

Wpływ stresu cieplnego na rozwój zarodków bydła we wczesnym okresie przedimplantacyjnym

RENATA WŁODARCZYK, MAGDALENA IZDEBSKA*,
ALINA GRZANKA*, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 52, 60-625 Poznań
*Katedra i Zakład Histopatologii i Embriologii Collegium Medicum UMK w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

Włodarczyk R., Izdebska M., Grzanka A., Jaśkowski J. M.

Influence of heat shock on the development of bovine embryos in the early preimplantation stage

Summary

This article presents the results of thermal stress on embryos exposed to heat stress during early preimplantation stage. The repercussions of heat stress are, among others, uterus hyperthermia, the inhibition of embryonic development and death. It seems that embryos are most frequently endangered or damaged by heat shock the early stage of development (2-4 cells), because during this period most embryonic genes remain inactive. Embryos at a more advanced stage of development are able to activate a range of mechanisms in order to protect embryonic cells against the destructive influence of heat shock. One of the defensive reactions activated by embryos is the increased secretion of antioxidants and HSP; i.e. Heat Shock Proteins. Apoptosis is a natural process activated as a response to heat shock, eliminating the damaged cells. Consequently, some embryos at the stage of ≥ 8 cells have developed mechanisms responsible for activating apoptosis, thus damaged cells go under selective and controlled elimination with omitting general necrosis. If damage concern a small number of embryonic cells, the embryo is still able to continue its development. Subtle biological mechanisms responsible for embryonic reaction to heat shock are still unknown. There are attempts to explain a part of them of through laboratory research.

Key words: bovine, embryo, heat shock

Ujemny wpływ podwyższonej temperatury otoczenia na płodność krów jest zjawiskiem znanym i opisywanym w wielu publikacjach (9, 22). W warunkach klimatu subtropikalnego i tropikalnego, a także latem w strefie klimatu umiarkowanego wywołuje przejściowy spadek płodności, przejawiający się obniżeniem zapłodnialności oraz zaburzeniami w sekrecji hormonów płciowych, dojrzewania pęcherzyków jajnikowych i przebiegu cyklu rujowego (22). U krów narażonych na stres cieplny dochodzi do pogorszenia jakości oocytów oraz wzrostu śmiertelności zarodkowej (3, 4, 27). Należy podkreślić jednak, że porównywanie procesów zachodzących w komórkach zarodków rozwijających się *in vivo* oraz w warunkach laboratoryjnych jest niemożliwe. Obserwuje się znaczące różnice w ekspresji genów ważnych w procesie rozwoju w zarodkach hodowanych *in vitro* oraz *in vivo* (12). Porównano grupę sześciu markerów genowych zaangażowanych w kompaktę, metabolizm, podatności na stres oraz przetwarzanie RNA w blastocystach bydłych rozwijających się *in vivo* oraz produkowanych *in vitro*. Ekspresja trzech spośród badanych genów (transportera glukozy 1, desmocollin 2 oraz plakophilin) była

znacząco wyższa w zarodkach rozwijających się *in vivo* w porównaniu do zarodków hodowanych *in vitro*. Podobnych różnic nie stwierdzono natomiast w ekspresji genów białka szoku cieplnego 70.1, E-kadheryny oraz poly(A) polimerazy (12). Rozwój zarodków *in vitro*, w określonych pożywkach i warunkach inkubacji przebiega odmiennie od analogicznych procesów zachodzących w jajowodach i macicy. Pełne odtworzenie specyficznego środowiska macicznego oraz subtelnych biochemicznych i fizjologicznych zależności istniejących pomiędzy organizmem matki a zarodkiem w warunkach stresu cieplnego nie zawsze jest możliwe. W niniejszym opracowaniu przedstawiono skutki stresu cieplnego w odniesieniu do zarodków bydła hodowanych *in vitro* i eksponowanych na działanie podwyższonej temperatury otoczenia we wczesnym okresie przedimplantacyjnym.

