizmov. Na základe preukazných zmien v ultraštruktúre bunkových organel u embryí pri blokovaní Hsp 70, možno uvažovať o určitom brzdení alebo pozastavení metabolických dráh a procesov obnovy u preimplantačných embryí. Pri blokovaní Hsp 70 nedochádza k reorganizácii štruktúry jadierka charakteristickej u buniek vystavených hypertermii. Hsp 70 sa teda zrejme zúčastňuje práve týchto reakcií v rámci jadierka aj keď ich podstata nie je presne objasnená.

Kľúčové slová: králik, ošípaná, hovädzí dobytok, embryo, hypertermia, Hsp70, apoptóza, aktín, ultraštruktúra.

ABSTRACT

Preimplantation embryos are sensitive to various environmental influences which may cause different sorts of damages and even cell death, what may reduce efficiency of several embryotechnologies. One of such factors is the influence of elevated temperature – hyperthermia. Basing on recent knowledge, we suppose, that characteristics of embryo response to hyperthermia are significant also in their response to other types of stress. Hyperthermia, with taking in to account some differences in various types of stresses may be considered as a relevant model for investigation of the mechanism of embryo responses to stress. The aim of our study was to characterize the reaction of preimplantation rabbit, porcine and bovine embryos to hyperthermic stress and to define a role of Hsp 70 in adaptation response of preimplantation embryos. We determined developmental stages, occurrence of cell death (TUNEL), state of actin cytoskeleton (phalloidin-TRITC), presence of heat-shock proteins Hsp70 (Western-blotting) and alterations in the ultrastructure of important cell organelles (mitochondria, lipid droplets, nucleolus a.o.) in response of embryos to hyperthermic conditions *in vitro* and addition of anti-Hsp 70 antibody. We found out, that 6 hour exposure of rabbit, porcine and bovine embryos at temperature 41.5 °C did not influence embryo development, and in rabbits it was associated with Hsp 70 production. Though exposure at the temperature 42.5 °C led to embryo damages, which resulted in developmental arrest, rise in cell death occurrence, decrease in total cell number and disruptions in actin cytoskeleton structure. These results demonstrate a threshold of thermotolerance of preimplantation rabbit and bovine embryos to hyperthermic conditions *in vitro*. Moreover, the results show that rabbit embryos prior to genome activation are more sensitive to elevated temperature, and Hsp 70 blockage causes developmental failures. Thermotolerance of embryos following embryo genome activation was not completely disrupted by the Hsp 70 blockage. These results indicate, that the resistance of embryos to hyperthermia prior to genome activation is related to Hsp70 function, whilst following genome activation, Hsp70 is not probably the key factor of thermotolerance and the existence of additional protective mechanism(s) is hypothesized. Basing on significant changes in ultrastructure of embryonal cell organelles, caused by the Hsp 70 blockage, we may suggest about certain inhibition or arrest of metabolic pathways and regeneration processes in preimplantation embryos. At Hsp 70 blockage, the structure of the nucleolus was not altered as it is typical for cells exposed to hyperthermia. Hsp 70 probably participates in these reactions within the nucleolus, although the matter of these processes is not clearly understood. **Key words:** rabbit, porcine, bovine, embryo, hyperthermia, Hsp 70, apoptosis, actin, ultrastructure.

POUŽITÉ OZNAČENIE

Bl – blasocysta

BRL – buffalo rat liver cells / bunky pečene potkana línie „buffalo“

BSA – bovine serum albumin / bovinný (hovädzí) sérový albumín

COC – kumulus oocytárny komplex

DAPI – 4',6 diamidino-2-phenylindole

ExBl – expandovaná blastocysta

FBS – fetal bovine serum / fetálne sérum HD

FSH – folikulo stimulačný hormón

HBl – hatching/ blastocysta uvoľňujúca sa zo *zona pellucida*

HCG – ľudský choriový gonadotropín

HD – hovädzí dobytok

hpc – hodín *post coitum*

HT – hypertermia

Hsp – heat shock proteins / proteíny teplotného šoku

IVF – *in vitro* oplodnenie

IVM – *in vitro* maturácia / dozrievanie

IVP – *in vitro* produkcia embryí

LH – luteinizačný hormón

MEM – minimálne esenciálne médium

PBS – fosfátom pufovaný fyziologický roztok

PMSG – pregnant mare serum gonadotropin

PVP – polyvinylpyrrolidon

SOF – synthetic oviductal fluid / syntetická tekutina vajcovodu

TALP – Tyrodov roztok obsahujúci albumín, laktát a pyruvát

TCM – tissue culture medium / kultivačné médium pre tkanivové kultúry

TEM – transmisná elektrónová mikroskopia

TUNEL – metóda detekcie mrtvych/ apoptotických buniek značením zlomov DNA za pomoci terminálnej transferázy a značených deoxynukleotidov

VB – vývojový blok

OBSAH

	ÚVOD.....	7
1	PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	8
2	CIEĽ PRÁCE	8
3	MATERIÁL A METÓDY.....	9
	3.1 Získavanie embryí kráľika <i>in vivo</i> po superovulácii.....	9
	3.2 Získavanie embryí ošípanej <i>in vivo</i>	9
	3.3 Získavanie embryí hovädzieho dobytká <i>in vivo</i>	10
	3.4 Produkcia embryí hovädzieho dobytká <i>in vitro</i>	10
	3.5.1 Experimenty I a IV.....	11
	3.5.2 Experiment II A, B.....	12
	3.5.3 Experiment III.....	12
	3.6 Imunocytochemické spracovanie embryí pre analýzu bunkovej smrti a cytoskeletu.....	12
	3.7 Spracovanie embryí pre detekciu Hsp 70 pomocou Western-blottingu.....	13
	3.8 Spracovanie embryí pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu (TEM).....	14
	3.9 Štatistická analýza.....	14
4	VÝSLEDKY.....	15
	4.1 Experiment I – Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí kráľika.....	15
	4.2 Experiment II A – Úloha Hsp70 v reakcii preimplantačných embryí kráľika na hypertermiu.....	15
	4.3 Experiment II B – Vplyv hypertermie a blokovania Hsp70 na ultraštruktúrálnu morfológiu preimplantačných embryí kráľika.....	17
	4.4 Experiment III – Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí ošípanej a úloha Hsp70 v reakcii embryí na hypertermiu.....	18
	4.5 Experiment IV – Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí hovädzieho dobytká.....	19
	4.6 Návrhy na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy.....	19
5	ZÁVER.....	20
6	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	21
7	PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU.....	22

