

## MECHANIZMY VPLYVU VYSOKÝCH TEPLÔT NA HOSPODÁRSKE ZVIERATÁ

Sirotkin, A.V., Parkányi, V., Bauer, M.

Centrum výskumu živočíšnej výroby Nitra, Slovensko

**Abstract.** The present paper represents a review of original data concerning character and mechanisms of action of thermal stress-high temperatures on viability, reproductive functions and performance in farm animals (rabbits and pigs). It is demonstrated, that thermal stress can negatively affect consumption of nutrients, mortality, gravidity and daily gain. High temperature does not affect release of corticosterone and ultrastructure of ovarian cells, but alters ovarian cell proliferation, apoptosis, synthesis and accumulation of heat shock proteins, release of reproductive steroid hormones and IGF-I, and the response of ovarian cells to physiological stimulators (IGF-I, leptin, FSH). Additions of hormones IGF-I, leptin and FSH can affect these parameters and to prevent the effects of hyperthermia on porcine ovarian cells. It is not to be excluded, that IGF-I, leptin, FSH and progesterone can be used for neutralisation of heat stress on farm animal reproduction.

### Úvod

V súvislosti s globálnymi klimatickými zmenami a potrebou dodržiavať tepelné podmienky chovu hospodárskych zvierat pre ich zdravie, pohodu a úžitkovosť sa začala venovať systematická pozornosť aj výskumu vplyvu vysokých teplôt na produkčné systémy v poľnohospodárstve a mechanizmy ich vplyvu na zvieratá. V chove zvierat sa pozornosť sústreďuje na definovanie vzťahov medzi vyššou teplotou chovného prostredia a úžitkovosťou ako funkciou reprodukcie a zdravotného stavu. Králiky a ošípané sú z pohľadu testovania vysokých teplôt na organizmus vhodnými modelovými a zároveň produkčnými hospodárskymi zvieratami.

Zmeny teploty vyvolávajú kaskádu javov týkajúcich sa nasledujúcich štruktúr: termoreceptory–zodpovedajúce centrá CNS–hypotalamo–hypofyzárny systém–hormóny nadobličiek a gonád–apoptóza, proliferácia, diferenciácia a produkcia signálnych látok bunkami gonád–produkcia gamét. Endokrinné a bunkové mechanizmy vzájomných vzťahov medzi teplotnými podmienkami a reprodukčnými procesmi, napriek ich biologickému a hospodárskemu významu, doteraz neboli objasnené, rovnako ako neboli rozpracované ani metodické postupy využitia endokrinných a iných signálnych látok pre detekciu a neutralizáciu negatívnych vplyvov teplotného stresu na reprodukčné procesy hospodárskych zvierat. Je dokázané, že vysoké teploty môžu potláčať reprodukčné procesy poľnohospodárskych zvierat, a že tieto zmeny sú sprevádzané abnormálnou produkciou reprodukčných hormónov. Tieto pozorovania naznačujú, že negatívne vplyvy vysokých teplôt na zdravie, reprodukciu a iné fyziologické procesy môžu byť sprostredkované endokrinným systémom. Gonadotropíny sú stimulatory sekrečných a generačných funkcií ovárií cicavcov, a že IGF-I a cycklické nukleotidy môžu byť lokálnymi sprostredkovateľmi účinku gonadotropínov na ovária.

Okrem toho, zvýšený výskyt apoptózy u buniek vystavených teplotnému šoku môže byť zredukovaný v dôsledku tvorby bielkovín Hsp70, indukovanej miernym teplotným šokom.

Cieľom nášho výskumu bolo pochopiť endokrinné a vnútrobunkové mechanizmy vplyvu hypertermického stresu na zdravie, životaschopnosť a reprodukčné funkcie hospodárskych zvierat – králikov a ošípaných a využitie získaných poznatkov pre detekciu a neutralizáciu negatívnych vplyvov hypertermie. Konkrétnymi cieľmi bolo:

1) Stanovenie vplyvu hypertermie na fyziologické a reprodukčné funkcie králikov, ich rast a životaschopnosť a ich endokrinné ukazovatele in vivo:

hladina kortikosteroidov, ovariálnych steroidov, IGF -1 a leptínu v krvi zvierat a životaschopnosť potomkov

2) Štúdium vplyvu vyšších teplôt na reprodukčné a fyziologické funkcie králikov a ošípaných in vitro (proliferácia, apoptóza a steroidogéza a expresia proteínov tepelného stresu izolovaných ovariálnych buniek).

