

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

2118301

**VPLYV OLOVA NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS
GRANULÓZNYCH BUNIEK PRASNIČIEK *IN VITRO***

2010

Jana Lukáčová, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**VPLYV OLOVA NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS
GRANULÓZNYCH BUNIEK PRASNIČIEK *IN VITRO***

(Diplomová práca)

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	4.2.1 biológia
Školiace pracovisko:	Katedra fyziológie živočíchov
Školiteľ:	doc. Ing. Norbert Lukáč, PhD.

Nitra 2010

Jana Lukáčová, Bc.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Bc. Jana Lukáčová čestne prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému „Vplyv olova na antioxidačný status granulóznych buniek prasničiek *in vitro*“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry a ďalších informačných zdrojov.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 24. marca 2010

.....

Podpis

Pod'akovanie

Chcela by som poďakovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri spracovaní tejto diplomovej práce. Moje poďakovanie patrí najmä vedúcemu práce, doc. Ing. Norbertovi Lukáčovi, PhD., za vedenie, poskytnutie materiálu a za cenné pripomienky pri záverečnom spracovaní práce, takisto Ing. Adriane Kolesárovej, PhD. a Ing. Marcele Capcarovej, PhD., ako aj všetkým pracovníkom KFZ.

Diplomová práca bola finančne podporená prostredníctvom projektov APVV-SK-HU-000508, DVVČ-FBP-16/2009 a VEGA 1/0696/08.

Abstrakt

Voľné radikály predstavujú vysoko reaktívne častice s jedným alebo viacerými nespárenými voľnými elektrónmi. Porušením rovnováhy medzi voľnými radikálmi a antioxidantami v organizmoch nastáva oxidatívny stres, ktorý spôsobuje poškodenie lipidov, bielkovín, nukleových kyselín a porušenie bunkovej signalizácie. Oxidatívny stres negatívne ovplyvňuje nielen kvalitu a zrenie oocytov, ale aj ovuláciu a implantáciu. Cieľom našej práce bolo vyhodnotiť vplyv olova na koncentráciu superoxiddismutázy (SOD) a celkový antioxidačný status (TAS) kultivačných médií granulóznych buniek vaječníkov prasničiek *in vitro*. Granulózne bunky boli vystavené pôsobeniu rôznych koncentrácií zlúčeniny trihydrátu octanu olovnateho ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a na základe toho rozdelené následne do týchto skupín: skupina MAX ($5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$), skupina A ($2,5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$), skupina B ($0,83 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$), skupina C ($0,625 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$), skupina D ($0,455 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$) a kontrolná skupina bez olova. Celkový antioxidačný status a koncentrácia superoxiddismutázy granulóznych buniek boli analyzované spektrofotometrom Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) s použitím antioxidačného RANDOX kitu (Randox Labs, Crumlin, UK) podľa priloženého manuálneho návodu. Najvyššia hodnota TAS bola zistená v kontrolnej skupine bez olova v porovnaní s ostatnými skupinami (MAX, A, B, C, D). Štatistické analýzy ukázali signifikantne nižšiu hodnotu ($P < 0,05$) v skupine B. Najnižšia koncentrácia SOD spomedzi všetkých skupín bola zistená v kontrolnej skupine.

Kľúčové slová: granulózne bunky, olovo, oxidatívny stres, superoxiddismutáza, celkový antioxidačný status

Abstract

Free radicals are highly reactive particulates with one or several disparate free electrons. Disbalance between free radicals and antioxidants in organisms generates oxidative stress, which causes damage of lipids, proteins, nucleic acids and disruption of cell signaling pathways. Oxidative stress influences negative not only oocyte quality and maturation of oocytes but also ovulation and implantation. Aim of our work was evaluate influence of lead on concentration of superoxid dismutase (SOD) and total antioxidant status (TAS) cultivation media of porcine ovarian granulosa cells *in vitro*. Granulosa cells were exposed to influence of different concentration lead acetate trihydrate ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and were allocated basically in these groups as follows: group MAX (5 mg Pb.10 mL⁻¹), group A (2,5 mg Pb.10 mL⁻¹), group B (0,83 mg Pb.10 mL⁻¹), group C (0,625 mg Pb.10 mL⁻¹), group (0,455 mg Pb.10 mL⁻¹) a control group without lead treatment. The total antioxidant status and superoxid dismutase concentration were analyzed by spectrophotometer Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) using antioxidant RANDOX kits (Randox Labs, Crumlin, UK) according to the manual instructions. The highest TAS was detected in the control group without lead treatment comparison with other groups (MAX, A, B, C, D). Statistical analyses showed significantly lower value ($P < 0,05$) in group B. The concentration of SOD was the lowest in control group in comparison to those exposed to *in vitro* lead culture.

Key words: granulosa cells, lead, oxidative stress, superoxid dismutase, total antioxidant status

Obsah

Obsah.....	6
Zoznam skratiek a značiek.....	7
Úvod.....	9
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí.....	11
1.1 Vaječníky	11
1.1.1 Folikulogenéza.....	11
1.1.2 Granulózne bunky.....	12
1.1.3 Oogenéza	13
1.1.4 Štruktúra samičej pohlavnej bunky.....	14
1.2 Voľné radikály	15
1.2.1 Radikály odvodené od kyslíka (ROS)	16
1.2.2 Radikály odvodené od dusíka (RNS).....	19
1.2.3 Radikály odvodené od organických zlúčenín	21
1.3 Oxidatívny stres	21
1.3.1 Poškodenie nukleových kyselín voľnými radikálmi.....	22
1.3.2 Oxidačné poškodenie bunkových membrán lipoperoxidáciou.....	23
1.3.3 Oxidačné poškodenie proteínov.....	24
1.4 Olovo	26
1.5 Vplyv oxidatívneho stresu na reprodukčné funkcie samíc	27
1.5.1 Oxidatívny stres a poškodenie oocytov	27
1.5.2 Oxidatívny stres a funkcia vaječníkov.....	28
1.6 Mechanizmy protektivity voči účinku voľných radikálov.....	28
1.6.1 Nízkomolekulové endogénne antioxidanty	29
1.6.2 Vysokomolekulové endogénne antioxidanty.....	32
1.6.3 Enzýmové antioxidačné systémy.....	33
2 Cieľ práce	36
3 Metodika práce a metódy skúmania	37
4 Výsledky práce	41
5 Diskusia.....	45
6 Záver	50
5 Zoznam použitej literatúry	51

Zoznam skratiek a značiek

- ABTS – 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonát]
ART – technika asistovanej reprodukcie
ATP – adenozintrifosfát
Cd – kadmium
CG – kortikálne granuly
(-CH₂-) – metylénová skupina
DMEM/F12 – Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12
DNA – kyselina deoxyribonukleová
E₂ – estradiol
FSH – folikulostimulačný hormón
GPx – glutatiónpoxidáza
GSH – glutatión
GST – glutatiónterferázy
hCG – humánný choriový gonadotropín
Hg – ortuť
H₂O₂ – peroxid vodíka
HNE – 4-hydroxynonenal
IL-1 – interleukín-1
INT – 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chlorid
IVF – *in vitro* oplodnenie
KAT – kataláza
L• – lipidový radikál
LH – nenasýtený lipid
LH – luteinizačný hormón
LOO• – lipoperoxylový radikál
LOOH – lipoperoxid
MDA – malondialdehyd
mtDNA – mitochondriálna DNA
NADPH – nikotínamidadenínindinukleotidfosfát
NADPH-oxidáza – nikotínamidadenínindinukleotidfosfát –oxidáza
Ni – nikel
NO• – radikálová forma oxidu dusnatého