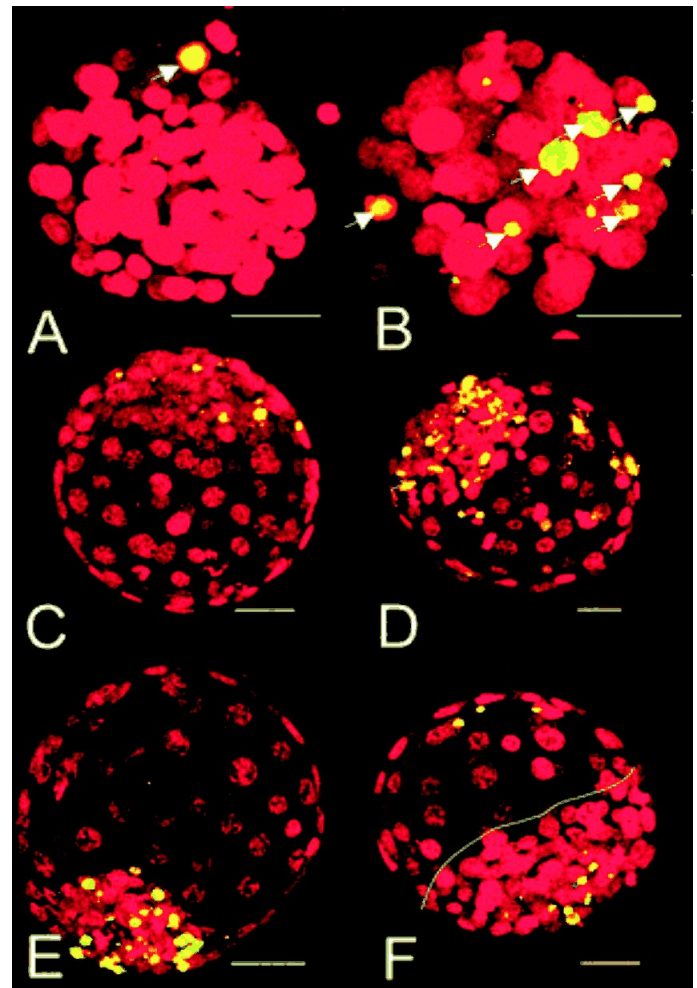
Stadium rozwoju zarodków

Przedimplantacyjny rozwój zarodkowy jest dynamicznym procesem, który obejmuje takie etapy, jak: namnażanie komórek, ich różnicowanie i śmierć. Procesy te są ściśle regulowane przez sygnały wymienia-

ne pomiędzy zarodkiem i środowiskiem macicznym. Przypuszcza się, że w efekcie działania podwyższonej temperatury otoczenia w warunkach *in vivo*, zaburzona zostaje synteza PGE₂, w konsekwencji nasileniu ulegają reakcje immunologiczne mające na celu eliminację zarodka (27). U przeżuwaczy, podczas wczesnej ciąży zarodek wytwarza interferon τ (IFN- τ), który przez oddziaływanie na receptory endometrialne hamuje wydzielanie hormonu luteolitycznego i zapewnia dalszą sekrecję progesteronu niezbędną do utrzymania ciąży. Wydaje się, że w warunkach stresu cieplnego śmierć zarodków może być spowodowana zaburzeniami w przebiegu hormonalnej wymiany sygnałów pomiędzy środowiskiem macicznym a zarodkiem (3, 27). Brak jest jednak bliższych danych odnośnie do ekspresji genu odpowiedzialnego za sekrecję interferonu τ oraz wytwarzania tej cytokiny przez kilkukomórkowe zarodki narażone na stres cieplny w warunkach *in vitro*.

Ekspozycja zarodków na działanie podwyższonej temperatury jest także bodźcem do powstawania w ich komórkach HSP 70 – białek szoku gorąca (heat shock protein). Proteina ta posiada przypuszczalnie zdolność odbudowy uszkodzonych białek oraz ochrony RNA zarodków podczas stresu termicznego (6). Według większości autorów, zarodek nabywa zdolność do syntezy HSP 70 dopiero w momencie aktywacji własnego genomu, przy czym najwcześniej obecność tego białka obserwowano w zarodkach 8-komórkowych (6). Zarodki we wczesnym stadium rozwoju (2-4 komórkowym) są najbardziej narażone na uszkodzenia spowodowane podwyższoną temperaturą, ponieważ w tym okresie większość genów zarodkowych pozostaje nieaktywna (6, 13, 17, 20). Z innych badań wynika jednak, że pod wpływem ostrego stresu cieplnego (42°C) do syntezy HSP 70 zdolne są również zarodki 2-komórkowe (4, 6). Ekspozycja dwukomórkowych zarodków na temperaturę 41°C spowodowała również wzrost odsetka skondensowanych jąder z 4,5% do 21,8% odpowiednio w grupie kontrolnej i doświadczalnej. Stres cieplny spowodował zablokowanie rozwoju zarodków w stadium 8-komórkowym. Swoją rozwój do stadium > 8-komórkowego kontynuowało jedynie 25% zarodków w porównaniu do 67% zarodków w grupie kontrolnej. O zablokowaniu rozwoju dopiero w stadium 8-komórkowym może świadczyć wysoki odsetek zarodków rozwijających się do stadium 2- oraz 4-komórkowego (odpowiednio w grupie kontrolnej i doświadczalnej 100% i 98% oraz 98% i 96%) (23).

