

# Molekularne aspekty procesów zachodzących w komórkach zarodków bydła podczas stresu cieplnego

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

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii UMK w Toruniu Collegium Medium w Bydgoszczy, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

\*Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 52, 60-625 Poznań

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

## Molecular aspects of bovine embryos apoptosis under heat shock conditions

### Summary

Apoptosis is a process involved in organogenesis and embryo body formation where the selective elimination of cells is required. High temperature-induced programmed cell death is a cause of failures of in vitro fertilization and summer embryo mortality in cows. The molecular mechanisms of these phenomena as of yet remain unclear, but involvement of heat shock proteins (HSPs) in both events is obvious. HSPs are called chaperone proteins because they protect other proteins from denaturation under high temperature conditions. Expression of HSPs is stimulated by DNA damage, cytostatics, as well as UV radiation. Programmed cell death may undergo one of two distinct molecular pathways: receptor path or mitochondrial path. Nevertheless, concerning the mechanism of high temperature-caused death of oocytes and embryos it is worth mentioning about the sphingomyelin-ceramide pathway of apoptosis. It is known that two cattle breeds, Brahman and Senegal, are resistant to heat shock. Moreover, embryos after preincubation in 40°C presented better adaptation for heat shock. This finding was evoked by the expression of HSP 70. Germs cultured under in vivo or in vitro conditions present divergences in morphological (nuclear chromatine condensation, cell membrane blebbing, apoptotic bodies formation) and biochemical features of apoptosis. Results of previous original studies have shown the higher survival ratio of cattle embryos developing in the maternal reproductive tract, than germs cultured in vitro. These findings may suggest the significance of secretions of chemical substances by uterine tissues during normal pregnancy.

**Keywords:** apoptosis, bovine

Wpływ stresu termicznego na zamieralność zarodków jest tematem wzbudzającym duże zainteresowanie. We wczesnym stadium przedimplantacyjnym stres termiczny powoduje uszkodzenia komórek zarodka, zahamowanie jego rozwoju i śmierć (17). Zdolność do aktywacji reakcji obronnej w odpowiedzi na stres termiczny zależy od stadium rozwoju zarodków. Momentem przełomowym wydaje się trzeci dzień po zapłodnieniu, w którym następuje aktywacja genomu zarodkowego. W stadium 8-16-komórkowym zarodki posiadają już zdolność wykorzystania szeregu mechanizmów, mających na celu ochronę własnych komórek przed destruktywnym działaniem podwyższonej temperatury (29). Kolejnym krokiem do wyjaśnienia wpływu i skutków działania podwyższonej temperatury na zarodki bydła jest poznanie mechanizmów komórkowych zachodzących na poziomie molekularnym. Niniejszy artykuł prezentuje niektóre molekularne zjawiska związane bezpośrednio z ekspozycją zarodków na działanie podwyższonej temperatury.