3) Štúdium schopnosti vybraných hormónov (FSH, leptínu, IGF-I) regulovať funkcie ovárií králikov a ošípaných a neutralizovať efekty tepelného stresu na ovariálne funkcie.

### Materiál a metódy

V prvej etape výskumu boli otestované režimy teplotného stresu na mláďatách a dospelých králikoch a ošípaných, realizoval sa odber krvi samcov a samíc rôzneho veku podrobených a nepodrobených dlhodobému vplyvu termického stresu. Následne boli vzorky krvi spracované pre analýzu a stanovenie stroidných hormónov a inzulínu podobného rastového faktora IGF-I v krvi. Zároveň sme sledovali vplyv vyšších teplôt na sekrečné funkcie (vylučovanie steroidných a peptidových hormónov) ovariálnych buniek králikov in vitro (Sirotkin a kol., 2010). V druhej etape výskumu sme sledovali vplyv zvýšených teplôt na funkcie ovariálnych buniek ošípaných (proliferácia, apoptóza a steroidogéza a expresia proteínov teplotného stresu izolovaných ovariálnych buniek) kultivovaných v prítomnosti a bez prítomnosti séra a hormónov FSH, leptínu a IGF-I (Sirotkin, 2010).

V krvi králikov všetkých skupín boli metódami RIA/IRMA/ELISA analyzované hladiny stresových hormónov (kortikosterón), reprodukčných hormónov (progesterón, testosterón, estradiol), rastového faktora (IGF-I) a leptínu.

Na monovrstve kultivovaných granulóznych buniek vaječnikov sme analyzovali proliferáciu (expresiu proliferáčnych peptidov PCNA, CDC2/p34 a cyklinu B), apoptózu (expresiu apoptotických peptidov TdT, bax, caspáza 3), sekreciu hormónov (progesterónu, testosterónu, estradiolu), rastových faktorov (IGF-I), väzbových proteínov pre rastové faktory (IGFBP-3) a expresiu proteínov z teplotného šoku (HSP), proteín kináz A, G,

MAPK, CDC2 v bunkách metódami RIA/IRMA, SDS-PAGE-Western immunoblotting, imunocytochémia a TUNEL (Sirotkin, 2010, Sirotkin a Bauer, 2011).

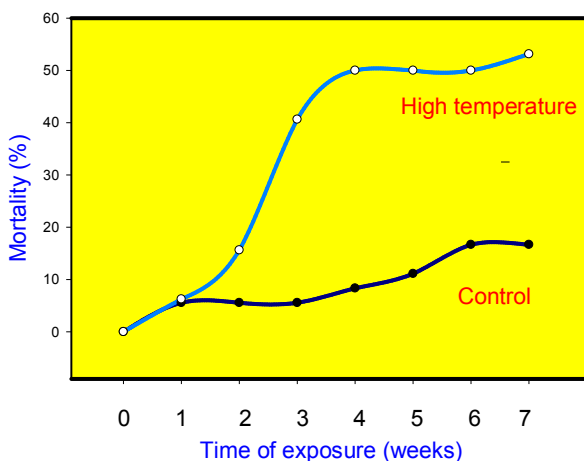
## Výsledky a diskusia

V prvej fáze výkrmu boli medzi 35. až 56. dňom veku zaznamenané denné prírastky živej hmotnosti v priemere 28,76 g a v kontrolnej skupine 38,97 g, čo je v relatívnom hodnotení zníženie o 26,2 % oproti kontrolnej skupine.

