

Streszczenie

Stres cieplny jest coraz powszechniej występującym niekorzystnym czynnikiem środowiskowym wywołującym zaburzenia behawioru, procesów fizjologicznych oraz biochemicznych u zwierząt zmienno- i stałocieplnych. Ekspozycja zwierząt hodowlanych na wysoką temperaturę może powodować wiele dysfunkcji, takich jak np. immunosupresja, utrata masy ciała, zmniejszenie reprodukcji, a także zwiększona śmiertelność, co w konsekwencji może prowadzić do strat ekonomicznych.

Doniesienia naukowe wskazują, iż skorupiaki jadalne hodowane w wielu regionach świata oraz drób są szczególnie wrażliwe na wysoką temperaturę, dlatego też obecnie poszukuje się różnych metod łagodzenia niekorzystnych efektów tego rodzaju stresu. Choć dostępne badania wykazały, że niektóre osmoprotektanty należące do aminokwasów niwelują szkodliwe skutki podwyższonej temperatury w różnych układach biologicznych, stosunkowo niewiele wiadomo na temat ochronnego działania L-proliny (L-PROL), aminokwasu wchodzącego w skład białek strukturalnych.

Badania nad skutkami stresorów środowiskowych wymagają zastosowania wrażliwych modeli biologicznych. Rozwielitka (*Daphnia magna*) jest skorupiakiem pełniącym wiele ważnych funkcji w ekosystemach słodkowodnych, jak również organizmem modelowym stosowanym w badaniach oddziaływania stresorów środowiskowych. Erytrocyty kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) są unikalnymi komórkami wykorzystywanymi w badaniach nad wpływem substancji bioaktywnych oraz czynników środowiskowych.

Celem tej pracy doktorskiej była analiza zastosowania L-PROL w łagodzeniu stresu termicznego u modelowego skorupiaka *Daphnia magna* oraz w erytrocytach kury domowej (*Gallus gallus domesticus*). W ramach badań sformułowano 3 główne cele badawcze. Pierwszy cel dotyczył określenia wpływu L-PROL w stężeniach: 10 mg/L, 20 mg/L i 50 mg/L na parametry pływania (unieruchomienie, gęstość toru pływania, prędkość pływania, zdolność do wykonywania skrętów) rozwielitek poddanych inkubacji przez 2, 24 oraz 48 godz. w temp. 22-38°C. Niewiele wiadomo na temat wczesnych wskaźników stresu cieplnego w erytrocytach ptaków, dlatego drugim celem badań było określenie wpływu stresu cieplnego na morfologię i główne parametry komórkowe erytrocytów kury domowej. Czerwone krwinki poddano działaniu temperatury w zakresie 22–45°C przez 1 godz. i 4 godz., a następnie przy wykorzystaniu barwionych preparatów zbadano komórki pod kątem

zmian morfologicznych. Określono również żywotność, cytotoksyczność i aktywność kaspazy 3/7. Niewiele jest dostępnych informacji dotyczących działania L-PROL na erythrocyty kury domowej. Dlatego też trzecim celem badań było określenie ochronnego wpływu tego aminokwasu w stężeniach 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL na erythrocyty kury domowej inkubowane w temperaturze 41-45°C przez 1 godz. i 4 godz. Określono następujące parametry komórkowe: żywotność, zmiany morfologiczne, aktywność kaspazy 3/7, aktywność białka szoku cieplnego HSP70 1A oraz poziom glutationu.

Wyniki uzyskane w pierwszym etapie badań wykazały, że L-PROL powoduje wzrost wszystkich mierzonych parametrów behawioralnych rozwielitek w temperaturze 22°C w porównaniu do grupy kontrolnej nie traktowanej aminokwasem. Ponadto, zwierzęta utrzymywane w temp. 35°C i eksponowane dodatkowo na L-PROL wykazywały zmniejszony stopień obniżenia parametrów behawioralnych w porównaniu do rozwielitek poddanych jedynie stresowi cieplnemu.