## Molekularne podstawy programowanej śmierci komórki

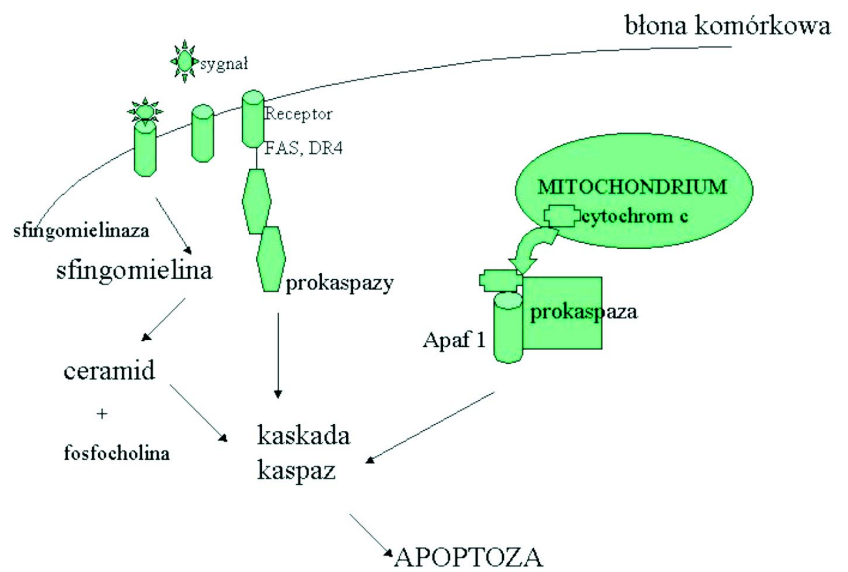
Śmierć komórki odbywa się dwoma zasadniczymi drogami. Pierwszą z nich stanowi zewnętrzny szlak, angażujący receptory zlokalizowane na powierzchni komórki. Dobrze udokumentowana jest ścieżka wiodąca przez receptory FAS (Apoptosis Stimulating Fragment) zaliczane do grupy receptorów TNF (tumor necrosis factor), oparta na klasycznym mechanizmie działania cytokin. Warto wspomnieć, iż niektóre receptory cytokin mają charakter rozpuszczalny i wiążą ligand w surowicy. Do swojej aktywności wymagają białek adaptorowych lokujących receptor w błonie komórkowej (20). Przyłączenie liganda do wspomnianego receptora inicjuje sekwencję molekularnych zdarzeń prowadzącą do śmierci komórki (1). Do innych receptorów aktywujących śmierć komórki należą: TNFR-1,-2 (tumor necrosis factor receptor-1,-2) oraz DR 4 (death receptor) (7). Pobudzenie niniejszych receptorów powoduje

proteolityczną obróbkę prokaspaz, prowadzącą do uwolnienia katalitycznie aktywnych enzymów – kaspaz. Enzymy te zaliczono do proteaz cysteinowych i przypisano im rolę w degradacji wielu białek pełniących kluczowe role w komórce. Podobnie jak sam proces apoptozy, tak i kaspazy podzielone zostały na inicjujące (kaspaza-2,-8,-9,-10) oraz wykonawcze (efektorowe) (kaspaza-3,-6,-7) (16, 18).

Omawiając mechanizmy śmierci oocytów oraz zarodków w warunkach podwyższonej temperatury, należy wspomnieć o szlaku sfingomielinowo-ceramidowym, ponieważ jest on często opisywany w ramach tego zagadnienia. Droga ta opiera się na hydrolytycznym uwolnieniu sfingomieliny, ceramidu i fosforanu cholicy z błonowego lipidu z udziałem kwaśnej lub obojętnej sfingomielinazy. Te niskocząsteczkowe substancje sygnałowe modulują aktywność wielu enzymów, takich jak kaspazy, fosfolipaza A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub> – PLA<sub>2</sub>) czy kinazy MAPK (mitogen activated protein kinase) oraz SAPK/JNK (stress activated protein kinase/ c-Jun N-terminal kinase) (18).

Drugą ważną drogą jest tzw. wewnętrzna ścieżka, w której kluczową rolę odgrywają mitochondria. Wprowadzenie komórki na drogę śmierci odbywa się z udziałem czynników wewnątrzkomórkowych, do których można zaliczyć propagację reaktywnych form tlenu, zwiększenie poziomu jonów Ca<sup>2+</sup> oraz sytuacje stresowe dla komórki, jak: szok cieplny, rozprężenie transportu elektronów czy uszkodzenie DNA (8). Krytyczną rolę w promowaniu apoptozy tą drogą odgrywa otwarcie megakanałów integrujących wewnętrzną i zewnętrzną błonę mitochondrium. W efekcie dochodzi do wypływu z przestrzeni międzybłonowej białek biorących udział w apoptozie, m.in. cytochromu c, AIF (apoptosis inducing factor) czy prokaspaz-2,-3,-9 (15). Istotnym elementem tej mitochondrialnej ścieżki apoptozy jest uformowanie kompleksu zwanego apoptosomem. Strukturę tę tworzą: cytochrom c, białko Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) oraz prokaspaza-9. W rezultacie dochodzi do uaktywnienia kaspazy-9, która z kolei uruchamia kaskadę kaspaz prowadzącą do degradacji komórki. Substratem kaspazy-9 jest prokaspaza-3 uwalniająca aktywną kaspazę wykonawczą (11). Elementem integrującym oba szlaki apoptotyczne jest białko Bid należące do rodziny białek Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma) (2, 28). Rycina 1 przedstawia schemat przebiegu głównych szlaków apoptozy.