Rolę mechanizmu kontroli, którego celem jest eliminacja uszkodzonych morfologicznie lub funkcjonalnie komórek odgrywa we wczesnym stadium rozwoju zarodka apoptoza (2, 21). Zmiany apoptotyczne są także jednym z mierzalnych skutków ekspozycji zarodków na podwyższoną temperaturę. Najbardziej popularną metodą wykrywania uszkodzeń powstałych m.in. pod wpływem działania wysokiej temperatury w za-



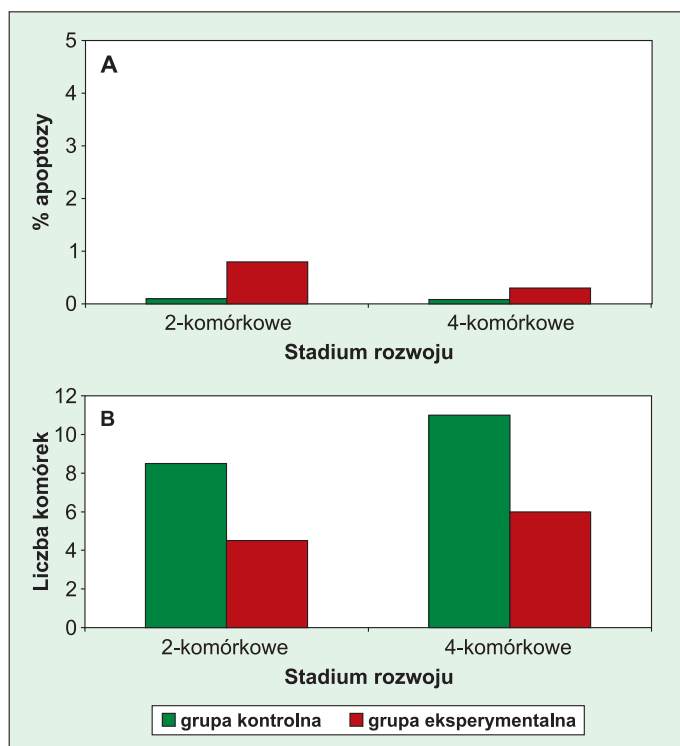
Ryc. 1. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający apoptozę w 7-dniowych zarodkach (10)

Objaśnienia: Chromatyna – obszar wybarwiony na czerwono przy pomocy jodku propidyny (PI), zdegenerowane jądra apoptotyczne – obszary wybarwione na zielono (pozytywny wynik reakcji TUNEL); A – morula z jednym skondensowanym jądrem apoptotycznym; B – morula z kilkunastoma jądrami apoptotycznymi; C, D – blastocysta z wieloma apoptotycznymi, skondensowanymi i pofragmentowanymi jądrami; E – blastocysta z apoptotycznymi jądrami tylko w wewnętrznej masie komórek (Inter Cell Mass – ICM); F – blastocysta, na której linią oddzielono ICM w celu ułatwienia liczenia jąder

rodkach jest TUNEL (TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin/digoxygenin nick end-labeling) (30).

Rycina 1 ukazuje obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający apoptozę w 7-dniowych zarodkach bydła. Komórki martwe (apoptotyczne) dające pozytywny wynik reakcji TUNEL, zabarwiają się na kolor zielony, natomiast komórki żywe (proliferujące), barwione jodkiem propidyny przyjmują zabarwienie czerwone (11, 16). Wynikiem reakcji TUNEL jest mikroskopowy obraz zarodka z wyraźnie zaznaczonymi miejscami degeneracji.

Zarodki we wczesnym stadium rozwoju (2-4-komórkowe), nie posiadające jeszcze zdolności do aktywacji mechanizmów apoptotycznych zamierają (21). Rycina 2 przedstawia zależność pomiędzy stadium rozwoju zarodków eksponowanych na działanie podwyż-



Ryc. 2. Zależność pomiędzy stadiem rozwoju zarodków eksponowanych na działanie podwyższonej temperatury a liczbą wszystkich komórek prawidłowych oraz liczbą komórek apoptotycznych powstałych na skutek działania podwyższonej temperatury (20)

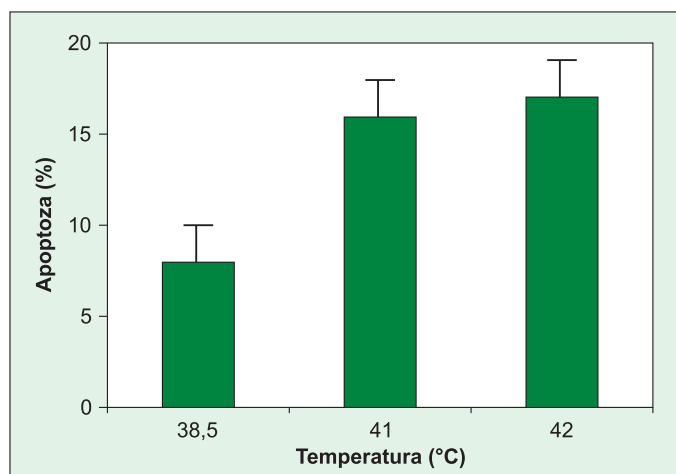
Objaśnienia: Grupa kontrolna – zarodki hodowane w temperaturze 38,5°C; grupa eksperymentalna zarodki eksponowane na działanie podwyższonej temperatury (40-41°C).

szanej temperatury a liczbą wszystkich komórek prawidłowych oraz liczbą komórek apoptotycznych, powstałych na skutek działania podwyższonej temperatury. Po 9-godzinnej ekspozycji zarodków w stadium 2- i 4-komórkowym na temperaturę 41°C obserwuje się istotne zmniejszenie liczby komórek zarodka, jednak zjawisku temu nie towarzyszy wzrost liczby komórek apoptotycznych (4, 5). Fakt ten wydaje się wskazywać, że zamieranie zarodków we wczesnych stadiach rozwoju w efekcie działania podwyższonej temperatury może mieć charakter procesu nekrotycznego.