ÚVOD

Gaméty a ranné embryá predstavujú základnú – potenciálnu jednotku reprodukcie. Embryonálny vývoj je zložitý a komplexný proces. Na úspešné ukončenie vývoja musí embryo prekonať sériu vopred naprogramovaných krokov, ktorých výsledkom je zmena jednobunkového organizmu na zdravého novonarodeného jedinca. Priebeh prvých niekoľko delení je obdobím veľmi citlivým na nepriaznivé vplyvy a zmeny v prostredí v ktorom sa embryo vyvíja. Vývojový potenciál každého embrya je determinovaný kvalitou a vývojovou kompetenciou zárodočných buniek z ktorých vzniká ale je ovplyvňovaný aj pôsobením prostredia. Tieto vplyvy môžu narušiť vitalitu bunky, ako aj celého embrya a jeho schopnosť ďalej sa vyvíjať a zapríčiniť embryonálne straty. Biotechnológie v reprodukcii majú za cieľ zvýšiť efektivitu a zlepšiť využiteľnosť prirodzeného reprodukčného potenciálu zvierat. Na tomto poli boli úspešne vyvinuté metódy využívajúce preimplantačné embryá. Stále je však potrebné riešiť problémy, ktoré efektivitu reprodukcie zhoršujú. Metódy zahŕňajúce embryá alebo embryotechnológie sa stretávajú s problémami zníženia vývojového potenciálu embrya vplyvom prostredia. Existencia embryí je možná len v prostredí ohraničenom relatívne úzkym rozpätím fyzikálnych a chemických faktorov, ktoré definujú fyziologické podmienky. Narušenie týchto fyziologických podmienok má vplyv na ranné embryá, znižuje ich životaschopnosť alebo spôsobuje degeneráciu a ich zánik. Straty sa tu prejavujú aj v ekonomickej oblasti, keďže sa jedná o pomerne vzácny a nákladný biologický objekt. Pre riešenie tohto problému je potrebné najprv dôkladne spoznať mechanizmy, prostredníctvom ktorých stresový faktor vplýva na embryo. Nemenej dôležité je poznanie súvislostí a mechanizmov, ktoré pôsobia ako ochrana embrya pred poškodením vplyvom stresu. Existujú poznatky, že tieto systémy nie sú statické a konštantné ale sa vyvíjajú spolu s postupom embryonálneho vývoja, pričom priebeh prvých niekoľko delení je obdobím najcitlivejším na stres. Z toho dôvodu je potrebné zamerať sa na štúdium celého priebehu vývoja preimplantačného embrya a objasnenie mechanizmov nadobúdania obranných schopností v procese embryogenézy. Táto práca vznikla s podporou projektu Ministerstva pôdohospodárstva SR RÚVV 06: **“Ochrana zdravotného stavu zvierat v jednotlivých fázach reprodukčného cyklu pri narušení stability prírodných systémov“**.

1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Embryo, ako každý živý organizmus, existuje v interakcii so svojim prostredím. Každé narušenie stability prostredia vplyva na embryo. Pritom sa môže jednať o zmeny pH, osmotického tlaku, toxické vplyvy rôznych chemických látok, rôzne formy žiarenia či zmeny teploty. Tieto fyzikálne a chemické vplyvy vyvolajú u embryí odpoveď na stres, ktorej súčasťou je zvýšená produkcia tzv. heat shock proteínov (Hsp). Zvýšená produkcia Hsp je univerzálnou reakciou bunky na rozličné formy stresu, nielen na teplotný stres. Takúto reakciu teda môže vyvolať široká skupina rôznych environmentálnych faktorov ako analógy aminokyselín, ťažké kovy, etanol, oxidačný stres a iné (Levinson a kol., 1980; Thomas a kol., 1982). Následky teplotného stresu pôsobiaceho na embryo závisia od teploty, dĺžky expozície, vývojového štádia a živočíšneho druhu embrya. Charakteristiky odpovede embryí na hypertermiu sú významné aj v odpovedi na iné druhy stresu. Hypertermia môže byť považovaná za vhodnú modelovú situáciu pre skúmanie vplyvu stresu na preimplantačné embryá a odpoveď týchto embryí na stres, pri zohľadnení určitých odlišností jednotlivých druhov stresu (Hansen, 2007).

2 CIEĽ PRÁCE

Experiment I – Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí

kráľika

Cieľom prvej série pokusov bolo sledovať vplyv hypertermie (dvoch odlišných teplôt 41,5 °C a 42,5 °C) počas 6 hod na vývoj, výskyt bunkovej smrti, stav aktínových mikrofilamentov cytoskeletu a indukciu proteínu Hsp 70 u preimplantačných embryí kráľika.

Experiment II A – Úloha Hsp70 v reakcii preimplantačných embryí kráľika na hypertermiu

Cieľom bolo skúmať úlohu Hsp 70 v reakcii preimplantačných embryí kráľika na hypertermiu v období pred alebo po vývojovom bloku. Sledovali sme vývoj, výskyt bunkovej smrti (apoptózy) a stav aktínového cytoskeletu u preimplantačných embryí kráľikov kultivovaných pri teplote 41,5 °C v prítomnosti alebo bez anti-Hsp 70 pridanej buď v 4 až 8-bunkovom štádiu (pred vývojovým blokom) alebo v štádiu moruly (po vývojovom bloku).

Experiment II B – Vplyv hypertermie a blokovania Hsp70 na ultraštruktúrnú morfológiu preimplantačných embryí kráľika

Cieľom pokusov bolo sledovať zmeny ultraštruktúry významných bunkových organel (mitochondrií, Golgi komplexu, tukových kvapiek, jadierka a.i.) v odpovedi embryí na

hypertermické podmienky *in vitro* a prítomnosť protilátky anti-Hsp 70 u preimplantačných embryí kráľika.

Experiment III – Úloha Hsp70 v reakcii preimplantačných embryí ošípanej na hypertermiu

Cieľom bolo skúmať úlohu Hsp 70 v reakcii preimplantačných embryí ošípanej na hypertermiu. Sledovali sme vývoj, výskyt bunkovej smrti (apoptózy) a stav aktínového cytoskeletu u preimplantačných embryí ošípanej kultivovaných pri teplote 41,5 °C v prítomnosti alebo bez anti-Hsp 70.

Experiment IV – Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí hovädzieho dobytká

Cieľom pokusov bolo sledovať vplyv hypertermie (dve odlišné teploty 41,5 °C a 42,5 °C) počas 6 hod na vývoj, výskyt bunkovej smrti a celkový počet buniek u preimplantačných embryí HD.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Získavanie embryí kráľika *in vivo* po superovulácii

Preimplantačné embryá v štádiu kompaktnej moruly boli získavané *in vivo* od kráľikov plemena Novozélandské biele. Tri dni pred párením, boli samice kráľikov superovulované i.m. injekciou PMSG (Werfaser, 80 IU, ALVETRA & WERFFT AG, Viedeň, Rakúsko). Následne po 72 h od PMSG, im bol injekčne podaný HCG (Werfacher, 150 IU, ALVETRA & WERFFT AG). Samice boli pripustené a druhý deň (cca 19 hpc), po porážke bolo realizované vyplavenie embryí z materníc, pufrovacím roztokom PBS (pH 7,2) s 10 % FBS (BioWhittaker, Verviers, Belgicko). Po ohodnotení kvality embryí, boli vyselektované vhodné embryá pre experimenty v hypertermickom prostredí. Embryá boli kultivované v médiu k-DMEM (Gibco, Invitrogen, Auckland, Nový Zeland) doplnenom o 10 % FBS (BioWhittaker) pri 37,5 °C v CO₂ inkubátore do požadovaného štádia.