$^1\text{O}_2$ – singletový kyslík
 $\text{O}_2^{\cdot-}$ – superoxidový radikál
 $\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$ – trichlórmetylperoxylový radikál
 $\cdot\text{OH}$ – hydroxylový radikál
OMD – dynamika ooplazmatických mikrotubúl
 ONOO^- – peroxonitrit
OS – oxidatívny stres
Pb – olovo
RMO – reaktívne metabolity kyslíka
RNS – reaktívne formy dusíka
ROS – reaktívne formy kyslíka
 $\text{RO}\cdot$ – alkoxylový radikál
 $\text{RO}_2\cdot$ – alkylperoxylový radikál
 $\text{ROO}\cdot$ – peroxylový radikál
ROOH – alkylperoxid
 $\text{RS}\cdot$ – alkylsulfanylový radikál
 $\text{RSO}_2\cdot$ – alkyltioperolový radikál
(-SH-) – tiolová skupina
SOD – superoxiddismutáza
TAS – celkový antioxidačný status
 $\text{TNF-}\alpha$ – tumor nekrotizujúci faktor α
VKK – vyššie karboxylové kyseliny
VNKK – polonasýtené vyššie karboxylové kyseliny
XOD – xantínoxidáza
ZP – receptorové proteíny *zona pellucida* (ZP1, ZP2, ZP3)
ZPDT – čas rozpadu *zona pellucida*
3 β HSD – 3 β -hydroxysteroiddehydrogenáza
17 β HSD – 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáza

Úvod

V posledných rokoch sú voľné radikály často diskutovanou témou v odborných kruhoch, ale aj vo sfére laickej verejnosti. Je o nich známe, že sa podieľali na vzniku života na Zemi, ale zároveň rôznym spôsobom prispievajú aj k jeho zániku.

Z chemického hľadiska predstavujú voľné radikály veľmi reaktívne atómy a molekuly s jedným alebo viacerými nespárovanými voľnými elektrónmi. K najtoxickejšiemu radikálom patrí superoxidový radikál, vytváraný mitochondriálnym elektrónovým transportným reťazcom, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri poškodení lipidov, DNA a bielkovín a tvorbe iných voľných radikálov (singletový kyslík, peroxid vodíka, hydroxilový radikál). Ďalšími nebezpečnými radikálmi sú hydroxilový radikál, ktorý reaguje s proteínmi, lipidmi a nukleovými kyselinami, a oxid dusnatý, ktorý patrí k radikálom odvodeným od dusíka.

Voľné radikály zohrávajú v živote organizmov dôležitú úlohu. Pozitívne ovplyvňujú imunitný systém organizmu a uplatňujú sa pri ničení vírusov a baktérií. Zapájajú sa tiež do tvorby enzýmov a hormónov a podieľajú sa na tvorbe energie potrebnej pre organizmus.

Okrem tohto pozitívneho účinku majú voľné radikály aj oveľa dôležitejší negatívny vplyv na organizmus. V dôsledku porušenia rovnováhy medzi prooxidantami a antioxidačnými mechanizmami v organizme nastáva oxidatívny stres, následkom ktorého dochádza k oxidatívnemu poškodeniu proteínov, lipidov, DNA, ktoré môže viesť k poškodeniu bunkových membrán, porušeniu činnosti a funkcie buniek a tkanív.

So škodlivým vplyvom voľných radikálov sa spájajú mnohé ochorenia, napríklad Alzheimerova a Parkinsonova choroba, ochorenia srdca a ciev, mozgu, pankreasu, ďalej astma, rakovina, diabetes mellitus, tiež ochorenia reprodukčnej sústavy.

Oxidatívny stres v samičom reprodukčnom systéme významne ovplyvňuje najmä kvalitu a zrenie oocytov, ovariálnu steroidogézu, ovuláciu, luteolýzu, oplodnenie, vývoj embrya a implantáciu.

Olovo je jedným z najrozšírenejších ťažkých kovov, ktorý sa vyskytuje takmer všade. Vstrebávanie olova z vonkajšieho prostredia ovplyvňujú množstvo olovnatých zlúčenín, ich fyzikálno-chemické vlastnosti, fyziologický stav daného organizmu, ako aj stav orgánov, ktoré predstavujú vstupnú bránu pre olovo. Ďalšími dôležitými faktormi sú vek a pohlavie.

Ochranu organizmu voči škodlivému účinku voľných radikálov zabezpečujú rozmanité

antioxidačné ochranné systémy. K najvýznamnejším antioxidantom patrí superoxiddismutáza, ktorá premieňa superoxidový radikál na kyslík a peroxid vodíka, ktorý je potom odstránený ďalšími dôležitými antioxidantami glutatiónpoxidázou alebo katalázou. K ďalším významným antioxidantom patria tiež vitamíny E a C, karotenoidy, flavonoidy a glutatión.

1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí

1.1 Vaječníky

Vaječníky (*ovaria*) sú párové pohlavné žľazy uložené v brušnej dutine. V nich sa vyvíjajú a dozrievajú samičie pohlavné bunky – oocyty. Vaječníky prasnice sú podlhovasté orgány hroznovitého tvaru dlhé asi 5 cm. Na ich povrchu sa nachádza veľké množstvo dozrievajúcich folikulov a žltých teliesok. Mezoovária sú veľmi dlhé, takže vaječníky zostupujú hlboko do brušnej dutiny. *Bursa ovarica* je veľmi hlboká a široká. Vaječníky súčasne predstavujú aj žľazy s vnútornou sekréciou, v ktorých sa tvoria samičie pohlavné hormóny – estrogény resp. progesterón (Popesko et al., 1992; Massányi, 1996).

Na vaječníku sa rozlišuje kôrová časť (*zona corticalis*), ktorú pokrýva vrstva plochých až kubických buniek tzv. zárodočný – germinálny epitel, pod ktorým je vrstva hustého väziva – *tunica albuginea*, a dreňová časť (*zona medullaris*), ktorá je zložená z riedkeho väziva. Obsahuje aj hladkosvalové bunky a vetvia sa v nej cievy a nervy.

Kôra vaječníka obsahuje vaječníkové folikuly a žlté telieska. Každý folikul sa skladá z vajcovej bunky a obalu (Popesko et al., 1992; Massányi, 1996).

1.1.1 Folikulogenéza

Vaječníkové folikuly (*folliculi ovarici*) sú váčiky obsahujúce samičie pohlavné bunky v rôznom štádiu vývoja. Podľa mikroskopickej štruktúry možno rozlíšiť tri typy vaječníkových folikulov: primárne (primordiálne, odpočívajúce), sekundárne (rastúce) a terciárne (dozrievajúce, Graafove) folikuly (Massányi, 1996).