Skutki działania stresu termicznego są istotnie mniejsze w bardziej zaawansowanym stadium rozwoju zarodków. Jak wynika z niektórych badań, ≥ 8 -komórkowy zarodek posiada już dobrze wykształcone mechanizmy aktywacji apoptozy, w związku z tym uszkodzone komórki ulegają selektywnej i kontrolowanej eliminacji, z pominięciem przebiegającej w niekontrolowany sposób uogólnionej nekrozy. Jeśli uszkodzenie dotyczy niewielkiej liczby komórek zarodka, to jest on zdolny do kontynuacji swego rozwoju (17).

Wysokość temperatury i czas ekspozycji

W wielu badaniach przedstawiano wpływ różnego czasu ekspozycji oraz wysokości temperatury na rozwój zarodków we wczesnym stadium przedimplantacyjnym (1, 4, 5, 21, 38). Modele doświadczalne obejmowały ocenę rozwoju, w warunkach *in vitro*, zarodków narażonych na działanie podwyższonej temperatury zarówno stałej, jak i zmiennej (5, 21, 25, 27, 28).

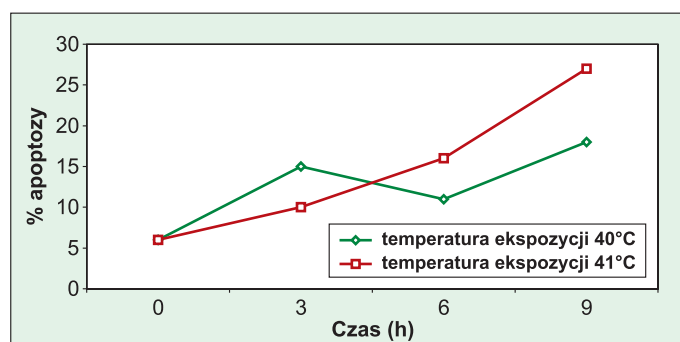


Ryc. 3. Nasilenie apoptozy w 16-komórkowych zarodkach bydła eksponowanych na działanie podwyższonej temperatury (20)

W badaniach wpływu podwyższonej stałej temperatury na rozwój zarodków w warunkach *in vitro* porównywano trzy zakresy temperatur stałych: 38,5°C – typową dla ciepłoty wewnętrznej bydła, 41°C – charakterystyczną dla łagodnego stresu cieplnego oraz 43°C – temperaturę tzw. ostrego stresu cieplnego (27).

Po ekspozycji na działanie temperatury 39°C i 41°C odsetek zarodków kontynuujących rozwój do stadium ≥ 16 -komórkowego znacznie się zmniejszył i wynosił odpowiednio 31,4% i 12,2% (5). Rycina 3 przedstawia nasilenie apoptozy w 16-komórkowych zarodkach bydła eksponowanych na działanie podwyższonej temperatury. Dziewięciogodzinna ekspozycja 16-komórkowych zarodków na stałą temperaturę 41°C oraz 42°C doprowadziła do wzrostu odsetka komórek apoptotycznych z 8,1% w kontrolnej grupie zarodków hodowanej w temp. 38,5°C do odpowiednio 16,0% oraz 17,3% (21).

Rycina 4 ilustruje zależność pomiędzy długością czasu ekspozycji na podwyższoną temperaturę a nasileniem apoptozy w 16-komórkowych zarodkach bydła. Reakcję TUNEL przeprowadzono w 5. dniu po in-



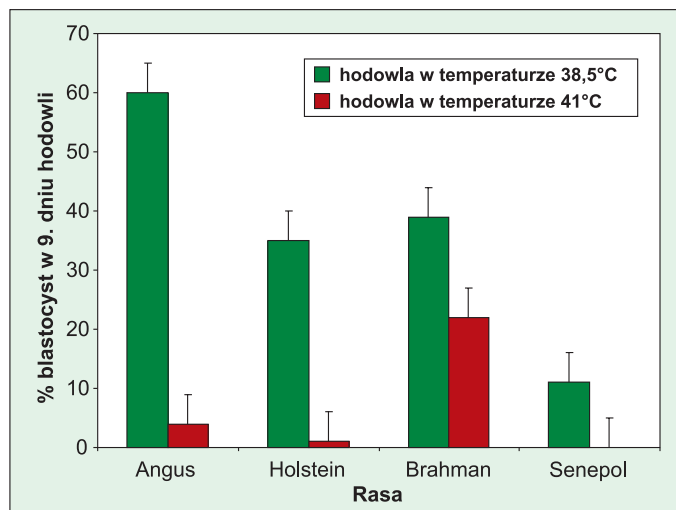
Ryc. 4. Zależność pomiędzy długością czasu ekspozycji na podwyższoną temperaturę a nasileniem apoptozy w 16-komórkowych zarodkach bydła (20)