3.2 Získavanie embryí ošípanej *in vivo*

Prasničky plemena Slovenská Biela vo veku 6 mesiacov boli hormonálne stimulované aplikáciou gonadotropínov PMSG (1500 I.U., Sergón, Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR), po 72 hodinách bol aplikovaný HCG – 1000 I.U. (Werfacher, ALVETRA & WERFFT AG,) a 16 hodín po podaní HCG 1 ml Supergestranu (Lecirelinum 25 µg v 1 ml, Ferring-Léčiva, Praha, ČR).

Inseminácia nasledovala 24-36 hodín po podaní HCG. Prasničky boli porazené na bitútku 4. deň po podaní HCG a embryá boli získané vypláchnutím vajcovodov, roztokom PBS (pH 7,2) s 2 % FBS (BioWhittaker). Po ohodnotení kvality embryí, boli vyselektované vhodné embryá pre experimenty v hypertermickom prostredí. Embryá boli *in vitro* kultivované v médiu NCSU-23 (Petters a Wells, 1993) s 0,4 % BSA (Sigma -Aldrich, Steinheim, Nemecko), pri 37,5 °C v CO₂ inkubátore.

3.3 Získavanie embryí hovädzieho dobytká *in vivo*

Pre získanie embryí hovädzieho dobytká boli pripravené kravy donorky Holsteinsko-Frízského plemena. Kravy - donorky v dobrom zdravotnom stave boli superovulované medzi 10. a 12. dňom (v luteálnej fáze) *i.m.* podaním 24 mg FSH (Foliotropin inj. ad us. vet., Spofa, Praha, Česká Republika) podanými v sérii klesajúcich dávok, v 12 hodinových intervaloch, počas 4 dní. Estrus bol indukovaný dvomi *i.m.* aplikáciami 0.75 mg prostaglandínu F2 alfa, i.e. 750 µg cloprostenolum (Oestrophan inj. ad us. vet., Léciva, Praha, Česká Republika) ráno a večer na tretí deň ošetrenia FSH. Detekcia ruje bola vykonávaná dvakrát denne 24 hod. od prvého podania prostaglandínu F2-alfa. Kravy boli 2 krát umelo inseminované 12 a 24 hod. po prvom zistení ruje semenom býkov s preverenou oplodňovacou schopnosťou.

Embryá sme získali na 6. deň od zistenia ruje nechirurgickým výplachom maternice roztokom Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; pH 7,2) doplneným o 1% FBS (BioWhittaker). V roztoku sme embryá vyhľadali pomocou stereomikroskopu.. Ich kvalitu sme ohodnotili pri 100-násobnom zväčšení, podľa bežných kritérií vývojovej kompetencie a kvality (Pivko a kol., 2000; Wright, 1998) a iba kompaktné moruly a včasné blastocysty I. a II. triedy kvality sme použili pre pokus. Získané embryá sme *in vitro* kultivovali v kultivačnom médiu SOF (Minitüb, Tiefenbach, Nemecko) doplnenom o 5 % FBS (BioWhittaker), pri 37,5°C a 5 % CO₂ v inkubátore.

3.4 Produkcia embryí hovädzieho dobytká *in vitro*

Vaječníky boli získané od kráv zabitých na bitútku a prenesené v termoske pri teplote 26 až 30 °C do laboratória do 2-3 hodín po porážke zvierat. Z vaječníkov sme pomocou striekačky a ihly aspirovali folikulárnu tekutinu z folikulov veľkých 2-8 mm. Vo folikulárnej tekutine, na Petriho miske, sme vyhľadali kumulat-ocytárne komplexy. Po dôkladnom premytí boli prenesené do 4-jamkovej platničky s médiom TCM 199 s GlutaMAX -I (Gibco) s

pyruvátom sodným ($0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$, Sigma), gentamycínom (0,05 mg v ml, Sigma), 10 % FBS (BioWhittaker) a hormónmi FSH/LH (1/1 I.U., Pluset, Lab. Calier, Barcelona, Španielsko).

Na maturáciu boli použité iba oocyty s kompaktnými vrstvami kumulárnych buniek z 1. až 3. triedy kvality. Po 24 hodinovej *in vitro* maturácii sa vyhodnotilo dozrievanie oocytov. Pre *in vitro* oplodnenie maturovaných oocytov sme použili rozmrazené semeno býkov overených na oplodňovaciu schopnosť. Na prípravu semena býkov pre *in vitro* oplodnenie bola použitá modifikovaná Swim-up metóda. Na Bürkerovej komôrke bola stanovená hustota vzniknutej suspenzie a semeno bolo uložené do inkubátora až do použitia.

Po 24 hod. maturácii boli oocyty s expandovanými kumulárnymi bunkami 2x premyté v IVF-TALP médiu a prenesené do oplodňovacej kvapky (cca 25 oocytov na 1 kvapku o objeme 70 μl) prekrytej minerálnym olejom (Sigma) so spermiami v koncentrácii 1×10^6 v ml. Oplodnenie *in vitro* prebiehalo počas 20 h v inkubátore pri $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ v zvlhčovanej atmosfére s 5 % CO_2 .

Po uplynutí doby koinkubácie oocytov so spermiami sme predpokladané zygoty zbavili zvyškov spermii a kumulárnych buniek vortexovaním v médiu HEPES-TALP. Následne boli predpokladané zygoty prenesené do kultivačného média B2 (CCD Laboratories, Vernouillet, Francúzsko) na kultivačnej miske s monovrstvou BRL (Buffalo Rat Liver) buniek a boli kultivované do požadovaného vývojového štádia pri teplote $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ vo zvlhčovanej atmosfére s 5 % CO_2 .

3.5 Metodika a vyhodnotenie experimentov

3.5.1 Experimenty I a IV

Pre každý pokus bola každá kolekcia získaných embryí rozdelená na podskupinu pre vystavenie zvýšenej teplote – hypertermia (HT) a podskupinu bez tohto ovplyvnenia – kontrola. Embryá v pokusnej skupine (HT) boli kultivované v príslušnom kultivačnom médiu podľa druhu (v štádiu moruly) pri zvýšenej teplote $41,5^\circ\text{C}$ (resp. $42,5^\circ\text{C}$) v zvlhčovanej atmosfére s 5 % CO_2 počas 6 hodín. Po tomto čase boli prenesené do inkubátora s teplotou $37,5^\circ\text{C}$ a kultivované do času dosiahnutia štádia uvoľňujúcej sa blastocysty. Termostaty inkubátorov boli kalibrované tesne pred začatím pokusu a teplota bola overovaná ďalším nezávislým teplomerom. Kontrolná skupina bola kultivovaná v rovnakom kultivačnom médiu pri $37,5^\circ\text{C}$ v zvlhčovanej atmosfére s 5 % CO_2 do času dosiahnutia štádia uvoľňujúcej sa blastocysty, kedy bola kultivácia ukončená. Všetky embryá boli potom spracované, a boli vyhodnotené sledované parametre.

3.5.2 Experiment II

Embryá boli náhodne rozdelené do 4 skupín. U dvoch skupín bola do kultivačného média pridaná protilátka anti-Hsp70 v množstve 4 μ g/ml, a to buď v čase keď embryá dosiahli štádium 4 až 8 buniek, tj. pred vývojovým blokom (VB) alebo bola protilátka pridávaná až v štádiu moruly tj. po VB. Samostatne prebehli pokusy pred VB a po VB.