Primárne folikuly sa skladajú z centrálne uloženého oocytu I. radu, okolo ktorého sa nachádza súvislá vrstva plochých folikulárnych buniek. Oocyt I. radu má veľké, svetlé, excentricky uložené jadro s veľkým jadierkom. Primárne folikuly sa zakladajú vo veľkom množstve v embryonálnom období a v jednom vaječníku ich má samica po narodení niekoľko stotisíc. Prevažná väčšina primárnych folikulov sa však ďalej nevyvíja a podlieha **atrézii**. K atrézii primárnych folikulov dochádza v priebehu celého života samice, najviac však pred pubertou a v období končiacej pohlavnej aktivity (Massányi, 1996).

V priebehu každého reprodukčného cyklu v závislosti na sekrécii gonadotropínu hypofýzou je skupina primárnych folikulov stimulovaná k rastu zahájením mitotickej aktivity folikulárnych buniek, ktorá pretrváva až pred ovuláciou. Vzrast populácie folikulárnych buniek a sekrécie folikulárnymi bunkami sú dva najdôležitejšie faktory rastu

folikulov (Chrenek, 2008).

S nástupom puberty sa jednotlivé primárne folikuly začínajú postupne zväčšovať a menia sa na sekundárne folikuly. **Sekundárny folikul** je rastúci primárny oocyt, ktorý je obalený viacerými vrstvami folikulárnych buniek. Tieto bunky tvoria obal nazývaný *zona pellucida*. Ak sa folikul ďalej vyvíja, folikulárne bunky sa rozmnožujú a vytvárajú okolo oocytu epitelový obal *stratum granulosum*. Tento obal je oddelený od okolitého väziva tenkou blankou (Slavjanského membrána) skladajúcou sa z retikulárnych a kolagénových vlákien. Väzivo susediace s rastúcim folikulom sa diferencuje vo väzivový obal folikulu (*theca folliculi*), v ktorom sa neskôr dajú rozlíšiť vnútorná (*theca folliculi interna*) a vonkajšia časť (*theca folliculi externa*). Bunky *theca folliculi interna* disponujú organelami typickými pre produkciu steroidných hormónov. Je to viac zrejme v preovulačnej fáze ako v luteálnej fáze. Paralelne s rastom folikulu vzrastá aj množstvo hladkého endoplazmatického retikula, tukových kvapiek a lyzozómov. Súbežne s tým klesá množstvo drsného endoplazmatického retikula (Popesko et al., 1992; Massányi, 1996; Krzysztofowicz a Stoklosowa, 2007).

Sekundárny folikul obsahuje dutinku (*cavum folliculi*), ktorá je vyplnená folikulárnou tekutinou (*liquor folliculi*). Táto tekutina je bohatá na pohlavné steroidy, peptidy (rastové faktory), mukopolysacharidy, gonadotropíny a ďalšie zložky (napr. renín, prostaglandíny, oxytocín) a reflektuje lokálnu produkciu buniek granulózy a téky, ako aj prienik látok hlavne z okolitých krvných ciev. Oocyt sa umiestni excentricky a ostáva obalený bunkami v podobe hrbolčeka – *cumulus oophorus*. Ďalším množením folikulárnych buniek a pribúdaním folikulárnej tekutiny dochádza k rastu folikulu a k tvorbe terciárneho folikulu (Pivko, 1995; Massányi et al., 1999).

Terciárne folikuly predstavujú posledné štádium vo vývoji folikulov. Graafove folikuly majú podobu mechúrka, ktorý na jednej strane prominuje nad povrch vaječníka a na druhej strane siaha hlboko do kôry. Stena Graafovho folikula, na strane odvrátenej od povrchu vaječníka, prominuje do dutiny folikula v podobe hrbolčeka (*cumulus oophorus*). Folikulárne bunky, ktoré sa nachádzajú po obvode oocytu a priamo nasadajú na *zona pellucida* sú usporiadané lúčovite, preto dostali pomenovanie *corona radiata*. Pri ovulácii odchádzajú spolu s uvoľneným vajíčkom (Massányi, 1996).

1.1.2 Granulózne bunky

Poces folikulogenézy, dozrievania a uvoľňovania oocytov je integrovaný s produkciou peptidov a steroidov bunkami granulózy (*stratum granulosum*) a téky (*theca folliculi*)

a závislý od prítomnosti gonadotropínov, folikulostimulačného hormónu (FSH) a luteinizačného hormónu (LH), čo je vlastne kompletná os hypotalamus – hypofýza-pohlavné orgány (Massányi et al., 1999).

Theca folliculi interna je tvorená jednou až dvoma vrstvami hypertrofovaných buniek a je dobre vaskularizovaná, zatiaľ čo *stratum granulosum* predstavuje viacvrstvový folikulárny epitel tvorený relatívne malými bunkami a bez vaskularizácie (Guraya, 1971).

Folikulárne (granulózne) bunky *stratum granulosum* a bunky *theca folliculi interna* vykazujú okrem iného aj dôležitú vnútornú sekrečnú aktivitu. Syntetizujú a do tkanivového a folikulárneho moku vylučujú folikulárne hormóny – estrogény (Guraya, 1971).

Produkcia estrogénov závisí od vzájomných vzťahov medzi bunkami granulózy a téky, ktoré sú selektívne citlivé na FSH a LH. Jedným z najzaujímavejších problémov fyziológie ovarií je mechanizmus zodpovedný za výber toho folikulu, ktorý má postúpiť konečný proces dozrievania až do štádia ovulácie. Prístupy k jeho objasňovaniu sa v súčasnosti zakladajú na koncepcii „dve bunky – dva gonadotropíny“, ktorou sa vysvetľuje tiež mechanizmus biosyntézy estrogénov vo folikule. Ide o syntézu androgénov v intersticiálnych bunkách téky, ktorú stimuluje LH (prvá bunka a prvý gonadotropín). Vylúčený androstendión difunduje cez *lamina basalis* do folikulárnej tekutiny a preniká do granulóznych buniek, kde sa z neho tvorí estradiol pôsobením aromatázy, pričom proces prebieha pod stimulačným účinkom FSH (druhá bunka a druhý gonadotropín). Prvým krokom pri výbere folikulov je pravdepodobne tento účinok FSH. LH stimuluje produkciu androstendiolu a testosterónu z cholesterolu tekálnymi bunkami. FSH stimuluje bunky granulózy k aromatizácii androgénov produkovaných bunkami téky na estrón a estradiol (E_2). Mechanizmus závisí na rýchlom zvýšení zastúpenia E_2 vo vaječníku, ktoré stimuluje mitózu buniek a zvýšenie počtu FSH receptorov (Massányi et al., 1999).

1.1.3 Oogenéza

Proces vývoja a rastu samičích pohlavných buniek – gamét vo vaječníku označujeme ako **oogenéza** (Soltner, 1989).

Oogenéza sa delí na obdobie **množenia**, obdobie **rastu** a obdobie **zrenia**.

Zo zárodočného epitelu v období **množenia** vypučia do tkanív vaječníka pruhy buniek, z ktorých vznikajú vaječné váčky. Dochádza k mnohonásobnému mitotickému deleniu oogónií za prítomnosti 2 centriol umiestnených na oboch póloch deliaceho vretienka. Po skončení mitotickej proliferácie obe centrioly miznú a ďalej prebieha meiotické delenie bez prítomnosti centriolov. Na konci obdobia množenia vstupujú oogonie

do profázy I. meiotického delenia a stávajú sa z nich primárne oocyty (**oocyty I. radu**). (Malina, 2004; Kulíšek et al., 2006).