seminacji, tj. 24 godziny po rozpoczęciu ekspozycji zarodków na podwyższoną temperaturę. Eksperyment przeprowadzono 4-krotnie, używając grup złożonych każdorazowo z 30-70 zarodków. Grupę kontrolną stanowiły 16-komórkowe zarodki hodowane przez 24 godziny w temperaturze 38,5°C. Także w tym przypadku ekspozycja zarodków na działanie temperatury: 40°C oraz 41°C spowodowała wzrost odsetka komórek apoptotycznych z 5,7% w grupie kontrolnej do odpowiednio 17,5% oraz 26,3% (21).

W nielicznych badaniach zarodki poddawano wpływowi podwyższonej, zmiennej temperatury. Kontrolną grupę zarodków hodowano w temperaturze 39°C przez 144 godziny. Temperatura, na jaką eksponowano zarodki z grupy eksperymentalnej wynosiła początkowo 39,5°C, a następnie – podczas 8 godzin – była stopniowo podwyższana o 0,19°C aż do osiągnięcia wartości 41°C. Następnie stopniowo ją obniżono i utrzymywano przez 12 godzin na poziomie 40,5°C. Hodowlę zakończono 12-godziną inkubacją w temp. 40°C. Ekspozycję według identycznego schematu przeprowadzono 2-krotnie, a następnie zarodki umieszczono w temperaturze 39°C na 96 godzin. Odsetek zarodków, które rozwinęły się do stadium \geq 8-komórkowego wyniósł po 72 godzinach 2% w porównaniu do 28,4% zarodków osiągających to samo stadium rozwoju w grupie kontrolnej. Po 144 godzinach hodowli odsetek zarodków, które rozwinęły się do stadium \geq 8-komórkowego wyniósł w grupie doświadczalnej 0,9% w porównaniu do 12,3% w grupie kontrolnej (28). Pod wpływem podwyższonej, temperatury dochodziło również do zmian w ultrastrukturze i morfologii komórek zarodków (25).

Stężenie tlenu i CO₂ w środowisku hodowlanym

W warunkach hodowli *in vitro* wzrost temperatury powoduje spadek stężenia CO₂ oraz obniżenie pH pożywki hodowlanej (25). Pod wpływem podwyższonej temperatury podobne zmiany mają także miejsce w środowisku macicznym. W warunkach *in vitro* wzrost stężenia CO₂ powoduje wzrost liczby przeżywających i prawidłowo rozwijających się zarodków (27). Na przeżywalność zarodków narażonych na stres cieplny w warunkach laboratoryjnych znacząco wpływa nie tylko stężenie CO₂ ale także koncentracja tlenu (24). Przy 5% stężeniu tlenu w pożywce hodowlanej ekspozycja zarodków na umiarkowany stres cieplny (38,5-41°C) powodowała śmierć 39,5% zarodków, podczas gdy zwiększenie zawartości tlenu do 20,95% zmniejszyło odsetek zamierających zarodków do 26,5% (24). W innych badaniach nie odnotowano znaczącego wpływu stresu cieplnego na stężenie tlenu na zewnątrz oraz wewnątrz osłonki przejrzystej. Natomiast zużycie tlenu, obliczone na podstawie różnicy jego stężenia na zewnątrz oraz wewnątrz osłonki przejrzystej, zmalało pod wpływem temperatury 41°C z 25,58% do 12,25% odpowiednio w grupie kontrolnej i doświadczalnej (23).



Ryc. 5. Wpływ stresu termicznego na rozwój zarodków bydła w zależności od rasy krów (18)