Embryá s prídavkom anti-Hsp 70 v štádiu 4 až 8 buniek boli následne kultivované pri 37,5 °C v zvlhčovanej atmosfére s 5% CO₂ do 72 hodín *post coitum* (hpc, embryá dosiahli štádium morula). V štádiu moruly boli potom dve skupiny (s pridaním a bez anti-Hsp 70) inkubované 6 hodín pri 41,5°C (hypertermické skupiny, 41,5°C a 41,5°C+anti-Hsp70) a zvyšné dve skupiny pri 37,5 °C (37,5°C - kontrola a 37,5°C+anti-Hsp70). Po skončení hypertermickej kultivácie boli embryá z týchto skupín prenesené do inkubátora s teplotou 37,5 °C a dokultivované do času dosiahnutia štádia uvoľňujúcej sa blastocysty (cca 120 hpc), kedy bola kultivácia ukončená, embryá boli spracované a boli vyhodnotené sledované parametre. V pokusoch, kde anti-Hsp 70 bola pridávaná v štádiu moruly nasledovala hypertermia hneď po 3 hodinách od pridane anti-Hsp 70 a ďalší postup bol rovnaký ako je uvedené vyššie. Takto ovplyvnené embryá z jedného pokusu (anti-Hsp 70 v štádiu moruly) boli pripravené pre TEM (**Experiment II B**).

3.5.3 Experiment III

U embryí ošípaných bola protilátka pridávaná len v štádiu moruly tj. po VB. Dve skupiny (s pridaním a bez anti-Hsp 70) boli inkubované 6 hodín pri 41,5 °C (HT skupiny, 41,5°C a 41,5°C+anti-Hsp70) a zvyšné dve skupiny pri 37,5 °C (37,5°C - kontrola a 37,5°C+anti-Hsp70). Po skončení hypertermickej kultivácie boli embryá z týchto skupín prenesené do inkubátora s teplotou 37,5 °C a dokultivované do času dosiahnutia štádia uvoľňujúcej sa blastocysty (cca 150 hpc).

3.6 Imunocytochemické spracovanie embryí pre analýzu bunkovej smrti a cytoskeletu

Po kultivácii boli embryá spracované pre detekciu výskytu bunkovej smrti na základe fragmentácie DNA pomocou TUNEL metódy. Imunocytochemicky boli označené cytoskeletové mikrofilamenty aktínu. Embryá, po ukončení kultivácie, boli dvakrát premyté v roztoku

polyvinylpyrrolidonu (PVP, Sigma) 5 mg / ml fosfátového pufru PBS a zafixované 10 minút v 3,7 % roztoku formalínu (pH 7,4). Po premytí v roztoku PBS – PVP nasledovala permeabilizácia v 0,5 % roztoku Triton X100 v PBS po dobu 5 min., po ktorej boli embryá znova premyté. Po blokovaní nešpecifických väzieb v 1 % roztoku BSA (Sigma) v PBS (20min) nasledovala aplikácia TdT-reagenčnej zmesi (TdT; MEBSTAIN Apoptosis kit Direct Immunotech-Coulter, Marseille, Francúzsko) počas 1 hodiny. Po premytí sa embryá zamontovali pomocou montovacieho média Vectashield obsahujúceho DAPI- 4',6 diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) medzi podložné a krycie sklíčka. Pre detekciu cytoskeletových filamentov aktínu boli embryá fixované a permeabilizované ako pre TUNEL. Značenie filamentov aktínu prebehlo inkubáciou v roztoku Phalloidinu konjugovaného s fluorescenčným farbivom Rodamine (Phalloidin-TRITC, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Takto pripravené vzorky sme vyhodnocovali pomocou fluorescenčného mikroskopu (Leica) s digitálnou kamerou DFC-480. Aktínový cytoskelet bol posudzovaný podľa Tharasanit a kol. (2005).

3.7 Spracovanie embryí pre detekciu Hsp 70 pomocou Western-blottingu

Pre detekciu proteínov Hsp 70 metódou Western-blottingu boli použité embryonálne lyzáty. Embryá (20 v skupine) boli vložené do 2x SDS lyzačného pufru s merkptoetanolom (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) a lyzované opakovaným pipetovaním a 3-násobným zmrazením a rozmrazením. Pred elektroforézou boli embryonálne lyzáty zahriate na 95 °C za stáleho miešania počas 5 min. a potom ochladené na izbovú teplotu.

Proteíny boli rozdelené pomocou gélovej elektroforézy (SDS-PAGE) v polyakrylamidovom géli (4% vyrovnávací gél a 10% rezolučný gél) pri konštantnom napätí 200 V metódou podľa Laemmli (1970). Z gélu boli prenesené na nitrocelulóзовú membránu porablot NCP (Macherey-Nagel, Duren, Nemecko) na aparátúre MiniTrans-Blot (Bio- rad Labs, USA). Blokované nešpecifických väzieb antigénov bolo uskutočnené inkubáciou membrány v 5 % roztoku BSA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) v TrisTBS (20 nM Tris-base, 137 nM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). Endogénnu peroxidázu sme blokovali inkubáciou v 3% roztoku peroxidu vodíka. Ako primárnu protilátku pre detekciu Hsp 70 (konštitutívnej aj indukovateľnej forme) sme použili monoklonálnu protilátku anti-Hsp 70 (MAB 3516, Chemicon) v riedení 1 : 250. Po hodinovej inkubácii s protilátkou bola membrána dôkladne premytá v roztoku Tris-TBS. Nasledovala inkubácia so sekundárnou protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s peroxidázou (Upstate Biotechnology, Temecula, CA, USA) v riedení 1:1000.

Vizualizácia signálu bola uskutočnená použitím detekčných reagentov Roti-Lumin (Carl Roth, Karlsruhe, Nemecko), ktoré reakciou s peroxidázou vyžarovali luminiscenčný signál. Vizualizácia tohto svetelného signálu sa uskutočnila expozíciou RTG – filmu (Hyperfilm, Amersham Life Science, Little Chalfont, UK).

3.8 Spracovanie embryí pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu (TEM)

Embryá selektované pre TEM, vybraté z kultivačného média, boli (3 x 5 min.) premyté v roztoku PBS-PVP (4 mg.ml⁻¹) a fixované 1 hod. v Karnovského fixačnom roztoku (2 % paraformaldehyd a 2,5 % glutaraldehyd v 0,15 mol.l⁻¹ kakodylanovom puffri, pH 7,1 – 7,3) pri teplote 4 °C a premyté v kakodylanovom puffri metódou podľa Karnovsky (1965). Následne boli zaliate do bločkov 4 % agaru a postfixované 1%-ným roztokom osmium tetraoxidu v kakodylanovom puffri 1 hod. Embryá boli dehydrované postupnou inkubáciou v rade etanolov so stúpajúcou koncentráciou až po absolútny etanol. Takto dehydrované embryá boli presýtené a zaliate do zalievacej hmoty Durcupan ACM (Fluka, Buchs, Švajčiarsko) v želatínových kapsliach a vytvrdené počas 48 hod. pri 60 °C. Pomocou LKB-Nova ultramikrotomu zhotovené ultratenké sériové rezy boli nanesené na niklové 150 mesh sieťky. Rezy boli kontrastované 10 % roztokom uranyl acetátu v absolútnom metanole a citrátom olova podľa Reynoldsa (1963). Sieťky boli prezerané na transmisnom elektrónovom mikroskope JEM 100 CX II, (Jeol, Japonsko) pri urýchľovacom napätí 80 kV a boli zhotovené negatívy s použitím filmov Kodak elektron microscope film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA), ktoré boli vyvolané 4 min. vo vývojke Kodak D-19. Po dôkladnom usušení boli vyvolané filmy skenované skenerom EpsonScan 490 Perfection.