Primárne oocyty vstupujú do **rastovej fázy**, ktorá vedie k obrovskému zväčšeniu oocytu. Počas celej rastovej fázy je jadro primárneho oocytu v profáze I. meiotického delenia (v diplotennom štádiu) a zostáva v ňom až do puberty, kedy vývoj oocytov pokračuje (meióza pokračuje až pred ovuláciou príslušného vajíčka). Po celú dobu je v bunke prítomný mitotický aparát (deliace vretienko), ktorý je zodpovedný za bezchybný rozostup chromozómov. Rastúci oocyt primárneho folikulu syntetizuje veľké množstvo mRNA. Táto mRNA kódujúca proteíny *zona pellucida* je produkovaná oocytom a leží na jeho cytoplazmatickej membráne. V období rastu dochádza k vzniku primárnych folikulov, k formovaniu *zona pellucida* a k pridaniu ďalších vrstiev folikulárnych buniek (<http://genetika.wz.cz>; Popesko et al., 1992; Massányi et al., 1999).

V štádiu **meiózy – zrenia** prebiehajú dve za sebou nasledujúce delenia. Pri prvom delení vznikajú z oocytov I. radu dve nerovnako veľké bunky. V jednej ostáva všetka cytoplazma a jedno jadro s kompletnou sadou chromozómov – **oocyt II. radu**, druhú bunku, označovanú ako prvé pólové teliesko, tvorí jadro s kompletnou sadou chromozómov a nepatrné množstvo cytoplazmy. Oocyt II. radu nachádzajúci sa v Graafovom folikule sa počas ovulácie uvoľní a dostáva sa do lievika vajcovodu. V prípade oplodnenia penetráciou spermie do oocytu II. radu počas druhého meiotického delenia sa oocyt rozdelí na dve nerovnaké bunky, ale už s polovičným počtom chromozómov. Tak z oocytu II. radu vzniká jedna bunka s veľkým množstvom cytoplazmy – zrelé vajíčko a druhá s nepatrným množstvom cytoplazmy – druhé pólové teliesko. Obidve pólové telieska zanikajú počas delenia embrya (Kliment et al., 1989; Soltner, 1989).

1.1.4 Štruktúra samičej pohlavnej bunky

Vajíčko (*ovum*, *oocyt*) je samičia pohlavná bunka, ktorá sa vyvíja a dozrieva v samičom pohlavnom orgáne – vaječníku (*ovarium*).

Zatiaľ čo spermie väčšiny živočíšnych druhov majú približne rovnakú dĺžku (asi 50 μm), vajíčka sú značne variabilné v priemere a objeme. Vajíčko ošípanej má asi 150 – 180 μm (Wessels a Hopson, 1998).

Vajíčko je tvorené **jadrom**, ktoré je nositeľom genetickej informácie, **cytoplazmou** a **vajíčkovými obalmi**.

Jadro (*nucleus*) je veľké asi 25 – 50 μm . Je svetlé, mechúrikovitého vzhľadu, chudobné na chromatín s veľkým, okrúhlym jadierkom. Je uložené excentricky. Okolo silnej jadrovej membrány sa vytvára zóna cytoplazmy bez inklúzií (Kulíšek et al., 1996).

Cytoplazma vajíčka obsahuje mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, žltkové inklúzie, cytocentrum, vakuoly a v periférnych oblastiach cytoplazmy pod plazmaleomou sa nachádzajú zrníčka, tzv. kortikálne granuly. V cytoplazme sa ďalej nachádzajú lipidy (najmä vo forme tukových kvapiek), glykogén, mukopolysacharidy a RNA. Žltkové inklúzie sú tvorené bielkovinami a lipidmi. Sú zdrojom energie pre vývoj zygoty, ale sú aj substrátom pre syntézu protoplazmy množiacich sa buniek zárodka. Pri ich vzniku spolupôsobia Golgiho aparát a mitochondrie (Kulíšek et al., 1996).

Cytoplazma vajíčka je obalená tenkou **žltkovou blanou** (*membrana vitellina*), ktorá predstavuje cytoplazmatickú membránu vajíčka. Vytvára mikrokľky vybiehajúce k *zona pellucida* (Kulíšek et al., 2006).

Zona pellucida predstavuje extracelulárnu glykoproteínovú matrix, ktorá obklopuje oocyt a skoršie vývinové štádiá embrya a zohráva dôležitú úlohu v priebehu folikulogenézy, ovulácie, oplodnenia vajíčka a transportu embrya (Wassarman et al., 1999; Blackmore et al., 2004).

U väčšiny cicavcov sa *zona pellucida* skladá z 3 alebo 4 hlavných receptorových proteínov (ZP), ktoré sú produktom troch skupín génov – *ZPA*, *ZPB*, *ZPC* (Harris et al., 1994).

Receptorovými proteínmi sú *ZP1*, *ZP2* a *ZP3* proteíny. *ZP1* proteín slúži ako stavebná zložka membrány. Z hľadiska oplodnenia majú najdôležitejšiu úlohu *ZP2* a *ZP3* proteíny. *ZP3* je primárnym receptorom spermii a *ZP2* je sekundárnym receptorom, ktorý viaže spermie po akrozómovej reakcii (Massányi et al., 1999).

Na povrchu vajíčka sa nachádza *corona radiata*, ktorú tvorí niekoľko vrstiev folikulárnych buniek, ktorých cytoplazmatické výbežky zasahujú cez *zona pellucida* až k žltkovej membráne vajíčka. Tieto folikulárne bunky pochádzajú z ovulačného hrbolčeka terciárneho (mechúrikovitého, Graafovho) folikulu vaječníka (Kulíšek et al., 2006).

1.2 Voľné radikály

Voľné radikály majú v živote organizmov veľký význam. Sú súčasťou imunitného

systemu a slúžia organizmu pri ničení mikroorganizmov: vírusov a baktérií. Sú tiež zapojené do tvorby hormónov a enzýmov, potrebujeme ich k tvorbe energie a rôznych látok nevyhnutných pre organizmus (Zachar et al., 2004).

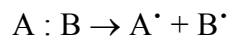
Voľné radikály sú atómy a molekuly s jedným alebo viacerými nespárenými elektrónmi v ich elektrónovom obale. Sú normálnou súčasťou živočíšneho a ľudského metabolizmu (McCord, 2006).

Voľné radikály môžu veľmi rýchlo reagovať s biologicky významnými molekulami, ako sú lipidy, proteíny a nukleové kyseliny, a tak ich **poškodzovať primárne**. Pri týchto alebo vzájomných reakciách sa môžu tvoriť produkty, napr. aldehydy, ktoré potom spôsobujú **sekundárne poškodenia** buniek a organizmov (Ďuračková et al., 1999).

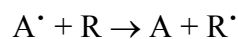
Nekontrolované vytváranie voľných radikálov vedie k deštrukcii buniek, tkanív a orgánov. Preto je nevyhnutné poznanie vnútorných a vonkajších zdrojov voľných radikálov, ako aj vnútorného ochranného mechanizmu, ktorého úlohou je chrániť bunky proti toxickým účinkom voľných radikálov (McCord, 2006).