Komórka, realizując program śmierci, wykazuje szereg cech morfologicznych pozwalających odróżnić apoptozę od klasycznej, biernej destrukcji komórki (nekrozy). Pierwszymi symptomami apoptozy są: obkurczenie jądra komórki oraz zagęszczenie chromatyny, będące efektem odwodnienia tego kompartmentu. Kolejne zmiany prowadzą do zmniejszenia objętości cytoplazmy, fragmentacji chromatyny do odcinków



Ryc. 1. Uproszczone schematy głównych szlaków apoptotycznych

nukleosomowych, a także do pofałdowania błony komórkowej z wytworzeniem pęcherzyków apoptotycznych. Ostatecznie zawartość cytoplazmy rozpada się i ulega obłonieniu do tzw. ciałek apoptotycznych (6).

### Białka szoku cieplnego

Jednym z następstw ekspozycji komórek zarodków na podwyższoną temperaturę jest denaturacja białek strukturalnych, enzymatycznych oraz transportujących. W efekcie dochodzi do zaburzenia prawidłowego metabolizmu komórki poprzez zahamowanie działania enzymów oraz zmiany w strukturze błonowej organelli komórkowych wpływających na transport wewnątrzkomórkowy. Wysoka temperatura może także powodować uszkodzenia w materiale genetycznym.

Białka szoku cieplnego (heat shock proteins, HSPs) stanowią ewolucyjnie konserwatywną rodzinę reprezentowaną przez komórki pro- i eukariotyczne. Ich ekspresja ma miejsce w warunkach podwyższonej temperatury oraz w innych sytuacjach uważanych za stresowe dla komórki. Rola tych białek polega na kontroli fałdowania (folding) i oligomeryzacji polipeptydów, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania białek strukturalnych, transportujących oraz regulatorowych. Rola „molekularnej opiekunki” (chaperone) dotyczy także zapobiegania denaturacji białek w warunkach wysokiej temperatury. Białka te koordynują również wewnątrzkomórkową translokację protein pomiędzy błonami kompartmentów (mitochondrium, siateczka wewnątrzplazmatyczna). Białka szoku cieplnego są zaangażowane także w ubikwitynozależną degradację nieprawidłowo sfałdowanych polipeptydów (21). HSP kodowane są przez wiele genów, a produkty ich ekspresji określa się na podstawie różnic mas cząsteczkowych poszczególnych polipeptydów. U ssaków wyróżniamy dwie podstawowe grupy białek szoku cieplnego. Pierwszą z nich stanowią białka o dużej masie cząsteczkowej (high molecular weight). Najlepiej poznane są HSP60 (m.cz. 60 kDa), HSP70 (m.cz. 68-78 kDa)

oraz HSP90 (m.cz. 80-100 kDa). Są one chaperonami zależnymi od ATP i mogą być produkowane konstytutywnie (kodowane przez geny metabolizmu podstawowego) lub ulegać ekspresji w warunkach stresowych. Drugą, ze względu na masę, grupę białek HSP stanowią niskocząsteczkowe białka szoku cieplnego, np. HSP27 i  $\alpha$ -krystalina. Małe białka szoku cieplnego mogą ulegać fosforylacji i oligomeryzacji, np. HSP27 formuje kompleksy o masie 1000 kDa. Te same białka szoku cieplnego, w zależności od lokalizacji, mogą działać pro- lub antyapoptotycznie. Przykładem takiego antagonistycznego działania są HSP10 i HSP60. Wykazano, iż cząstki te mają działanie proapoptotyczne, gdyż wpływają na aktywację kaspazy 3 (27). Jednocześnie z zadziałaniem czynnika proapoptotycznego, normalnie ułożone w mitochondrium białka (tylko 15-20% lokalizowanych jest w cytozolu), HSP60 i HSP10 uwalniane są do cytozolu i tam wpływają na aktywność prokaspazy 3 (27, 30). Białka HSP uczestniczą w wielu kluczowych momentach procesu apoptozy. Mitochondrialna lokalizacja HSP determinuje ich udział w wewnętrznej ścieżce apoptozy. Regulacja ta może zachodzić zarówno w fazie inicjatorowej, jak i wykonawczej. Białka szoku cieplnego mogą zapobiegać uwalnianiu cytochromu c z mitochondrium (HSP27) poprzez redystrybucję białka Bid (22). W fazie wykonawczej HSP27 może bezpośrednio zatrzymać wewnętrzny szlak apoptozy poprzez wiązanie się z cytochromem c już po jego uwolnieniu do cytozolu. Obecność zablokowanego allosterycznie cytochromu c uniemożliwia formowanie oligomerycznego kompleksu inicjującego apoptozę (12). Powstanie apoptosomu zahamowane jest także w wyniku połączenia HSP70 z Apaf1 (19). Istnieje również możliwość zablokowania wykonawczej kaspazy 3 poprzez jej interakcję z sHSP  $\alpha$ B-krystaliną (21). Proapoptotyczne białko AIF (apoptosis inducing factor) wpływa z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytozolu, a następnie ulega translokacji do jąder komórek apoptotycznych, gdzie uruchamia proces kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA. Zablokowane przez HSP70 AIF nie powoduje charakterystycznych dla procesu apoptozy zmian w komórce (26).