Różnice rasowe a wrażliwość na stres termiczny

Zagadnienie wrażliwości zarodków na stres termiczny jest znacznie mniej poznane w odniesieniu do ras bydła wykazujących wysoką tolerancję termiczną (20). W celu porównania stopnia wrażliwości na stres termiczny zarodków krów o wysokiej oraz niskiej tolerancji termicznej zarodki krów ras brahman, senepol, holstein i angus eksponowano na temperaturę 41°C przez 6 godzin. Zahamowanie rozwoju oraz zmniejszenie całkowitej liczby komórek zarodków stwierdzono u wszystkich badanych ras. Rycina 5 przedstawia wpływ stresu termicznego na rozwój zarodków bydła w zależności od rasy krów. Ujemny wpływ podwyższonej temperatury był znacznie większy w odniesieniu do zarodków krów holstein i angus niż brahman. Rozwój zarodków rasy senepol w warunkach hodowli *in vitro* był bardzo słaby nawet w temperaturze 38,5°C, dlatego ocena skutków ekspozycji na podwyższoną temperaturę nie była możliwa (20). Negatywne efekty ekspozycji na podwyższoną temperaturę (41°C przez 6 godzin) badano również w odniesieniu do zarodków ras brahman, romosinuano oraz angus (8). Największą różnicę pomiędzy odsetkiem zarodków rozwijających się do stadium blastocysty w grupach kontrolnej i eksperymentalnej zanotowano w przypadku krów rasy angus. Podczas hodowli w temperaturze 38,5°C odsetek ten wyniósł 30,5%, natomiast po hodowli w temperaturze 41°C uzyskiwano jedynie 4,8% blastocyst. Najwyższą oporność na działanie podwyższonej temperatury wykazały zarodki krów rasy romosinuano. W wyniku hodowli zarodków $>$ 8-komórkowych w temperaturze 38,5°C rozwój do stadium blastocysty kontynuowało 27,5% zarodków, natomiast w temperaturze 41°C odsetek ten wyniósł 17,8% (8). Prawdopodobnie krowy ras hodowanych w klimacie gorącym (brahman, senepol, romosinuano) posiadają gen kontrolujący wrażliwość komórek na stres termiczny, dzięki któremu ich zarodki wykazują naturalnie wyższą odporność na działanie podwyższonej temperatu-

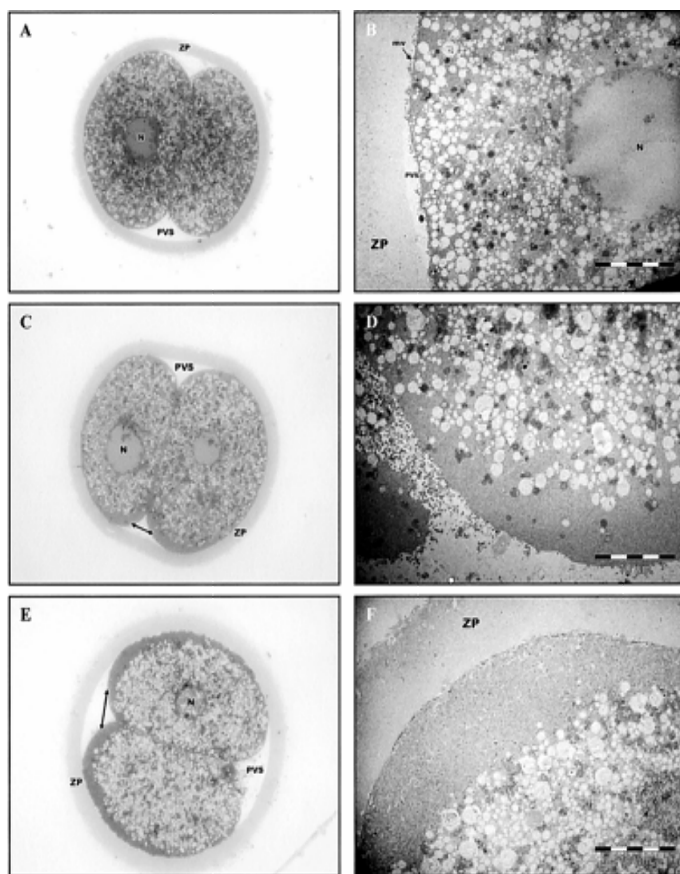
ry (20). Podobnej zależności nie stwierdzono w odniesieniu do 2-4 komórkowych zarodków rasy brahman, gdyż geny odpowiedzialne za termotolerancję ulegają ekspresji najwcześniej w stadium 8-komórkowym (14).

Wpływ podwyższonej temperatury na cytoszkielet komórek zarodków

Kluczową rolę w rozwoju zarodków oraz podziałach ich komórek odgrywa cytoszkielet (26). Jest to kompleks włókien białkowych rozciągniętych w cytoplazmie, koordynujący jej strukturę oraz ruchy. Cytoszkielet jest wysoce dynamiczną strukturą, która nadaje komórce formę trójwymiarową, kontroluje jej kształt, jak również przemieszczanie się organelli i segregację chromosomów. Cytoszkielet zbudowany jest z trzech typów włókien białkowych, którymi są: mikrofilamenty (zbudowane z aktyny), mikrotubule (zbudowane z tubuliny) oraz filamenty pośrednie. Elementy cytoszkieletu są bardzo wrażliwe na uszkodzenia spowodowane szokiem termicznym (26). W nielicznych badaniach oceniano wpływ podwyższonej temperatury na zmiany cytoszkieletu podczas mejozy zachodzącej w oocytach oraz podczas zapłodnienia i formowania zygoty. W oocytach narażonych na działanie łagodnego stresu termicznego (40-41°C) zaobserwowano zahamowanie mejozy w stadium metafazy I, anafazy I lub telofazy I, podczas gdy oocyty grupy kontrolnej nie narażonej na stres cieplny znajdowały się w fazie metafazy II. Oocyty z grupy eksperymentalnej nie zostały zapłodnione, względnie nieprawidłowo przebiegał proces formowania zygoty (26). Rycina 6 ilustruje anomalie kształtu oraz zmiany położenia organelli w komórkach zarodków związane z uszkodzeniem struktur cytoszkieletu pod wpływem działania podwyższonej temperatury. Zmiany te i zaburzenia – m.in. ruch organelli do centrum blastomeru, powiększenie odległości pomiędzy błonami jądrowymi – można obserwować przy pomocy mikroskopu świetlnego lub elektronowego (25).