Z chemického pohľadu môžu vznikať nasledovnými typmi reakcií:

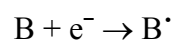
a) **homolyticky** – rozpadom kovalentnej väzby vplyvom radiácie, ultrafialového alebo ionizujúceho žiarenia, viditeľného svetla v prítomnosti fotosenzorov, tepelnou degradáciou organických materiálov a podobne:



b) **oxidáciou** látky A dochádza ku strate elektrónu a vzniká radikál R[•]:



c) **redukciou** látky B dochádza ku vzniku radikálu B[•]:



V biologických systémoch vznikajú radikály najmä elektrónovým prenosom (Muchová et al., 2004).

1.2.1 Radikály odvodené od kyslíka (ROS)

Radikály odvodené od kyslíka (ROS) sú nestabilné oxidované molekuly, ktoré sa tvoria ako prechodné produkty a predstavujú triedu silných oxidantov. ROS zahŕňajú napr. superoxidový radikál, peroxid vodíka a hydroxylový radikál. Sú schopné makromolekuly poškodzovať štruktúrne aj funkčne. Niektoré bunky vlastnia špecifické mechanizmy produkujúce ROS, ktoré sú potrebné v nízkych koncentráciách pre rôzne

bunkové funkcie. Aeróbne prostredie je stálym zdrojom ROS priamo *in vivo* mechanizmoch ako sú uvoľňovanie elektrónov počas biologickej oxidácie a fyzikálna aktivácia kyslíka externými činiteľmi - ožiarenie napr. UV žiarením slnečného svetla (Halliwell, 1989; Agarwal a Allamaneni, 2004).

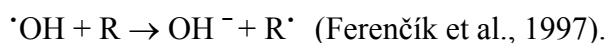
ROS sú charakterizované ich schopnosťou reagovať s inými molekulami, s ktorými prichádzajú do kontaktu a oxidatívne ich modifikovať. Modifikácia môže mať za následok štrukturálne a funkčné zmeny a narušiť mnohé bunkové procesy. V závislosti na ich koncentrácii v tkanivách môžu mať **pozitívne fyziologické vplyvy** (napr. plnia úlohu pri procese oplodnenia) alebo vyvolávať **patologické poškodenie** bunkových komponentov vrátane lipidov, proteínov a nukleových kyselín (Sharma a Agarwal, 1996).

ROS zohrávajú dôležitú úlohu pri formovaní žltého telieska a steroidogéze (Agarwal et al., 2005a).

Hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) sa tvorí viacerými metabolickými cestami, z ktorých najdôležitejšou je rozklad H_2O_2 katalyzovaný Fe^{2+} :



Hydroxylový radikál patrí medzi najtoxickejšie radikály. Podstatou jeho cytotoxickosti je silná oxidačná kapacita, ktorá sa prejavuje v schopnosti vytrhnúť elektrón z molekúl najrozličnejších zlúčenín, čím vzniká nový voľný radikál, ktorý môže oxidovať ďalšie látky:



Hydroxylový radikál reaguje s lipidmi, polypeptidmi, bielkovinami a DNA, zvlášť s tymínom a guanínom (Lee et al., 2004).

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je reaktívna forma kyslíka, ktorá má elektróny excitované na vyššej energetickej hladine ako molekula normálneho (základného) tripletového kyslíka. Keď sa tieto elektróny vracajú do základného stavu, emitujú svetlo (chemiluminiscencia), ktoré môže mať antimikróbne a cytotoxické účinky (Ferenčík et al., 1997).

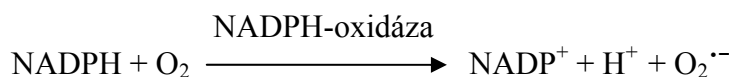
Singletový kyslík môže vznikáť pri reakcii superoxidu s hydroxylovým radikálom:



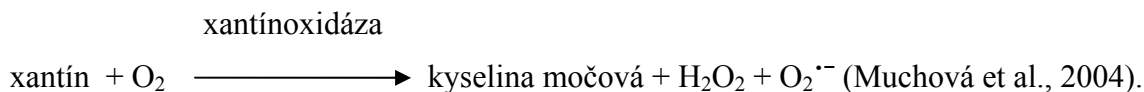
Reaguje najmä s nenasýtenými molekulami v mieste dvojitej väzby a môže sa tak spolupodieľať na peroxidácii lipidov. Singletový kyslík vzniká aj pri reakcii chlórnanu s peroxidom vodíka, čo je dôležité v leukocytoch, v myeloperoxidázovom mikrobicídnom systéme. Singletový kyslík je dôležitý vzhľadom na jeho chemickú reaktivitu. Patrí medzi účinné oxidanty nenasýtených lipidov, bielkovín, aminokyselín, cholesterolu a iných biologicky aktívnych substrátov, čo podmieňuje jeho cytoxickosť (Muchová et al., 2004).

Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) je redukovaná forma molekulového kyslíka vytvorená prijatím jedného elektrónu. Superoxid je prvý voľný radikál vytvorený mitochondriálnym elektrónovým transportným systémom. Mitochondria vytvára energiu využitím 4 elektrónových reťazových reakcií redukujúcich kyslík na vodu. Niektoré z elektrónov vznikajúcich touto reťazovou reakciou priamo reagujú s kyslíkom a tvoria superoxid (Harman, 2000).

V organizme však môže vznikať aj pri reakciách katalyzovaných enzýmami. Príkladom pozitívneho vzniku superoxidu je reakcia katalyzovaná NADPH-oxidázou v neutrofiloch. Vzniknutý superoxid podmieňuje celý rad následných reakcií, pričom vznikajú látky, ktoré sú súčasťou mikrobicídnych systémov fagocytov:



Na druhej strane enzým xantínoxidáza katalyzuje vznik superoxidu vo zvýšenej miere v bunkách napr. pri ischemicko-reperfúzných stavoch, čo je negatívnym príkladom tvorby superoxidu:

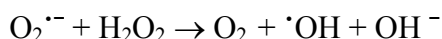


Superoxid zohráva dôležitú úlohu aj pri tvorbe iných voľných radikálov, ako sú peroxid vodíka, hydroxylový anión a singletový kyslík. Superoxid môže reagovať s oxidom dusnatým (NO^{\cdot}) a vytvoriť veľmi toxický peroxonitritový anión (ONOO^-) (Halliwell, 1997).

Superoxidový radikál môže iniciovať lipoperoxidáciu, oxidačné poškodenie proteínov, poškodenie DNA, ktoré môžu viesť k poruche funkcie a činnosti buniek a k smrti buniek apoptózou alebo nekrozou (McCord a Edeas, 2005).

Peroxid vodíka (H_2O_2) môže byť vytvorený počas dismutácie zo superoxidového aniónu pomocou superoxidodismutázy. Tiež enzýmy ako sú aminoacidoxidáza a xantinoxidáza produkujú peroxid vodíka zo superoxidového aniónu. Peroxid vodíka veľmi ľahko prechádza cez membrány. Je najmenej reaktívnou molekulou spomedzi všetkých radikálov odvodených od kyslíka a je stabilný pri fyziologickom pH a teplote za neprítomnosti iónov kovov (Lee et al., 2004).

Peroxid vodíka môže byť substrátom pre vznik voľných radikálov. H_2O_2 je slabé oxidačné činidlo, ale môže oxidovať tiolové (-SH-) skupiny proteínov, kedy oxidáciou špecifických tiolových skupín proteínov spúšťa vnútrobunkové metabolické pochody. Príčinou toxického účinku peroxidu vodíka je tvorba hydroxylového radikálu, ktorý vzniká **Haberovou-Weissovou reakciou**:



Reakcia je veľmi rýchla, ak je katalyzovaná napr. iónmi Fe^{2+} alebo Cu^+ (Muchová et al., 2004).