Získané elektronogramy boli vyhodnotené metódou stereologickej analýzy metódou podľa Weibela (1963). Pomocou tejto metódy sme na snímkach charakterizovali zmeny v morfológii organel v blastomérach embryí kráľika vystavených hypertermickému prostrediu a protilátke anti-Hsp 70. Veľkosť jadierka sme merali a vyhodnocovali pomocou programu measureIT (Free measurment software, Soft Imaging System).

3.9 Štatistická analýza

Údaje z pokusov boli štatisticky spracované následne. Distribúcia embryí v skupinách v súlade vývojovými štádiami a kvalitatívnou triedou aktínu bola vyjadrená ako absolútna početnosť v skupine (n) a relatívna početnosť (v %) a rozdiely medzi skupinami boli ohodnotené

pomocou χ^2 -testu. Základné variačné štatistické charakteristiky parametrov embryí (počet TUNEL- pozitívnych buniek na embryo, celkový počet buniek a relatívne objemy jednotlivých organel) boli spočítané zvlášť pre každú skupinu a vyjadrené ako priemer (\bar{x}) \pm štandardná chyba strednej hodnoty (m). Rozdiely medzi skupinami boli ohodnotené t-testom (po predchádzajúcom overení zhody rozptylov F-testom). Pri štatistickej analýze bol použitý program Microsoft Excel.

4 VÝSLEDKY

4.1 Experiment I –Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí kráľika

V prvej sérii pokusov sme sledovali vplyv hypertermie, (41,5 °C a 42,5 °C) počas 6 hod na vývoj, výskyt bunkovej smrti, stav aktínového cytoskeletu a indukciu proteínu Hsp 70 u preimplantačných embryí kráľika. Bolo uskutočnených 5 samostatných pokusov kde celkovo bolo použitých 469 králičích embryí.

Western-blotting embryonálnych lyzátov, ukázal výraznejšiu proteínovú frakciu zodpovedajúcu Hsp 70 v skupine HT 41,5 °C oproti embryám v kontrolných podmienkach. V skupine HT pri 42,5 °C Western-blotting nepotvrdil prítomnosť teplom- indukovanej frakcie Hsp 70.

Hypertermické podmienky pri teplote 41,5 °C (6 h) neovplyvňovali významne vývoj embryí do najvyšších preimplantačných štádií. Dramatické zmeny vo vývoji embryí nastali pri zvýšení teploty na 42,5 °C. V tejto skupine sa embryá nevyvíjali do štádií XBl a HBl.

Teplota 41,5 °C nemala vplyv na výskyt TUNEL- pozitívnych buniek ani na TUNEL-index. V oboch skupinách mali všetky embryá aspoň jednu TUNEL (T)-pozitívnu bunku. Takisto hypertermia pri 41,5 °C neovplyvňovala bunkovú proliferáciu stanovenú na základe celkového počtu buniek. Pri zvýšení teploty na 42,5 °C sa embryá nevyvíjali do vyšších vývojových štádií a T- index aj počet T-pozitívnych buniek na embryo bol zvýšený, zatiaľ čo celkový počet buniek bol preukazne nižší v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Hypertermia 41,5 °C nespôsobila zmeny kvality aktínu (hodnotené subjektívne) u embryí, zatiaľ čo už spomínané zmeny vo vývoji a prítomnosti T- pozitívnych buniek v skupine HT 42,5 °C boli sprevádzané poruchami aktínového cytoskeletu (vytváranie zhlukov, neostré ohraničenie).

4.2 Experiment II A –Úloha Hsp70 v reakcii preimplantačných embryí kráľika na hypertermiu

V druhej sérii pokusov sme skúmali úlohu bielkoviny Hsp 70 v odpovedi embryí králik na hypertermické podmienky *in vitro*. Sledovali sme vplyv protilátky anti-Hsp 70 pridanej do kultivačného média na vývoj, výskyt bunkovej smrti a stav aktínového cytoskeletu u preimplantačných embryí králik. Protilátku sme pridávali do kultivačného média v odlišných vývojových štádiách, a to buď pred, alebo po vývojovom bloku. Bolo uskutočnených 7 samostatných pokusov, kde bolo použitých celkovo 257 preimplantačných králičích embryí.

Prídavok protilátky anti-Hsp 70 do kultivačného média za účelom blokovania proteínu Hsp 70 výrazne zhoršil vývoj preimplantačných embryí králik, v závislosti od štádia v ktorom bola protilátka pridaná. Ak bola protilátka pridaná v štádiu 4- až 8-bunkovom, teda pred aktiváciou embryonálneho genómu (vývojový blok, VB) bol vývoj do vyšších štádií úplne zastavený. Vystavenie týchto embryí hypertermickému prostrediu dodatočne zhoršilo vývoj, keď väčšina embryí nedosiahla ani štádium kompaktnej moruly.

Prídavok protilátky po prekonaní vývojového bloku, v štádiu včasnej moruly, ovplyvnil vývoj v menšej miere. Väčšina embryí sa vyvíjala do štádia kompaktnej moruly, až blastocysty. Časť z nich sa vyvíjala do vyšších vývojových štádií (skupiny po- VB 37,5 °C a po- VB 41,5 °C 20,0 % a 16,7 %).

Samotná hypertermia nevplyvala na proliferáciu, stanovenú ako celkový počet buniek blastocýst, rovnako neovplyvnila počet T- pozitívnych buniek ani T- index. Včasné a pokročilé blastocysty (Bl + ExBl + HBl), ktoré sa vyvinuli v skupinách anti-Hsp 70 po- VB mali nižší celkový počet buniek a zároveň bol zvýšený T- index.

V druhej sérii pokusov sme stav aktínového cytoskeletu hodnotili podľa systému popísaného na embryách koní v práci Tharasanit a kol. (2005), upraveného pre použitie u embryí králik. Embryá boli na základe vzhľadu aktínových filamentov rozdelené do troch tried kvality. Trieda I – výrazný, ostro ohraničený aktín, tvoriaci priestorovú sieťovitú štruktúru kopírujúcu okraje blastomér. Trieda II – blastoméry s kondenzovaným aktínom, bez ostrého ohraničenia v okrajoch. Trieda III – veľké plochy s chýbajúcim farbením aktínu, prípadne viditeľný aktín agregovaný do intracytoplazmatických zhlukov.

Pridanie protilátky anti-Hsp 70 v skorších štádiách pred VB, spôsobilo zväčšenie počtu embryí triedy kvality II a III (42,1 % a 47,4 % resp.). Ak boli tieto embryá zároveň vystavené hypertermii, väčšina z nich (64,7 %) bola zaradená do triedy III. Zmeny, vyvolané pridaním protilátky po vývojovom bloku, boli menej výrazné. Pri normálnej teplote prevládali embryá v triede kvality I (55,6 %) a za hypertermických podmienok sa rozšírila predovšetkým trieda kvality II (44,4 %).