Spotreba krmiva na jednotku prírastku živej hmotnosti v prvej fáze výkrmu bola pôsobením vysokej teploty v priemere o 27,04 % vyššia ako v kontrolnej skupine. Po 56. dni veku (druhá fáza výkrmu) sa spotreba krmiva na jednotku prírastku živej hmotnosti v kontrolnej skupine zvýšila o 16,59 % oproti pokusnej skupine so zvýšenou tepelnou záťažou prostredia, ale zaznamenali sme aj vyššie denné prírastky živej hmotnosti v priemere o 29 % v prospech kontrolnej skupiny. Výsledky poukazujú na skutočnosť, že králiky vystavené zvýšenej teplote prostredia počas výkrmu (od 35. do 91. dňa veku) vyprodukovali v priemere na každé zviera o 509,02 g menej živej hmotnosti než králiky vykrmované v čiastočne klimatizovaných priestoroch. Konverzia krmiva za celý pokus (3,97 kg/kg v pokusnej skupine a 4,6 kg/kg v kontrolnej skupine) bola o 13,7 % vyššia v kontrolnej skupine, čo je možné zdôvodniť vyššou spotrebou krmnej zmesi na produkciu zásobného tuku pri vyšších hmotnostných kategóriách brojlerových králikov.

Výsledky pokusov s bilančnou stráviteľnosťou živín poukazujú na skutočnosť, že zvyšujúcou sa teplotou chovného prostredia na  $34 \pm 4^\circ\text{C}$  dochádza ku významnému zníženiu stráviteľnosti živín (sušiny, N-látok, tuku, vlákniny a organickej hmoty) skrmovaných krmných zmesí. V tomto pokuse sme sledovali aj prežívateľnosť zvierat počas teplotnej záťaže. Najväčšiu mortalitu samíc (20%) sme zaznamenali v poslednom týždni gravidity. Priemerný počet živo narodených mláďat na 1 vrh bol pri pokusnej skupine 5,2 ks, kontrolná skupina dosiahla hodnotu 8,05 ks.

Najnegatívnejšie sa prejavilo pôsobenie vysokej teploty na prežívateľnosť mláďat od narodenia do odstavu (35 dní veku), kedy do tohto veku uhynulo v pokusnej skupine až 84,61% zvierat.



**Obř. 1.** Teplotná záťaž redukuje prežívateľnosť mláďat králikov.

Výsledky in-vivo experimentov realizovaných na králikoch ukázali, že teplotný stres môže ovplyvňovať: hladinu steroidných hormónov a inzulínu podobného faktora (IGF-I) v krvi dospelých králikov a mláďat, zmeny týchto hladín počas puberty a schopnosť ovárií produkovať steroidné hormóny a IGF-I in vitro.

**Tab. 1.** Hladiny hormónov v krvi mláďat králikov (samci a samice) podrobených (pokus) a nepodrobených (kontrola) hypertermickému stresu

Skupiny zvierat	Hladina progesterónu (ng/ml plazmy)	Hladina testosterónu (ng/ml plazmy)	Hladina kortikosterónu (ng/ml plazmy)	Hladina IGF-I (ng/ml plazmy)
Samci kontrola	2,24±1,61	0,25±0,17	55,95±13,99	47,92±12,76
Samci Pokus	1,68±0,21*	2,73±0,32*	23,59±2,44*	16,89±3,43*
Samice kontrola	2,74±0,44		73,85±25,84	43,33±5,66
Samice pokus	1,10±0,25*		24,43±3,34*	8,73±2,93*

Uvedené údaje svedčia o tom, že u králikov dlhodobý hypertermický stres vyvoláva nasledovné zmeny v hladinách hormónov a rastového faktora v krvi: ovplyvňuje progesterón (znižuje u mláďat a zvyšuje u dospelých samíc), znižuje estradiol, zvyšuje testosterón, znižuje kortikosterón (len u mláďat), znižuje IGF-I. Tieto výsledky potvrdili našu hypotézu, že dlhodobý teplotný stres potláča reprodukčné funkcie (vylučovanie pohlavných hormónov), adaptačné mechanizmy (vylučovanie kortikosterónu) a regulátora rastu (vylučovanie rastového faktora IGF-I).

