

Wpływ subletalnego stresu w postaci wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kompetencje rozwojowe i metabolizm zarodków świni podczas ich przedimplantacyjnego rozwoju

mgr Marcin Kucia

Streszczenie

Po raz pierwszy efekt działania subletalnego stresu na komórki zaobserwowano u bakterii *Listeria monocytogenes*. Mikroorganizmy te pod wpływem zastosowanego wcześniej szoku termicznego uodporniły się na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP), wykorzystywanego do konserwacji mleka. Skutkiem zastosowania takiego subletalnego stresu był wzrost proliferacji komórek bakterii. Z kolei, podjęte badania nad wpływem HHP na nasienie, oocyty i zarodki ssaków wykazały, że zastosowanie HHP może prowadzić do wzrostu wydajności różnorodnych technik wspomaganego rozrodu (ART), między innymi hodowli *in vitro*, zapłodnienia *in vitro* i kriokonserwacji.

W niniejszej pracy użyto wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, jako precyzyjnego stresora w celu zwiększenia kompetencji rozwojowych zarodków świni hodowanych *in vitro*. Posługując się metodami mikroskopii konfokalnej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz technikami immunohistochemicznymi i biochemicznymi badano jak HHP wpływa na przeżywalność zarodków podczas hodowli oraz ich jakość. Analizowano również metabolizm zarodków podczas krótkotrwałej i długotrwałej odpowiedzi po zastosowaniu HHP. W tym celu dla zarodków świni rozwijających się *in vitro* mierzono liczne parametry: potencjał na wewnętrznej błonie mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), poziom reaktywnych form tlenu (ROS), zawartość ATP, ekspresję enzymów zaangażowanych w metabolizm komórkowy: heksokinazy II (HK2); syntazy cytrynianowej (SC) oraz palmitoilotransferazy karnityny II (CTP2) jak również pole powierzchni błon mitochondrialnych (S_v), objętość względną mitochondriów (V_v), objętość kropli lipidowych ($V_{v(LD)}$) i całkowitą zawartość lipidów (TF). Wykazano, że HHP indukuje szybką lecz trwałą odpowiedź zarodków w postaci obniżenia $\Delta\Psi_m$ i poziomu ROS. Stres HHP zastosowany w zygocie i moruli wpływa na obniżenie parametrów $\Delta\Psi_m$ i ROS podczas późniejszego rozwoju zarodków oraz na wzrost potencjału rozwojowego i jakości uzyskanych blastocyst ekspandujących natomiast nie wpływa na zawartość ATP w zarodkach na różnym etapie ich przedimplantacyjnego rozwoju. Ekspresja HK2 oraz SC wzrasta, a CTP2 pozostaje stała w blastocystach po zastosowaniu HHP. Wykazano, że w blastocystach ekspandujących hodowanych z zygot poddanych stresowi

HHP pole powierzchni błon mitochondrialnych, objętość względna mitochondriów oraz całkowita zawartość lipidów zwiększa się w porównaniu do blastocyst nie poddanych HHP.

Współcześnie wydajność produkcji *in vitro* zarodków ssaków, szczególnie świni jest wciąż niezadawalająca, a ich jakość niska. Jednak subletalny stres w postaci wysokiego ciśnienia hydrostatycznego wpływa korzystnie na przedimplantacyjny rozwój hodowanych *in vitro* zarodków świni, ich jakość oraz potencjał rozwojowy, między innymi dzięki obniżeniu aktywności mitochondriów, ograniczeniu produkcji reaktywnych form tlenu oraz modyfikacji ekspresji niektórych enzymów zaangażowanych w oddychanie tlenowe.

Powyższe streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Marcina Kuci akceptuję.



dr hab. Marek Romek
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