4.3 Experiment II B – Vplyv hypertermie a blokovania Hsp70 na ultraštruktúralnu morfológiu preimplantačných embryí kráľika

Sledovali sme zmeny ultraštruktúry významných bunkových organel (mitochondrií, Golgi komplexu, tukových vezikúl, jadierka a.i.) u embryí kráľika vystavených hypertermii 41,5 °C počas 6 hod. a blokovaníu Hsp 70. Z každej skupiny boli pripravené ultratenké rezy z troch embryí a zhotovených 50 elektrónogramov pre hodnotenie ultraštruktúralnej morfológie cytoplazmatických organel pri primárnom zväčšení 7200- krát a 50 elektrónogramov pre hodnotenie plochy prierezu jadierka pri primárnom zväčšení 10 000- krát .

Hypertermia ani anti-Hsp 70 nemali preukazný vplyv na výskyt poškodení Golgi komplexu. U embryí vystavených hypertermii sme v cytoplazme pozorovali zvýšený objem tukových kvapiek a mitochondrií s prstencovými štruktúrami. U embryí vystavených pôsobeniu protilátky anti-Hsp 70 pri normálnej teplote v cytoplazme došlo k výrazným zmenám v morfológii mitochondrií, ktoré boli zväčšené, napučané, a ich celkový objem bol preukazne zväčšený. V cytoplazme došlo k zníženiu obsahu denzných teliesok a zvýšeniu objemu mitochondrií s prstencovými štruktúrami. V skupine embryí vystavených pôsobeniu protilátky anti-Hsp 70 a hypertermii rovnako došlo k výrazným zmenám v morfológii. Mitochondrie boli zväčšené a napučané. Preukazne sa zvýšil objem vezikúl s obsahom flokulentného materiálu a tiež tukových kvapiek a mitochondrií s prstencovými štruktúrami. V cytoplazme došlo k zníženiu obsahu denzných teliesok a vakuol. Celková organizácia cytoplazmy v skupinách s anti-Hsp 70 bola charakterizovaná oddelením častí cytoplazmy bez prítomnosti organel a častí s nahromadením bunkových organel.

U embryí vystavených hypertermii sme pozorovali výrazné zvýšenie prítomnosti bunkových úlomkov v perivitelinovom priestore a mierne zmeny v zastúpení mikroklkov na povrchu trofoblastových buniek. U embryí vystavených pôsobeniu protilátky anti-Hsp 70 pri normálnej teplote bolo zistené výraznejšie chýbanie mikroklkov na povrchu trofoblastových buniek. Takmer úplne vymizli mikroklky na povrchu trofoblastových buniek u embryí zo skupiny anti-Hsp 70 + HT. V perivitelinovom priestore sme tu nepozorovali výskyt bunkových úlomkov, čo sa značne líšilo od pozorovaní v HT skupine bez anti-Hsp 70.

U embryí vystavených hypertermii sme pozorovali preukazné zväčšenie priemernej plochy prierezu jadierka, zatiaľ čo v skupine vystavenej pôsobeniu protilátky anti-Hsp 70 bez hypertermie bola priemerná plocha prierezu jadierka preukazne menšia. Rozdiel vo veľkosti priemernej plochy prierezu jadierka medzi kontrolnou skupinou a skupinou anti-Hsp 70 + HT nebol preukazný.

4.4 Experiment III –Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí ošípanej a úloha Hsp70 v reakcii embryí na hypertermiu

Skúmali sme úlohu Hsp 70 v reakcii preimplantačných embryí ošípanej na hypertermiu. Sledovali sme vývoj, celkový počet buniek, výskyt bunkovej smrti a stav aktínového cytoskeletu u preimplantačných embryí ošípanej kultivovaných pri teplote 41,5°C v prítomnosti, alebo bez anti-Hsp 70. Bolo uskutočnených 7 samostatných pokusov, kde sme použili celkovo 155 embryí ošípaných.

Metódou Western-blottingu embryonálnych lyzátov, sa nám nepodarilo dokázať indukciu proteínov Hsp 70 v skupine embryí kultivovaných pri 41,5°C ani prítomnosť Hsp 70 v embryách kultivovaných v kontrolných podmienkach pri 37,5°C.

Vývoj embryí do vyšších preimplantačných štádií (expandovaná blastocysta – ExBl a blastocysta uvoľňujúca sa zo zóny, hatching – HBl) pod vplyvom zvýšenej teploty nebol štatisticky preukazne odlišný od kontroly. Výrazné zmeny vo vývoji nastali pri oboch teplotách, keď bola do kultivačného média pridaná protilátka anti-Hsp70. V týchto skupinách takmer polovica alebo väčšina embryí bola pozastavená vo vývoji v štádiu moruly. Do štádia ExBl sa vyvíjalo len malé množstvo embryí a žiadne embryo nedosiahlo najvyššieho štádia HBl.

Pomer embryí ktoré obsahovali aspoň jednu T- pozitívnu blastoméru pohyboval v rozmedzí od 82 do 96% z celkového počtu embryí pričom rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky preukazné. Hypertermia pri 41,5°C neovplyvňovala celkový počet blastomér, počet T- pozitívnych buniek na embryo ani T- index v porovnaní so štandardnou teplotou. Pridanie anti-Hsp 70 do kultivačného média spôsobilo preukazné zníženie počtu buniek a taktiež zvýšenie počtu T-pozitívnych buniek a T- indexu v skupinách s obidvoma teplotami. T- index bol zvýšený 2- až 3-násobne v porovnaní so skupinami bez prídania anti-Hsp 70.

V organizácii aktínu pri 41,5°C neboli pozorované výrazné poruchy. U embryí s blokováním Hsp70, či už pri zvýšenej alebo pri normálnej teplote, boli pozorované rovnaké poruchy štruktúry aktínu, čo sa prejavilo vo forme intracytoplazmatických zhlukov alebo absencie farbenia aktínu. Ďalší vývoj u týchto embryí bol pozastavený.

Aktínový cytoskelet bol u embryí ošípanej hodnotený rovnakým spôsobom ako u embryí kráľíka. Najväčší podiel embryí s aktínom triedy I a II bol zistený v skupinách oboch testovaných teplôt bez prídania anti-Hsp 70, a embryá s III. triedou aktínu buď predstavovali minimum (1 embryo v skupine 37,5°C) alebo vôbec nevyskytovali (41,5°C). V skupinách s protilátkou naopak

prevládali embryá s aktívom triedy III, a I. trieda bola predstavená počtom embryí v rozmedzí 6,9 až 14,8 %.

4.5 Experiment IV –Vplyv hypertermie na vývojovú kapacitu preimplantačných embryí hovädzieho dobytká

Skúmali sme vplyv hypertermie, (41,5 °C a 42,5 °C) počas 6 hod. na vývoj, výskyt bunkovej smrti a celkový počet buniek u preimplantačných embryí HD. Experiment prebehol v 4 samostatných pokusoch, pri ktorých bolo použitých celkovo 86 embryí HD, z čoho 66 bolo vyplavených *in vivo* a 20 získaných po oplodnení *in vitro*.