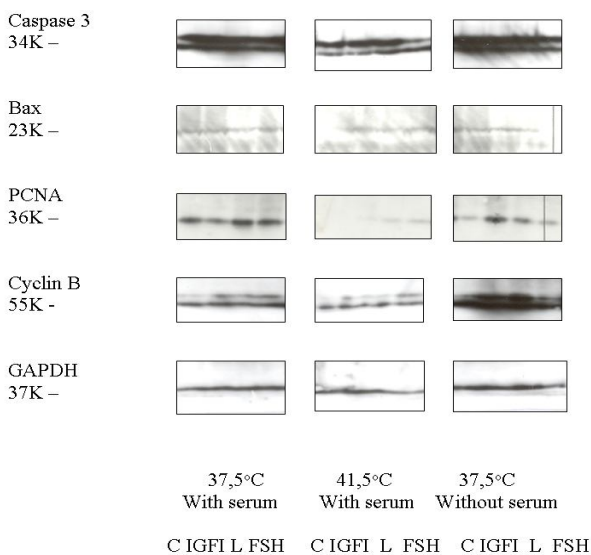
Vzhľadom na to, že IGF-I zohráva dôležitú úlohu v podporovaní rastu, v reprodukčných procesoch, sekrečných a generačných funkciách vaječníkov (Guidice, 2001), predpokladali sme, že potlačanie týchto procesov vplyvom vysokých teplôt sa realizuje znížením jeho koncentrácie v krvi. Naše výsledky ukázali, že hypertermia môže ovplyvňovať aj hladinu steroidného hormónu progesterónu v krvi králikov. Charakter vplyvu sa menil v závislosti od pohlavia a veku zvierat. U dospelých samíc vysoké teploty znižovali a u mladých samíc zvyšovali koncentráciu progesterónu v krvi. U samcov sa charakter vplyvu menil počas experimentu - krátkodobá (2 týždne) expozícia zvyšovala, a dlhodobá (3-4 týždne) znižovala koncentrácie tohto steroidného hormónu v krvi.

Nami zaznamenané výsledky svedčia o tom, že dlhodobý teplotný stres môže potláčať reprodukčné funkcie a rast králikov cez zmeny vo vylučovaní pohlavných hormónov (progestagénov) a rastového faktora IGF-I, ale nie cez zmeny estrogénov (estradiolu) a stresového hormónu kortikosterónu.

Výsledky in vitro experimentov ukázali, že izolované a kultivované ovariálne granulózne bunky králikov sú

schopné produkovať a vylučovať značné množstvá pohlavného steroidného hormónu progesterónu. Prídavky folikulostimulačného hormónu (FSH) tento proces stimulovali. Zároveň sme zistili, že ovariálne bunky izolované z králikov, podrobených hypertermickému stresu mali zníženú bazálnu produkciu progesterónu a tiež odozvu buniek na stimuláciu FSH. Výsledky in vitro experimentov podporujú výsledky zaznamenané počas in vivo experimentov a demonštrujú inhibičný vplyv vysokých teplôt na vylučovanie hormónov vaječníkmi králikov. Zároveň sme zistili, že vysoké teploty potláčajú nielen bazálnu sekrečnú aktivitu gonád, ale aj jej odozvu na podnety fyziologického hormonálneho stimulatéra (FSH).

Výsledky in vitro uskutočnené na kultivovaných ovariálnych folikuloch a granulóznych bunkách ošípaných poukázali na to, že tieto štruktúry sú schopné produkovať a vylučovať značné množstvá pohlavných steroidných hormónov progesterónu, testosterónu, estradiolu a rastového faktora IGF-I. Tieto ovariálne štruktúry obsahovali značné množstvá markerov proliferácie (PCNA, cyklín B1), apoptózy (bax, caspáza 3) a proteíny teplotného stresu (HSP70, HSP72 a HSP105) /alebo ich mRNA. Zároveň bolo zistené, že teplotný stres, rovnako ako aj podvýživa (chýbajúce sérum v kultivačnom médiu) mali značný vplyv na vylučovanie hormónov a expresiu týchto markerov.