Receptorowa ścieżka apoptozy pozostaje również pod wpływem białek szoku cieplnego. Potwierdzono udział ufosforylowanej formy HSP27 w apoptozie przebiegającej z udziałem receptora Fas. Hamowanie apoptozy przebiega bezpośrednio poprzez interakcję HSP27 z cząstką adaptorową Daxx (5).

Wzmożona częstość śmierci zarodków w okresie letnim spowodowała wzrost zainteresowania udziałem wysokiej temperatury w promowaniu apoptozy. Powyższe zjawisko określane jest mianem szoku cieplnego. Poddanie zarodków działaniu podwyższonej temperatury (40°C) powoduje odblokowanie genów białek szoku cieplnego. Dochodzi wówczas do syntezy aktywnych protein HSP o funkcji protekcyjnej. Białka te utrzymują się w komórkach i zapobiegają apoptozie w warunkach stresu termicznego (42-43°C) (21, 25).

Wyniki badań są zgodne z wcześniejszymi ustaleniami, ekspozycja zarodków na podwyższoną temperaturę indukuje ekspresję białek HSP chroniących komórki przed apoptozą. Dotychczas najczęściej analizowany był udział białek HSP70 i HSP72, chociaż dokładne molekularne mechanizmy ich działania pozostają nieznanne (2, 18, 23). Wiadomo, iż ekspresja HSP jest stymulowana przez uszkodzenia DNA, cytostatyki czy promieniowanie UV. HSP70 oraz HSP72 blokują degradację polimerazy poli-(ADP-rybozy) – jednego z kluczowych enzymów naprawiających fotouszkodzenia DNA.

Transkrypcja mRNA HSP70 w komórkach zarodków bydła, w odpowiedzi na działanie temperatury 42°C, była hamowana przez inhibitory transkrypcji – aktywnymycynę D oraz 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-rybofuranozylobenzimidazol (DRB). DRB ponadto hamował syntezę białek *de novo* w zarodkach dwukomórkowych (4). Wcześniejsze badania przeprowadzane z zastosowaniem  $\alpha$ -amanityny czyniły zarodki wrażliwe na sygnały proapoptotyczne (9). Wyniki tych prac wskazują, że niezbędna jest synteza mRNA HSP70 *de novo*. Podczas omawianych eksperymentów wykazano również, że już dwukomórkowe zarodki były zdolne do syntezy HSP70, wskazując tym samym na niezwykle ważną rolę białek szoku cieplnego w regulacji rozwoju zarodkowego (9, 10).