Hypertermické podmienky pri teplote 41,5 °C po dobu 6 h preukazne neovplyvňovali vývoj embryí do najvyšších preimplantačných štádií. Naopak teplota 42,5 °C preukazne ovplyvňovala vývoj preimplantačných embryí HD do vyšších vývojových štádií

Teplota 41,5 °C nemala vplyv na výskyt bunkovej smrti. V oboch skupinách mali všetky embryá aspoň jednu T- pozitívnu bunku. Počet T- pozitívnych buniek na embryo, ani pomer T-pozitívnych buniek k celkovému počtu buniek (TUNEL- index) sa neodlišovali medzi kontrolou a skupinou HT. Takisto HT pri 41,5 °C neovplyvňovala bunkovú proliferáciu stanovenú na základe celkového počtu buniek. Pri teplote 42,5 °C bol T- index aj počet T- pozitívnych buniek na embryo zvýšený, zatiaľ čo celkový počet buniek bol preukazne nižší v porovnaní s kontrolnou skupinou.

5 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

Predkladaná doktorandská dizertačná práca prispieva k poznaniu mechanizmov vplyvu environmentálnych faktorov na rast a vývin preimplantačných embryí niektorých druhov hospodárskych zvierat *in vitro*. V našich experimentoch sme potvrdili negatívny vplyv hypertermie (42,5 °C) na preimplantačné embryá kráľika a popísali termotoleranciu týchto embryí pri 41,5 °C. Tým sme rozšírili poznatky týkajúce sa tohto fenoménu, ktorým sa v rôznych ohľadoch, zaoberá množstvo odborníkov na celom svete o ďalší živočíšny druh, keďže doterajšie poznatky sa sústreďovali predovšetkým na embryá hovädzieho dobytká, ošípaných, oviec a myší. Reakcie králičích embryí pritom vykazujú niektoré podobné črty ako embryá hovädzieho dobytká, čo navádza k preskúmaniu možnosti ich použitia ako určitého modelu pre ďalšie výskumy s ohľadom na ich nižšiu ekonomickú náročnosť a lepšiu schopnosť znášať *in vitro* podmienky.

Práca tiež prináša originálne výsledky o ultraštruktúrálnej morfológii preimplantačných embryí po hypertermii a zmenách ultraštruktúry spojených so zablokovaním ochranných proteínov Hsp 70, keďže tieto javy boli doteraz študované na iných biologických tkanivách.

Nami získané poznatky vytvárajú základ pre ďalší výskum, ktorý by mal objasniť:

- úlohu Hsp 70 v zmenách morfológie v jadierku vznikajúcich počas hypertermie
- mechanizmy vedúce v preimplantačných embryách k vzniku termotolerancie aj pri blokovaní Hsp 70.

Tento výskum v konečnom dôsledku prináša poznatky pre zlepšenie odolnosti a prežívateľnosti embryí počas kultivácie *in vitro*, ako súčasti rôznych biotechnologických postupov asistovanej reprodukcie, využívajúcich preimplantačné embryá, ako je napríklad embryotransfér, mikromanipulácie a ďalšie, vrátane postupov humánnej *in vitro* fertilizácie. Uplatnenie získaných poznatkov v praxi podstatne zvyšuje prežívateľnosť a viabilitu raných embryí, čo výrazne zlepši ekonomickú efektívnosť produkcie embryí nielen *in vitro*, ale aj *in vivo*.

6 ZÁVER

Na základe dosiahnutých výsledkov experimentov môžeme usudzovať, že:

Expozícia embryí kráľika, ošípanej a hovädzieho dobytku (6h) pri teplote 41,5 °C neovplyvňovala embryonálny vývoj. U kráľika bola spojená s tvorbou proteínov Hsp 70.

Expozícia pri teplote 42,5 °C embryí kráľika a hovädzieho dobytku (6h) viedla k poškodeniam embryí, čo malo za následok pozastavenie preimplantačného vývoja embryí, zvýšenie výskytu bunkovej smrti, zníženie celkového počtu buniek a poruchy v štruktúre aktínového cytoskeletu.

Tieto výsledky demonštrujú prah termotolerancie preimplantačných embryí králikov a HD k hypertermickým podmienkam *in vitro*. Negatívny efekt hypertermie pri 42,5 °C môže súvisieť so zmenami v schopnosti embryí produkovať Hsp 70.

Embryá králikov sú pred aktiváciou embryonálneho genómu citlivejšie na zvýšené teploty, blokovanie tvorby Hsp 70 vyvoláva u nich poruchy vývoja. Termorezistencia embryí u ktorých došlo k aktivácii embryonálneho genómu nebola úplne narušená blokovaním Hsp 70. Tieto výsledky naznačujú, že odolnosť embryí voči hypertermii pred aktiváciou genómu je spojená s proteínom Hsp 70, zatiaľ čo po aktivácii genómu táto bielkovina pravdepodobne už nie je jediným faktorom termotolerancie a predpokladá sa existencia iného (alebo iných) protekčných mechanizmov.

Aktínový cytoskelet preimplantačných embryí králika a ošípanej je poškodzovaný teplotným stresom a blokováním Hsp 70. Výsledky naznačujú možnú súvislosť Hsp 70 s ochranou aktínového cytoskeletu, a to hlavne pred vývojovým blokom.

Na základe preukazných zmien v ultraštruktúre bunkových organel u embryí pri blokovaní Hsp 70, možno uvažovať o určitom brzdení alebo pozastavení procesov obnovy a metabolických dráh prebiehajúcich u preimplantačných embryí.

Pri blokovaní Hsp 70 nedochádza k reorganizácii štruktúry jadierka charakteristickej u buniek vystavených hypertermii. Hsp 70 sa teda zrejme zúčastňujú práve týchto reakcií v rámci jadierka aj keď ich podstata nie je presne objasnená.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

HANSEN, P.J. 2007. To be or not to be – Determinants of embryonic survival following heat shock. In *Theriogenology*, vol. 68, 2007, suppl. 1, p. S 40–S 48.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage and structure of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In *Nature*, vol. 227, 1970, no. 5259, p. 680–685.

LEVINSON, W. – OPPERMAN, H. – JACKSON, J. 1980. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. In *Biochimica et biophysica acta*, vol. 606, 1980, no. 1, p. 170–180.

PETTERS, R.M. – WELLS, K.D. 1993. Culture of pig embryos. In *Journal of reproduction and fertility. (Suppl)*, vol. 48, 1993, p. 61-73.

PIVKO, J. – GRAFENAU, P. – SOKOL, J. 2000. Prenos ranných embryí zvierat. Nitra : VÚŽV, 2000. 212 s. ISBN 80–7148–038–X

REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. In *The Journal of Cell Biology*, vol. 17, 1963, p. 208–212.

THARASANIT, T. – COLENBRANDER, B. – STOUT, T.A. 2005. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. In *Reproduction*, vol. 129, 2005, no. 6, p. 789–798.

THOMAS, G.P. – WELCH, W.J. – MATTHEWS, M.B. – J. R. FERAMISCO, J.R. 1982. Molecular and cellular effects of heat shock and related treatments of mammalian tissue culture cells. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 46, Pt. 2, 1982, p. 985–996.