Zapobieganie uszkodzeniom zarodków w warunkach *in vitro*

Zdolność do przeżycia zarodka narażonego na działanie stresu cieplnego zwiększa indukowana termotolerancja (1, 10, 21). W odpowiedzi na podwyższoną temperaturę otoczenia komórki zarodka produkują zwiększoną ilość białek szoku gorąca (HSP – Heat Shock Protein) oraz antyoksydantów (np. glutationu). Wydaje się, że ekspozycja zarodków na łagodny stres cieplny (39-40°C) jest bodźcem do wytworzenia substancji uodparniających komórki zarodka na działanie późniejszego, ostrego szoku termicznego (6). W warunkach hodowli *in vitro* istnieje możliwość ochrony komórek zarodka przed uszkodzeniami spowodowanymi podwyższoną temperaturą przez dodawanie do pożywki hodowlanej substancji ochronnych. Stres cieplny oddziałujący na komórkach zarodków powo-



Ryc. 6. Anomalie kształtu oraz zmiany położenia organelli w komórkach zarodków związane z uszkodzeniem struktur cytoszkieletu pod wpływem działania podwyższonej temperatury (24)

Objaśnienia: Preparaty oglądane w mikroskopie świetlnym (zdjęcia A, C, E) barwione przy użyciu błękitu toluidynowego oraz oglądane w mikroskopie elektronowym (zdjęcia B, D, F). Zarodki były hodowane przez 6 godzin w temperaturze 38°C (A i B), 41,0°C (C i D) oraz 43°C (E i F). Strzałki wskazują obszary cytoplazmy pozbawione organelli. ZP – zona pellucida, PVS – przestrzeń periwitelinowa, N – jądro, mv – mikrowłókna

duje dysfunkcję mitochondriów oraz aktywację enzymów odpowiedzialnych za powstawanie wolnych rodników. Rezultatem 6-godzinnej ekspozycji 2-komórkowych zarodków bydłowych na temperaturę 41°C był obrzęk mitochondriów spowodowany obniżeniem potencjału błon tych organelli. W wyniku zaburzenia funkcji błon mitochondrialnych w komórkach zarodków wzrastał poziom wapnia, a reaktywne formy tlenu powodowały otwarcie kanałów błonowych. Zachodziła również fosforylacja oksydacyjna blokująca syntezę ATP (adenosine triphosphate) w mitochondriach (23). Stwierdzono, że dodanie antyoksydantów do pożywki hodowlanej neutralizuje wole rodniki i zapobiega uszkodzeniom zarodków (5, 10, 25). Nowsze badania nie potwierdzają jednak takiego działania antyoksydantów. Dodanie do pożywki hodowlanej 100 µM witaminy E nie spowodowało zmniejszenia odsetka uszkodzonych zarodków. Po 9-godzinnej ekspozycji na temperaturę 41°C rozwój zarodków do stadium blastocysty obniżył się z 51,2% do 3,4% w grupie kontrolnej oraz z 54% do 5,2% w hodowli z dodatkiem

witaminy E (19). Również podanie antyoksydantów krowom narażonym na stres cieplny nie przeciwdziałała śmierci zarodków (9). Niewykluczone, że metodą hamowania apoptozy w dużej liczbie komórek zarodka, jest uzupełnianie pożywki hodowlanej o insulinozależny czynnik wzrostu (IGF-I Insulin Growth Factor) (16). Związek ten wykazuje silne działanie antyapoptotyczne i mitogeniczne. Dodatek IGF-I do hodowli zarodków w stadium blastuli spowodował znaczną redukcję blastomerów TUNEL pozytywnych (apoptotycznych) z 5% w grupie kontrolnej (hodowanej bez dodatku IGF-I) do 2,5% w grupie hodowanej w pożywce z dodatkiem IGF-I (16). Działanie ochronne wobec zarodków eksponowanych na podwyższoną temperaturę wywiera także rekombinowany bydlęcy hormon wzrostu – GH (rbGH) (13). W celu wykazania wpływu GH na częstość występowania apoptozy w zarodkach bydlęcych oceniono odsetek 8-dniowych zarodków, w których pojawiła się przynajmniej jedna komórka apoptotyczna. W przypadku hodowli prowadzonej bez dodatku GH odsetek ten wynosił 58%, natomiast w wyniku dodania GH do pożywki hodowlanej apoptoza wystąpiła w komórkach 21% zarodków (13). Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, negatywny wpływ wysokich temperatur na rozwój i przeżywalność zarodków bydlęcych we wczesnym okresie przedimplantacyjnym jest niewątpliwy. Biologiczne mechanizmy odpowiedzialne za reakcję zarodka na działanie wysokiej temperatury nie zostały jednak w pełni poznane. Część z nich próbuje się obecnie wyjaśniać w oparciu o badania przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