Dokonano również porównania procesów śmierci zarodków hodowanych *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż dopiero 21-komórkowe zarodki rozwijające się *in vivo* przejawiały charakterystyczne dla apoptozy zmiany w strukturze materiału genetycznego, podczas gdy zarodki z hodowli *in vitro* prezentowały pozytywny wynik reakcji TUNEL (TdT-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin/digoxigenin nick end-labeling) już w stadium sześciokomórkowym. Sugerowana jest rola substancji wydzielanych przez tkanki macicy wpływających korzystnie na przeżywalność zarodków (13). Jednocześnie wyróżniono morfologiczne cechy wspólne dla apoptozy przebiegającej w obu warunkach hodowli zarodków. Fragmentacja cytoplazmy obserwowana była podczas wszystkich etapów bruzdkowania zarówno w zarodkach hodowanych *in vivo*, jak i *in vitro*, natomiast kondensacja jądra komórkowego w tych samych warunkach rozpoczynała się w stadium trzykomórkowym. Degradacja jądrowego DNA występowała w obu wariantach hodowli dopiero od stadium moruli, wcześniej wykryto ją w 6-8-komórkowych zarodkach inkubowanych *in vitro*. Podobny efekt dotyczył fragmentacji jądra komórkowego, przy czym zmiany obserwowane *in vitro* miały swój początek w embrionach liczących od 9 do 16 blastomerów (13).

Badania pozwoliły na wyselekcjonowanie ras bydła o zróżnicowanej podatności na stres temperaturowy. W toku doświadczeń próbowano wyjaśnić różnice w reakcji na temperaturę 41°C u czterech ras bydła: angus, holstein, brahman i senepol. Otrzymane wyniki wskazują, iż bydło ras brahman i senepol jest znacznie

mniej wrażliwe na apoptozę wywołaną szokiem termicznym. Na podstawie eksperymentów z użyciem limfocytów otrzymanych od badanych zwierząt, nie wskazano jednoznacznej cechy „uodporniającej” na działanie wysokich temperatur. Wolne rodniki tlenowe generowane w tych warunkach mogą być neutralizowane m.in. przez glutation (GSH). Jednak uzyskane rezultaty nie wykazują różnic w poziomie GSH u wszystkich czterech ras bydła. Podobna konstatacja dotyczy białek HSP70. Sugeruje się, że przyczyną zróżnicowanej wrażliwości na działanie stresu cieplnego może być różny stosunek białek pro- i antyapoptotycznych (24).

### Zmiany cytoszkieletu pod wpływem wysokiej temperatury

Cytoszkielet, tak jak i inne struktury białkowe, ulega destrukcji pod wpływem wysokiej temperatury. Stanowią go mikrofilamenty, mikrotubule oraz filamenty pośrednie. Mikrotubule są istotnym elementem podczas podziałów komórkowych. Tworzą rodzaj szkieletu zapewniającego ukierunkowany ruch chromosomów, blokując również ułożone na biegunach centriole. Zaburzenia w strukturze mikrotubul spowodowane uszkodzeniem białek (tubuliny) pod wpływem wysokiej temperatury uniemożliwiają prawidłowe przejście przez kolejne fazy podziału komórkowego. Głównym składnikiem cytoszkieletu są filamenty aktynowe (14). W nielicznych badaniach obserwowano denaturację i agregację aktyny pod wpływem szoku cieplnego (25). Zaobserwowano, że dla komórki, w tym komórek zarodka, szczególnie groźne jest tworzenie dużych agregatów zdenaturowanej aktyny. Pod wpływem szoku cieplnego, w badaniach *in vitro*, filamenty aktynowe ulegają kondensacji tak, że białka szoku cieplnego nie mają do nich dostępu. Jednakże w komórce *in vivo* działają niskocząsteczkowe HSP (sHSP). Udowodniono, że  $\alpha$ -B-krystalina oraz HSP27 przeciwdziałają powstawaniu dużych agregatów zdenaturowanej aktyny. Takie wyniki wskazują na „opiekuńcze” działanie białek HSP na cytoszkielet (25). Wcześniej opisywane nieprawidłowe ułożenie organelli w komórkach zarodków spowodowane były prawdopodobnie denaturacją cieplną białek cytoszkieletu. Brak protekcyjnej ochrony zapewnionej w komórkach przez białka HSP może wynikać z działania zbyt wysokiej temperatury lub długotrwałego narażenia zarodki na stres cieplny. Prawdopodobnie w zarodkach tych nie dochodziło do inicjacji ekspresji genów białek szoku cieplnego, które chronią cytoszkielet przed destrukcją. Stosowaną powszechnie metodą jest „priming” zarodków, pobudzający ich komórki do syntezy białek HSP.