WEIBEL, E.R. 1963. Principles and methods for morphometric study of the lung and other organs. In *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 12, 1963, p. 131–155.

PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch:

1. Makarevich, A.V., **Olexikova, L.**, Chrenek, P., Kubovicova, E., Freharova, K., Pivko, J. The effect of hyperthermia in vitro on vitality of rabbit preimplantation embryos. In *Physiological Research*, vol. 56, 2007, no. 6, p. 789-796.

2. Makarevich, A.V., Chrenek, P., **Olexikova, L.**, Popelkova, M., Turanova, Z., Ostro, A., Pivko, J. Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. In *Theriogenology*, vol. 70, 2008, no. 4, p. 675 – 681.

Vedecké práce v domácich vedeckých časopisoch:

3. Pivko, J., Makarevič, A. V., Kubovičová, E., Chrenek, P., **Olexiková, L.**, Slezáková M. Ultrastructural alterations in some organelles of bovine embryos exposed to bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in vitro. In *Slovak journal of animal science*, vol. 39, 2006, no. 4, p. 175-179.
4. **Olexikova L.**, Makarevič A.V., Chrenek P., Kubovičova E., Pivko J. Development of rabbit preimplantation embryos under thermal stress in vitro. In *Slovak journal of animal science*, vol. 40, 2007, no. 2, p. 63 – 65.
5. **Olexikova L.**, Makarevič A.V., Kubovičova E., Pivko J. The effect of antiserum to heat-shock proteins 70 (HSP 70) on the in vitro development of porcine embryos exposed to hyperthermia In *Slovak journal of animal science*, vol. 41, 2008, no. 3, p. 105 – 108.
6. Turanová, Z., Koprđová, L., Bauer, M., **Olexiková, L.**, Makarevich, A.V., Ostró, A., Zivcak, J., Chrenek, P. Quality of rabbit transgenic embryos. In *Slovak journal of animal science*, vol. 41, 2008, no. 3, p. 109 -112.

Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách:

7. **Olexiková, L.**, Makarevič, A.V., Chrenek, P., Kubovičová, E., Pivko, J. Úloha proteínov Hsp 70 v adaptačnej reakcii embryí kráľíka na hypertermické prostredie. In : *Biotechnology 2008* (zborník z medzinárodnej konferencie). České Budějovice, Jihočeská univerzita, 2008, p. 279 – 281, ISBN 80-85645-58-0
8. Turanová, Z., **Olexikova, L.**, Makarevič, A.V., Chrenek, P. Quality of rabbit transgenic embryos after vitrification. In : *Biotechnology 2008*. České Budějovice, Jihočeská univerzita, 2008, p. 405 – 407, ISBN 80-85645-58-0

Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách:

9. **Olexiková L.**, Makarevič A.V., Chrenek P., Kubovičová E., Pivko J. Vplyv hypertermie v podmienkach in vitro na vitalitu preimplantačných embryí kráľíkov. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, 9, Nitra, SPU, 2006 (Special Iss.- XII. Dni genetiky), s. 195-197, ISSN 1335-258X.
10. **Olexiková L.**, Makarevič A.V., Chrenek P., Kubovičova E., Pivko J. Pôsobenie hypertermie na preimplantačné embryá kráľíkov in vitro a úloha proteínov HSP70. In : *Zborník z vedeckého seminára s medzinárodnou účasťou VII. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov*. Nitra : SPU, 2007, s. 236-242, ISBN 978-80-8069-886-7
11. Ždilová V., Turanová Z., **Olexiková L.**, Koprđová L., Hredzák R., Makarevič A.V., Chrenek P. Králičie embryo ako model pre kryokonzerváciu embryí v humánnej asistovanej reprodukcii. In *Zborník prác z vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou 16. Schwarzov deň na tému Nové trendy v asistovanej reprodukcii*. Košice : UPJŠ, 2007, s. 21 -23, ISBN 978-80-232-0385-4
12. **Olexiková, L.**, Makarevič, A.V., Chrenek, P., Kubovičová, E., Pivko, J. 2008 Vývojové charakteristiky embryí kráľíka kultivovaných v hypertermickom prostredí: úloha Heat-Shock Protenu 70 (HSP 70) In *XXIII. Dni živočíšnej fyziológie* (Zborník referátov z XXIII. Dni živočíšnej fyziológie, Smolenice). s. 62, ISBN 978-80-968618-3-5

Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií:

13. Makarevich, A.V., **Olexikova, L.**, Chrenek, P., Kubovicova, E., Pivko, J. Response of rabbit preimplantation embryos on hyperthermic conditions in vitro. In : *Proceedings of the 3rd international conference of the veterinary research division*, NRC, Cairo, Egypt, 2006, p. 258-259.
14. Makarevich, A.V., **Olexikova, L.**, Chrenek, P., Kubovicova, E., Pivko, J. A Role of Hsp70 in response of rabbit pre-implantation embryos to hyperthermia. In *Reproduction in domestic animals* (abstract, 11th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, Celle, Germany) vol. 42, 2007, Suppl. 2, abstr. P110, p. 107.
15. Makarevich, A.V., Chrenek, P., **Olexikova, L.**, Slezáková M. Viability of rabbit gene-microinjected embryos cryopreserved using two vitrification schemes In *24th Annual Meeting A.E.T.E.*, Pau, France, 12.-13. september 2008, p. 202.
16. Makarevich, A.V., Olexiková, L., Kubovičová, E., Slezáková, M., Hegedušová, Z., Pivko, J. Blokage of Hsp 70 imairs porcine embryo development in vitro. In *Reproduction in domestic animals* (abstract, 12th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction) vol. 43, 2008, Suppl. 5, abstr. P96, p. 81.

Odborné práce publikované v odborných časopisoch:

17. Makarevič A.V., Pivko J., Kubovičová E., **Olexiková L.**, Louda F. Spôsoby hodnotenia kvality a životaschopnosti embryí hospodárskych zvierat. In *Agromagazín*. vol. 7, 2006, no. 6, p. 40-42.
18. Makarevič, A.V., **Olexiková, L.**, Pivko, J., Kubovičová, E., Chrenek, P. Parametre hodnotenia kvality embryí hospodárskych zvierat. In *Slovenský veterinársky časopis*. vol. 33, 2008, no. 2, p. 92 -93.
19. Makarevič A. V., **Olexiková, L.**, Pivko, J., Chrenek, P. Detekcia apoptózy ako nástroj pre určenie kvality embryí zvierat. In *Infonet*, vol. 15, 2008, no. 3, p. 126-129.

Ohlasy na vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch:

Citácie Makarevich AV, Olexikova L, Chrenek P, Kubovicova E, Freharova K, Pivko J. The effect of Hyperthermia in vitro on vitality of rabbit preimplantation embryos. In *Physiological Research*. vol. 56, 2007, no. 6, p. 789-796.

1. DE CASTRO E PAULA, L.A. – HANSEN, P.J. Modification of actions of heat shock on development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration and dithiothreitol. In *Molecular Reproduction and Development*. vol. 75, 2008, no. 8, p. 1338-1350.
2. MAMO, S. – GAL, A.B. – POLGAR, Z. – DINNYES, A. Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. In *BMC Molecular Biology*. vol. 9, 2008, p. 67.