Ekspozycja erythrocytów kurzych na temperaturę w zakresie 43–45°C indukowała zmiany morfologiczne i powodowała zwiększenie aktywności proapoptotycznej kaspazy 3/7. Stwierdzono również hemolizę badanych komórek. Zmniejszenie liczby erythrocytów może być konsekwencją bezpośredniego uszkodzenia błony komórkowej lub rezultatem apoptozy.

Wyniki wykazały również, że ekspozycja erythrocytów kury na temp. 43°C i 45°C bez obecności L-PROL skutkowałą spadkiem ich żywotności i pojawieniem się wyraźnych zmian morfologicznych. Aktywność kaspazy 3/7 wzrosła jedynie w komórkach inkubowanych w temp. 45°C, natomiast aktywność HSP70 1A i poziom glutationu wzrastały w sposób zależny od temperatury. Z drugiej strony, erythrocyty dodatkowo eksponowane na L-PROL wykazywały zmienione parametry w porównaniu z komórkami bez obecności aminokwasu. L-PROL w stężeniu 50 µg/mL i 100 µg/mL zwiększała aktywność kaspazy 3/7 w komórkach inkubowanych zarówno w 41°C, jak i 43°C, jednak aktywność tego enzymu była mniej podwyższona w komórkach inkubowanych w 45°C i eksponowanych na wszystkie stosowane stężenia aminokwasu. Poziom glutationu obniżył się w erythrocytach poddanych stresowi cieplnemu w temp. 43°C i 45°C z L-PROL (przy 50 µg/mL i 100 µg/mL), ale wzrósł przy stężeniu 200 µg/mL. Aktywność HSP70 1A wzrastała w sposób zależny od stężenia aminokwasu i temperatury.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na to, że L-PROL stymuluje parametry behawioralne u *Daphnia magna* w temp. fizjologicznej i łagodzi zmiany parametrów pływania wywołane stresem cieplnym. Rezultaty te sugerują, że L-PROL obecna zawarta naturalnie w środowisku wodnym (np. w pokarmie) lub podawana w warunkach

hodowlanych może chronić skorupiaki przed stresem termicznym. Ponadto, wyniki uzyskane w badaniach z zastosowaniem erytrocytów kury sugerują możliwość dalszych badań nad zastosowaniem parametrów komórkowych, takich jak morfologia lub aktywność kaspazy 3/7 jako biomarkerów stresu cieplnego w diagnostyce. Uzyskane wyniki sugerują również, że L-PROL może być czynnikiem proapoptotycznym w stosunku do erytrocytów kury w fizjologicznej temperaturze, jednak aminokwas ten może hamować apoptozę przy wyższej temperaturze poprzez zwiększenie aktywności białka szoku cieplnego HSP70 i produkcję glutationu. Uzyskane wyniki wskazują także na fakt, że L-PROL w pewnym zakresie stężeń może łagodzić stres cieplny u zwierząt hodowlanych, co stwarza możliwość jej praktycznego zastosowania. Istnieje potrzeba dalszych badań nad molekularnymi mechanizmami termoprotekcji tego aminokwasu u zwierząt zmiennie- i stałocieplnych.

Słowa kluczowe: L-prolina, *Daphnia magna*, behavior pływania, erytrocyty kury, stres cieplny, apoptoza, glutation, HSP70

Summary

Heat stress is a more and more common disadvantageous environmental factor causing behavioral, physiological and biochemical disturbances in cold- and warm- blooded animals. Exposure of farm animals to high temperature may induce many problems such as immunosuppression, weight loss, decreased reproduction, and increased mortality, and in a consequence economic losses.

Scientific evidence indicate that edible crustaceans farmed in many regions of the world and poultry are particularly sensitive to thermal stress therefore currently various methods to alleviate disadvantageous effects are sought. Although the available studies revealed that some osmoprotectants belonging to amino acids alleviate harmful effects of high temperature in various biological systems relatively little is known about the protective effects of L-proline (L-PROL) which is also a structural amino acid of some proteins.