### Podsumowanie

Problem śmierci zarodków bydła pozostaje nadal nierozwiązany. Istnieje wiele pytań, które mimo badań prowadzonych na poziomie molekularnym pozostają ciągle bez odpowiedzi. Dodatkową trudność sprawia fakt, że apoptoza zarodków wiąże się w ścisły sposób z wykształcaniem ich ciała.

### Piśmiennictwo

1. Ashkenazi A., Dixit V. M.: Death receptors: signalling and modulation. *Science* 1998, 281, 1305-1308.
2. Buzzard K. A., Giaccia A. J., Killender M., Anderson R. L.: Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 17147-17153.
3. Chan S. L., Yu V. C.: Proteins of the Bcl-2 family in apoptosis signaling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004, 31, 119-128.
4. Chandolia R. K., Peltier M. R., Hansen P. J.: Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 1644-1648.
5. Charette S. J., Lavoie J. N., Lambert H., Landry J.: Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 7602-7612.
6. Cywińska A., Baś M., Krzyżowska M., Sokolowska J.: Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część I. Mechanizmy apoptozy. *Życie weterynaryjne* 2004, 79, 552-557.
7. Dalmini Z., Mbita Z., Zungu M.: Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharm. Therap.* 2004, 101, 1-15.
8. Daniel P. T.: Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000, 14, 2035-2044.
9. Edwards J. L., Hansen P. J.: Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.* 1996, 55, 340-346.
10. Edwards J. L., Ealy A. D., Monterroso V. H., Hansen P. J.: Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 48, 25-33.
11. Fulda S., Debatin K. M.: Apoptosis pathway: turned on their heads? *Drug Resist. Updates* 2003, 6, 1-3.
12. Garrido C., Bruey J. M., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A. P., Solary E.: HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* 1999, 13, 2061-2070.
13. Gjørret J. O., Knijn H. M., Dieleman S. J., Avery B., Larsson L. I., Maddox-Hyttel P.: Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1193-1200.
14. Grzanka A., Grzanka G., Orlikowska M.: Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 66, 1611-1617.
15. Gulp M. van, Festjens N., Van Loo G., Saelens X., Vandenaabee P.: Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2003, 304, 487-497.
16. Kilińska M., Miskiewicz A.: Kaspazy kręgowców: ich rola w przebiegu apoptozy. *Post. Biol. Kom.* 2003, 30, 129-152.
17. 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.
18. Leist M., Jaattela M.: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2, 589-598.
19. Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Meriin A. B., Sherman M. Y., Morimoto R. I., Massie B.: The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 7146-7159.
20. Nowak J. Z., Zawilska J. B.: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnałów. PWN, Warszawa 2004.
21. Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C.: Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2003, 304, 505-512.
22. Paul C., Manero F., Gonin S., Kretz-Remy C., Viot S., Arrigo A. P.: Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 816-834.
23. Paula-Lopes F. F., Hansen P. J.: Heat induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1169-1177.
24. Paula-Lopes F. F., Chase C. C., Al-Katanani Y. M., Krininger C. E., Rivera R. M., Tekin S., Majewski A. C., Ocon O. M., Olson T. A.: 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.
25. Pivovarova A. V., Mikhailova V. V., Chernik I. S., Chebotareva N. A., Levitsky D. I., Gusev N. B.: Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2005, 331, 1548-1553.
26. Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S. A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J. M., Garrido C., Kroemer G.: Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3, 839-843.
27. Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D. P., Orrenius S.: Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* 1999, 18, 2040-2048.
28. Sprick M. R., Walczak H.: The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1644, 125-132.
29. Włodarczyk R., Izdebska M., Grzanka A., Jaśkowski J. M.: Wpływ stresu cieplnego na rozwój zarodków bydła we wczesnym okresie przedimplantacyjnym. *Medycyna Wet.* (w druku).
30. Xanthoudakis S., Roy S., Rasper D., Hennessey T., Aubin Y., Cassidy R., Tawa P., Ruel R., Rosen A., Nicholson D. W.: Hsp60 accelerates the maturation of procaspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J.* 1999, 18, 2049-2056.

Adres autora: mgr Magdalena Izdebska, ul. Wywolenia 76/16, 85-791 Bydgoszcz; e-mail: mizdebska@cm.umk.pl