1.2.2 Radikály odvodené od dusíka (RNS)

Radikály odvodené od dusíka (RNS) zohrávajú tiež dôležitú úlohu v oxidatívnom strese a apoptóze (Chen et al., 2003).

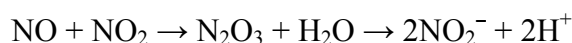
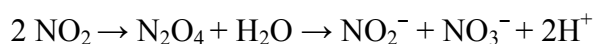
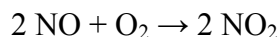
Sú spájané s astmou, ischemickým/reperfúznym poškodením, septickým šokom a aterosklerózou. K RNS patria napr. oxid dusnatý, dioxid dusnatý a peroxonitrit (Agarwal et al., 2005b).

Oxid dusnatý (NO) je vysoko reaktívny voľný radikál, ktorý poškodzuje proteíny, lipidy, uhľovodíky a nukleotidy a spolu s inými zápalovými mediátormi poškodzuje bunky a tkanivá (Agarwal et al., 2005b).

Oxid dusnatý (NO) patrí medzi základné signálne molekuly, pomocou ktorých je regulovaná medzibunková komunikácia a bunkové funkcie. NO je labilná

zlúčenina, ktorá veľmi rýchlo reaguje s hemoglobínom, myoglobínom, kyslíkom alebo superoxidom.

Pri neenzýmových reakciách s kyslíkom vo vodnom prostredí vznikajú ďalšie oxidy dusíka, dusitany a dusičnany:

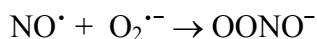


Následné reakcie týchto zlúčenín so sekundárnymi amínmi spôsobujú vznik kancerogénnych nitrózoamínov (Muchová et al., 2004).

NO je syntetizovaný počas enzymatickej premeny L-arginínu na L-citrulín pôsobením enzýmu **NO-syntázy**. Sú tri typy izoenzýmov NO-syntázy: endotelová NO-syntáza (NO-syntáza 3), neurónová NO-syntáza (NO-syntáza 1) a indukčná NO-syntáza (NO-syntáza 2). Neurónová NO-syntáza a endotelová NO-syntáza sú konštitutívne NO-syntázy a sú zodpovedné za nepretržité bazálne uvoľňovanie oxidu dusnatého. Indukčná NO-syntáza je prítomná v mononukleárných fagocytoch (monocyty a makrofágy) a produkuje veľké množstvo oxidu dusnatého. To je vyjadrené v odpovedi na prezápalové cytokíny a lipopolysacharidy. Indukčná NO-syntáza je aktivovaná cytokínmi ako je IL-1, TNF- α a lipopolysacharidmi (Agarwal et al., 2005b).

Keďže oxid dusnatý spôsobuje spomalenie starnutia oocytov, jeho prídavok môže byť použitý k prevencii starnutia oocytov, napr. pri ART a kmeňových bunkách skúmaných pre zvýšenie plodnosti (Goud et al., 2005a).

Patologicky najvýznamnejšia je reakcia NO \cdot so superoxidom, pričom vzniká toxický **peroxonitrit**:

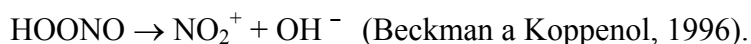


Fyziologické podmienky (pH 7,0) nie sú pre vznik peroxonitritu výhodné vzhľadom k nízkej koncentrácii NO \cdot a superoxidu, avšak pri intenzívnej syntéze NO \cdot a O $_2^{\cdot-}$ môže koncentrácia peroxonitritu dosiahnuť významnú mikromolárnu hladinu. NO \cdot je jediná biologická molekula produkovaná v koncentrácii postačujúcej ku kompetícii o superoxid so superoxidddismutázou. Peroxonitrit je oxidačným činidlom (Štípek et al., 2000).

Za fyziologických podmienok sa protonovaný peroxonitrit ako kyselina peroxidusitá rozkladá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (tiež voľný radikál):



Peroxonitrit (skôr než NO^\bullet) je *in vivo* zodpovedný za nitráciu a hydroxyláciu aminokyseliny tyrozínu. Tranzitné kovy vrátane kovov aktívnych centier superoxiddizmutázy a myeloperoxidázy katalyzujú jeho heterolytické štiepenie na hydroxidový anión a nitroniový kation, ktorému je pripisovaná schopnosť napadnúť fenolové zlúčeniny a *in vivo* v proteínoch meniť napr. tyrozín na 3-nitrotyrozín:



1.2.3 Radikály odvodené od organických zlúčenín

Je veľa organických látok, ktoré môžu mať voľný nespárený elektrón. Nespárený elektrón môže byť asociovaný s viacerými atómami. Napríklad tioly v prítomnosti iónov prechodných prvkov sa oxidujú na **alkylsulfanylový radikál** (RS^\bullet). Je to radikál síry, ktorý má značnú reaktivnosť. V prítomnosti kyslíka môže tvoriť **alkyltioperolový radikál** (RSO_2^\bullet), ale aj oxidovať ďalšie látky za tvorby iných radikálov (Muchová et al., 2004).

Radikály s nespáreným elektrónom na uhlíku vznikajú tak v životnom prostredí, ako aj v mnohých biologických systémoch. Napríklad v priebehu metabolizmu tetrachlórmetánu v mikrozómoch pečene vzniká **trichlórmetrylový radikál**, ktorý v prítomnosti kyslíka tvorí **trichlórmetrylperoxylový radikál** ($^\bullet\text{O}_2\text{CCl}_3$).

Sú známe aj radikály s nespáreným elektrónom na dusíku, napr. **fenyldiazínový radikál** sa tvorí v priebehu oxidácie fenylylhydrazínu v erythrocytoch (Muchová et al., 2004).

1.3 Oxidatívny stres

Reaktívne metabolity kyslíka spôsobujú poškodenie biologicky významných molekúl prevažne tým, že ich oxidujú. Všeobecne sa preto volajú prooxidanty. Pre aeróbnny život je charakteristická neustála tvorba prooxidantov vyvážená ich spotrebou buď v niektorých fyziologických procesoch, napr. pri usmrtení mikróbov pri fagocytóze, alebo ich elimináciou ochrannými systémami. Zachovanie integrity bunky a jej fyziologických funkcií vyžaduje rovnováhu systémov prooxidant - antioxidant (Jakuš a Lopuchová, 1999).

Pokiaľ prevládnu ROS alebo sa spomalí ich odstraňovanie, poruší sa oxidoredukčná rovnováha, ROS patologicky oxidujú biomolekuly a narušia metabolizmus buniek (Kalousová et al., 2006).

Vtedy nastáva **oxidatívny stres** (OS), pri ktorom sú bunky vystavené nadmernému množstvu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) ako dôsledok nerovnováhy medzi prooxidantami a antioxidačnými ochrannými mechanizmami (Zalba et al., 2000).

Hĺbka poškodenia oxidačným stresom závisí od viacerých faktorov. Je to jednak druh poškodzovanej molekuly (proteíny, lipidy, nukleové kyseliny), mechanizmus, akým sa poškodzovanie uskutočňuje (chémiá fentonového typu, indukcia určitým liekom alebo xenobiotikom, aktivácia enzýmov, napr. NO-syntázy, xantínoxidázy) a typ oxidačného stresu (Ďuračková et al., 1999).