1. *Al-Katanani Y. M., Paula-Lopes F. F., Hansen P. J.*: Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 390-396.
2. *Beere H. M., Green D. R.*: Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 2001, 11, 6-10.
3. *Demmers K. J., Jabbour H. N., Deakin D. W., Flint A. P. F.*: Production of interferon by red deer (*Cervus elaphus*) conceptuses and the effects of rIFN- τ on the timing of luteolysis and the success of asynchronous embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.* 2000, 118, 387-395.
4. *Ealy A. D., Drost M., Hansen P. J.*: Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 2899.
5. *Ealy A. D., Lannett Howell J., Monterroso V. H., Adchiga C. F., Hansen P. J.*: Development changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants. *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 1401-1407.
6. *Edwards J. L., Hansen P. J.*: Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 46, 138-145.
7. *Edwards J. L., King W. A., Kawarsky S. J., Ealy A. D.*: Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of hsp70 and glutathione. *Theriogenology* 2001, 55, 209-223.
8. *Hernández-Cerón J., Chase C. C., Hansen P. J.*: Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 53-58.
9. *Jaśkowski J. M., Olechnowicz J., Urbaniak K.*: Letnia jałowość krów. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1323-1327.
10. *Ju J. C., Parks J. E., Yang X.*: Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 53, 336-340.
11. *Knijn H. M., Gjørret J. O., Vos P. L. A. M., Hendriksen P. J. M., Van der Weijden B. C., Maddox-Hyttel P., Dieleman S. J.*: Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1371-1378.
12. *Knijn H. M., Wrenzycki C., Hendriksen P. J. M., Vos P. L. A. M., Herrmann D., Weijden G. C. van, Niemann H., Dieleman S. J.*: Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. *Reproduction* 2002, 124, 365-375.
13. *Kolle S., Stojkovic M., Boie G., Wolf E., Sinowatz F.*: Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61, 180-186.
14. *Krinninger C. E., Block J., Al-Katanani Y. M., Rivera R. M., Chase C. C., Hansen P. J.*: Difference between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim. Reprod. Sci.* 2003, 78, 13-24.
15. *Lane M.*: Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* 2001, 55, 225-236.
16. *Makarevich A. V., Markkula M.*: Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 386-392.
17. *Matwee C., Betts D. H., King W. A.*: Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 2000, 8, 57-68.
18. *Memili E., First N. L.*: Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000, 8, 87-96.
19. *Paula-Lopes F. F., Al-Katanani Y. M., Majewski A. C., McDowell L. R., Hansen P. J.*: Manipulation of antioxidant status fails to improve fertility of lactating cows or survival of heat-shocked embryos. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 2343-2351.
20. *Paula-Lopes F. F., Chase C. C., Al-Katanani Y. M., Krinninger C. E., Rivera R. M., Tekin S., Majewski A. C., Ocon O. M., Olson T. A., Hansen P. J.*: Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 2003, 125, 285-294.
21. *Paula-Lopes F. F., Hansen P. J.*: Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1169-1177.
22. *Rensis F. de, Scaramuzzi R. J.*: Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. *Theriogenology* 2003, 60, 1139-1151.
23. *Rivera R. M., Dahlgren G. M., Castro e Paula L. A. de, Kennedy R. T., Hansen P. J.*: Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content and the time-course of development. *Reproduction* 2004, 128, 33-42.
24. *Rivera R. M., Hansen P. J.*: Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001, 121, 107-115.
25. *Rivera R. M., Kelley K. L., Erdos G. W., Hansen P. J.*: Alterations in ultrastructural morphology of two-cell bovine embryos produced in vitro and in vivo following a physiologically relevant heat shock. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 2068-2077.
26. *Roth Z., Hansen P. J.*: Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 2005, 129, 235-244.
27. *Ryan D. P., Blakewood E. G., Lynn J. W., Munyakazi L., Godke R. A.*: Effect of heat-stress on bovine embryo development in vitro. *J. Anim. Sci.* 1992, 70, 3490-3497.
28. *Sugiyama S., McGowanb M., Kafic M., Philippsa N., Younga M.*: Effects of increased ambient temperature on the development of in vitro derived bovine zygotes. *Theriogenology* 2003, 60, 1039-1047.
29. *Winkle L. J. van*: Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 2001, 64, 1-12.
30. *Zabel M. (red.)*: Immunocytochemia. PWN, Warszawa 1999, 218-225.

Adres autora: mgr Renata Włodarczyk, ul Sieradzka 16/4, 60-163 Poznań;
e-mail: renia.wlodarczyk@poczta.onet.pl