Studies on the effects of environmental stressors require using of sensitive biological models. Water flea (*Daphnia magna*) is a crustacean playing many important roles in freshwater aquatic ecosystems and a model organism used in studying the effects of environmental stressors. Erythrocytes isolated from hen (*Gallus gallus domesticus*) are unique cells used in studies on the influence of bioactive substances and environmental factors.

The aim of the study was to analyze the use of L-PROL in alleviating thermal stress in the model crustacean *Daphnia magna* and in erythrocytes of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). Three main aims of the studies were formulated. The first aim of the first stage of the research was to determine the effect of L-PROL in concentrations: 10 mg/L, 20 mg/L and 50 mg/L on swimming parameters (immobilization, swimming track density, swimming speed, turning ability) of *Daphnia magna* subjected to 2, 24 and 48 hours of incubation at a temperature of 22-38°C. Little is known about the early indicators of heat stress in avian erythrocytes. Therefore the other aim of the studies was to determine the effect of heat stress on the morphology and main cellular parameters of avian erythrocytes. Hen red blood cells were subjected to the temperature at the range of 22-45°C for 1 hour and 4 hours and then stained cells were examined under light microscopy to assess morphological changes. Cell viability, cytotoxicity and caspase 3/7 activity were also tested. Little is known about the protective effects of L-PROL on hens' red blood cells. Therefore, the aim of the study was also to determine the protective effect of this amino acid at the concentrations of 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL in erythrocytes of hens exposed to temperature at the range of 41-

45°C for 1 hour and 4 hours. The following cellular parameters were determined: viability, morphological changes, caspase 3/7 activity, activity of heat shock protein HSP70 1A and glutathione level.

The results obtained in the first stage of the studies showed that L-PROL increased all measured swimming parameters at 22°C compared to the control group. Moreover, L-PROL attenuated the inhibition of these parameters in the experimental animals subjected to 35°C in comparison to the water fleas subjected only to heat stress. Exposure of hen erythrocytes to heat stress at 43–45°C resulted in morphological changes and increased the activity of pro-apoptotic caspases 3/7. Hemolytic cells were also found. Reduction of the number of erythrocytes may be a consequence of direct damage to the cell membrane, or apoptotic changes.

The obtained results also showed that exposure of hen erythrocytes without the presence of L-PROL at 43°C and 45°C resulted in decreased viability and more distinct morphological changes in the cells. Caspase 3/7 activity increased only at 45°C, while HSP70 1A activity and glutathione levels increased in a temperature-dependent manner. On the other hand, erythrocytes additionally exposed to L-PROL showed changes of the parameter when compared to cells not exposed to the amino acid. L-PROL at a concentration of 50 µg/mL and 100 µg/mL increased the activity of caspase 3/7 both at 41°C and 43°C, but it was less increased at all the concentrations at 45°C. Glutathione levels decreased in the heat stressed hens (43°C and 45°C) erythrocytes with L-PROL (at 50 µg/mL and 100 µg/mL) but it increased at 200 µg/mL. HSP70 1A activity increased in a concentration- and temperature-dependent manner.

The results suggest that L-PROL stimulates swimming performance and mitigates heat stress-induced changes in swimming parameters in *Daphnia magna*. These findings could support the hypothesis that L-PROL present in the natural environment (mainly in food) or administered in farming conditions could protect crustaceans from thermal stress. Moreover, the obtained results obtained in the studies on hen erythrocytes suggest that morphological changes and caspase 3/7 activity in these cells suggest further experiments on the usefulness of these cellular parameters as biomarkers of heat stress in diagnostics. The obtained results also suggest that L-PROL may be considered as a pro-apoptotic factor at the physiological body temperature of the hen, but it may reduce the apoptotic response of erythrocytes at higher temperatures by increasing the activity of the heat shock protein HSP70 and the production of glutathione. The obtained results also suggest that L-PROL at certain concentration range induced a thermal protection of hen cells which suggest that this

amino acid may have a potential practical application in reduction of heat stress in farming animals. There is a need for further studies on the molecular mechanisms of thermoprotection in cold- and warm-blooded animals.

Key words: L-proline, *Daphnia magna*, swimming behaviour, hen erythrocytes, heat stress, apoptosis, glutathione, HSP70