K oxidatívne poškodeniu môže dochádzať na úrovni biomolekúl (DNA, lipidy, proteíny), enzýmov a bunkovej signalizácie.

1.3.1 Poškodenie nukleových kyselín voľnými radikálmi

Poškodenie DNA sa môže uskutočniť na purínovej alebo pyrimidínovej heterocyklickej zásade, alebo na sacharidovej jednotke. Oxidácia dusíkových zásad je príčinou mutácií a oxidačné poškodenie deoxyribózy môže indukovať štiepenie buď jedného alebo oboch reťazcov dvojzávitnice DNA, pričom vznikajú tzv. zlomy (Muchová et al., 2004).

Za poškodenie dusíkových zásad aj deoxyribózy je zodpovedný najmä **hydroxylový radikál**, ktorý je schopný eliminovať atóm H z deoxyribózy a aj sa adovať na dusíkové zásady. Najcitlivejšie miesto na oxidačný účinok hydroxylového radikálu sú C₅ - C₆ dvojité väzby na pyrimidínoch a C₄, C₅ a C₈ purínov, kde [•]OH vytrháva elektrón a nie atóm H. **Superoxid a peroxid vodíka** sa pravdepodobne priamo nezúčastňujú na štiepení DNA. Môžu pôsobiť sekundárne ako medziprodukty pri tvorbe hydroxylového radikálu (Muchová et al., 2004).

Mitochondria aj jadro majú svoju vlastnú DNA. Mitochondrie sú prvým miestom ovplyvneným prítomnosťou ROS vyvolávajúcich poškodenie. Uvoľňujú veľké množstvo ROS do okolitého prostredia a majú za následok zastavenie bunkového cyklu a bunkovú smrť. **Mitochondriálna DNA (mtDNA)** je oveľa citlivejšia na oxidatívne poškodenie ako jadrová DNA kvôli nedostatku ochranných proteínov, histónov a kvôli tesnej polohe reaktívnych druhov kyslíka k produktívnym systémom (Lee et al., 2004).

Taktiež **jadrová DNA** môže byť poškodzovaná radikálovým mechanizmom, čím dochádza k chybnému párovaniu báz pri replikácii DNA a zavedeniu chyby do genetickej informácie (napr. zámena páru GC za AT s následnou transverziou GC na TA) (Kroncke et al., 1997; Štípek et al., 2000).

Citlivosť DNA na oxidatívne poškodenie je indikovaná prítomnosťou oxidatívne modifikovaných látok ako napr. **8-hydroxy-2-deoxyguanozín**, ktorý môže byť použitý ako biomarker pre určenie rozsahu poškodenia DNA vyvolaného ROS (Agarwal a Allamaneni, 2004).

Poškodenie DNA spôsobuje mutácie a zmeny v génovej expresii. Prítomnosť veľkého počtu bodovej mutácie mtDNA a prešmykovanie môže závažne znížiť schopnosť mitochondrií tvoriť ATP a tak zrelé oocyty obsahujú menšie množstvo ATP. Oxidatívny stres zapríčiňuje poškodenie meiotického deliaceho vretienka a chromozómové zmeny, ktoré vedú k nízkej kvalite oocytov (Choi et al., 2007).

1.3.2 Oxidačné poškodenie bunkových membrán lipoperoxidáciou

Pod peroxidáciou lipidov sa rozumie oxidačné poškodenie polynасыtených vyšších karboxylových kyselín (VNKK), ktoré sú zložkou membránových fosfolipidov. Čím je vyššia karboxylová kyselina (VKK) viac nenasýtená, tým je citlivejšia na oxidačné poškodenie. VNKK len s jednou dvojitou väzbou (napr. kyselina olejová) sa lipoperoxidáciou takmer nepoškodzujú. Vhodnými substrátmi na oxidačné poškodenie sú kyseliny s dvoma a viacerými dvojitými väzbami (Muchová et al., 2004).

Porucha mastných kyselín má za následok tvorbu rozličných oxidačne modifikovaných produktov, ktoré sú toxické pre bunky a ktoré sú nakoniec premenené na stabilné konečné produkty. Lipoperoxidáciou sa tvoria lipidové peroxidy, ktoré sa môžu rozložiť na vysoko cytotoxické produkty ako sú aldehydové a alkoxylové radikály. Peroxidácia mastných kyselín vedie k strate membránovej fluidity, permeability a integrity, redukcii aktivity membránových enzýmov a iónových kanálov. Tieto procesy sú považované za patobiochemické mechanizmy spojené s iniciačnou alebo pokročilou fázou rôznych chorôb. V dôsledku toho, normálne bunkové mechanizmy, ktoré sú potrebné pre oplodnenie, sú inhibované (Valenzuela et al., 2003; Agarwal a Allamaneni, 2004).

Lipoperoxidácia mitochondriovej membrány spôsobí napučanie až lýzu mitochondrie. Narušenie mitochondriovej membrány môže viesť k poškodeniu dýchacieho reťazca a zníženiu tvorby energie vo forme ATP. To má vážne patologické následky a môže viesť

až k bunkovej smrti (Jakuš a Lopuchová, 1999).

Lipoperoxidáciu môžu spôsobiť aj kovy - ortuť, kadmium, olovo, vanád a cín (Jakuš a Lopuchová, 1999).

Peroxidácia lipidov začína účinkom akéhokoľvek faktora, ktorý má dostatočnú schopnosť odobrať vodíkový atóm z metylénovej skupiny (-CH₂-) nenasýteného lipidu (LH) za tvorby lipidového radikálu (L[•]) (**iniciácia**). Môže to byť napr. hydroxylový radikál ([•]OH), peroxylový radikál (ROO[•]) alebo alkoxylový radikál (RO[•]). V molekule lipidového radikálu sa preskupia dvojité väzby a vznikne radikál s konjugovanými dvojitými väzbami. Takýto radikál veľmi rýchle reaguje s kyslíkom za tvorby lipoperoxylového radikálu (LOO[•]). Tento je schopný reagovať s ďalšou molekulou lipidu (LH) a tvoria sa ďalšie radikály (L[•]), čím nastáva vetvenie (**propagácia**) reakcie. Z pôvodnej VNKK vzniká lipoperoxid (hydroperoxid) (LOOH). Nasleduje **sekundárna iniciácia** reakcie, ktorú spúšťajú lipidové radikály, ktoré vznikli z hydroperoxidov. Ukončenie (**terminácia**) reakcií nastáva vzájomnou rekombináciou lipidových radikálov alebo ich reakciou s inhibítormi (antioxidantmi) (Muchová et al., 2004).

Lipidové hydroperoxydy sa považujú za primárne produkty peroxidácie lipidov. Nie sú však stále a najmä v prítomnosti iónov prechodných kovov (Cu, Fe) sa môžu rozkladať. Vznikajú sekundárne produkty peroxidácie lipidov, mnohé biologicky aktívne látky. Viaceré z nich sa využívajú ako markery lipoperoxidácie. Sú to napríklad **malondialdehyd** (MDA, HOC-CH₂-COH), **4-hydroxynonenal** (HNE) a iné (Muchová et al., 2004).