**Obr. 2.** Teplotná záťaž (41,5 °C) redukuje expresiu proliferáčnych látok (PCNA, cyklín B1) v bunkach vajecnikov ošípaných kultivovaných bez a s IGF-I, LH (L) a FSH (SDS PAGE-Western blotting) (Sirotkin, 2010).

Tiež sme zistili, že zvýšená teplota, ako pri kultivácii aj ovariálnych folikulov, tak aj granulóznych buniek znižovala expresiu markerov bunkovej proliferácie (PCNA, cyklín) a apoptotického markera (caspázy, nie však bax). Tieto zmeny boli sprevádzané znížením akumulácie HSP70. Stres iného typu – hladovanie (kultivácia bez séra) tieto zmeny nevyvolával. Prídavky niektorých hormónov (IGF-I, FSH, leptínu) boli schopné zabraňovať zmenám vyvolaným zvýšenou teplotou (Sirotkin, 2010). Údaje získané z RT-PCR poukázali na

zvýšovanie expresie proteínov teplotného šoku HSP70, HSP72 a HSP105 v bunkách granulózy ošípaných ovplyvnených vysokými teplotami, ale nie pod vplyvom podvýživy (Sirotkin a Bauer, 2011). Prídavky hormónov (IGF-I, leptín, FSH) boli schopné neutralizovať efekty zvýšených teplôt.

Kultivácia v podmienkach zvýšenej teploty stimulovala vylučovanie hormónov progesterónu a estradiolu izolovanými ovariálnymi folikulmi a granulóznymi bunkami. Podvýživa tento efekt nevyvolávala. Prídavky hormónov IGF-I, leptínu a FSH boli schopné zabraňovať efektu hypertermie (Sirotkin, 2010).

## Záver

- pôsobenie vysokých teplôt nepriaznivo vplyva na priebeh gravidity a prežiteľnosť novonarodených mláďat, spôsobuje znižovanie priemerných denných prírastkov živej hmotnosti a mortalitu odstavených králikov.
- zvýšená teplota, na rozdiel od podvýživy, podstatne nemení vylučovanie stresového hormónu kortikosterónu, mení však proliferáciu, apoptózu, tvorbu a akumuláciu proteínov teplotného šoku, vylučovanie pohlavných hormónov a rastového faktora IGF-I a odozvu ovariálnych buniek hospodárskych zvierat na fyziologické stimulatéry (IGF-I, leptín a FSH),
- prídavky hormónov IGF-I, leptínu a FSH sú schopné regulovať proliferáciu, apoptózu, syntézu a akumuláciu proteínov teplotného šoku v ovariálnych bunkách a zabraňovať efektom hypertermie na ovariálne bunky ošípaných,
- zvýšená teplota môže potláčať reprodukčné funkcie a rast cez zmeny v produkcii alebo vo vylučovaní rastového faktora IGF-I, pohlavných hormónov (progestagénov a iných steroidov) a proteínov teplotného šoku,
- nie je vylúčené, že IGF-I, leptín, FSH, progesterón a iné regulátory proteínov teplotného šoku, proliferácie a apoptózy môžu byť využité pre neutralizáciu negatívnych efektov vysokých teplot na reprodukčné procesy u králikov a ošípaných.

**Podakovanie** Úprimne ďakujem za technickú asistenciu p. Kataríne Tóthovej a Ing. Žofii Kuklovej, a za finančnú podporu projekt CEGEZ (E-NEALOKO-06-16-000004).

## References

- Sirotkin AV, Bauer M. Heat shock proteins in porcine ovary: synthesis, accumulation and regulation by stress and hormones. *Cell Stress Chaperones*. 2011 16:379-387.
- Sirotkin AV. Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones. *J Exp Biol*. 2010 213:2125-2130.
- Sirotkin AV, Chrenek P, Chadio S, Xylouri E, Fotopoulou H, Makarevich AV. Phosphodiesterase inhibitor 3-

isobutyl-methyl-xanthine affects rabbit ovaries and oviduct. *Eur J Pharmacol.* 2010 643:145-151.