Malondialdehyd je genotoxická látka, ktorá spôsobuje zosieťovanie (crosslink) a polymerizáciu proteínov a nukleotidov vedúcu k mutáciám s následnou karcinogenitou. Jeho toxicita vyplýva z reaktivity s biologickými nukleofilmi, ako sú aminokyseliny a tioly. Zosieťovanie a polymerizácia súčastí bunkových membrán mení ich vlastnosti, ako napr. zníženie membránového potenciálu so zmenenou priepustnosťou pre ióny a organické zlúčeniny (Jakuš a Lopuchová, 1999).

1.3.3 Oxidačné poškodenie proteínov

Oxidačné poškodenie proteínov *in vivo* môže ovplyvniť funkciu receptorov, enzýmov, transportných proteínov, prípadne tvorbu nových antigénov, ktoré môžu vyvolávať rôznu imunitnú odpoveď (Ďuračková et al., 1999).

V proteínoch sa oxidujú sulfohydrylové skupiny, aminoskupiny a hydroxylujú sa benzónové jadrá – mení sa ich konformácia a funkcia, agregujú sa, sieťujú a reagujú so železom. Mení sa aktivita enzýmov a iónových púmp. Do buniek vnikajú vápenaté ióny (Kalousová et al., 2006).

Zmenené funkčné skupiny aminokyselín môžu vytvárať medzi sebou alebo s inými látkami (napr. aldehydmi alebo hydroxyaldehydmi) krížové väzby, čím sa celkom mení pôvodná podstata proteínu (Muchová et al., 2004).

Na charakterizovanie oxidačného poškodenia proteínov sa používa stanovenie karbonylových skupín, ktoré vznikajú reakciou oxidantov, napr. hydroxylových radikálov, s bočnými reťazcami aminokyselín, napr. lyzínovými alebo prolínovými jednotkami. Tieto karbonylové proteíny sú primárne produkty poškodenia proteínov a sú schopné poškodzovať ďalšie molekuly. Sú známe dva mechanizmy ich účinku – oxidačný a redukčný. Oxidačným pôsobením karbonylových skupín vznikajú hydroxyperoxy proteínov. Na ich redukciu sa v bunke vyčerpávajú významné reductanty ako je kyselina askorbová a glutatión. Pri redukčnom mechanizme pôsobí poškodený proteín ako reductant, redukuje ióny kovov na prooxidačnú formu ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). V oboch prípadoch dochádza k zvyšovaniu oxidačného stresu v bunkách (Muchová et al., 2004).

4-hydroxy-2-nonenal z oxidácie lipidov môže reagovať s bielkovinovými zvyškami lyzínu, histidínu a cysteínu. **Malondialdehyd** z lipidovej oxidácie reaguje s aminoskupinami bielkovín. **Radikál NO[•]**, ktorý je vnútrobunkový posol nervového, imunitného a kardiovaskulárneho systému, je syntetizovaný z L-arginínu za účasti NO-syntetázy v mitochondriách a zapríčiňuje oxidáciu proteínov. **Peroxonitritom** (ONOO^-) indukované proteínové modifikácie zahŕňajú oxidáciu –SH skupiny metionínu, cysteínu, tryptofánu alebo tyrozínu a proteínovú nitritáciu tyrozínových alebo tryptofánových zvyškov. Oxidácia proteínov spôsobuje zmeny signálu transdukčných mechanizmov, transportných systémov, enzýmových aktivít, aterosklerózu a stavy po reperfúzii ischémie (Berlett a Stadtman, 1997).

ROS zapríčiňujú lipoperoxidáciu polynenasýtených mastných kyselín v biologických membránach a v dôsledku toho nastávajú zmeny v aktivite membránových enzýmov a iónových kanálov, poruchy transportných membránových funkcií a zmeny molekulárnej bunkovej signalizácie a môžu sa tým ovplyvniť normálne bunkové mechanizmy potrebné pre oplodnenie (Štípek et al., 2000; Gupta et al., 2009).

$\cdot\text{OH}$ mení aktivitu enzýmov tým, že uvoľňuje železo z enzýmových centier Fe/S (napr. akonitáza, ferochelatáza). Tiež NO^\bullet sa viaže na železo v aktívnych centrách

mnohých enzýmov, ktoré tak inaktivuje (kataláza, cytochrom P-450, enzýmy s Fe/S-komplexami). Ribonukleotidreduktáza premieňa ribonukleotidy na deoxyribonukleotidy a je nevyhnutná pre syntézu DNA. NO^{*} tento enzým inaktivuje tým, že nitruje tyrozín v aktívnom centre enzýmu (Beckman a Koppenol, 1996; Kroncke et al., 1997).

1.4 Olovo

Olovo je najrozšírenejšie z ťažkých kovov. Vyskytuje sa v pôde, vodách i v atmosférických komponentoch biosféry. Predpokladá sa, že v oblastiach doteraz nekontaminovaných ľudskou činnosťou by nemala koncentrácia olova v ovzduší presiahnuť 1 ng.m⁻³ (Kováčik et al., 2000).

Hlavné zdroje olova sú prach, voda, kozmetika, prírodné liečivá a potrava (Lockitch, 1993).

Anorganické olovo je najrozsiahlšie preštudované zo všetkých toxických agensov (Nordberg et al., 2007).

Najdôležitejšou organickou zlúčeninou olova sú tetraetyl a tetrametyl olovo, ktoré sa používali v enormných množstvách v petrochemickom priemysle. Tieto zlúčeniny sú ľahko absorbované prostredníctvom inhalácie a cez pokožku a môžu zapríčiniť akútnu encefalopatiu (Nordberg et al., 2007).

Fyzikálna a chemická charakteristika olova

Hustota olova je 11,3g.cm⁻³. Olovo je ťažko rozpustné vo vode, ale dobre rozpustné v kyseline dusičnej a koncentrovanej kyseline sírovej. Väčšina olovnatých solí je ťažko rozpustná (napr. sírany alebo oxidy zlúčenín olova), ale výnimky sú napr. nitráty, chlorečnany a do určitej miery aj sulfáty a chloridy olova. Niektoré soli olova s organickými kyselinami sú nerozpustné (napr. šťavelan olovnatý) (Nordberg et al., 2007).

Olovo má elektrické vlastnosti dávajúce mu schopnosť napodobniť zinok a vápnik, ióny dôležité pre biologické systémy. Na stupnici medzi silnými a slabými kyselinami je považované za stredne silnú kyselinu. Má schopnosť viazať rozdielne donory atómov (napr. kyslík, dusík, síru a forfor) (Nordberg et al., 2007).

Toxicita olova

Toxické vplyvy olova sa môžu prejaviť v centrálnej a periférnej nervovej sústave, krvi (vrátane inhibície syntézy hému, ktorá tiež ovplyvňuje ostatné bunky), v obličkách

a kardiovaskulárnom, endokrinnom a imunitnom systéme, gastrointestinálnom trakte, tiež pri samičej a samčej reprodukcii (kvalita oocytov a spermií) (Nordberg et al., 2007).

Olovo sa do organizmu dostáva hlavne cez tráviaci trakt a inhaláciou. Vstrebané olovo sa portálnym obehom dostáva do pečene, z ktorej sa hlavným krvným obehom dostáva do celého tela. Časť sa ukladá do obličiek, časť sa močom vylúči von z tela. Predpokladá sa i jeho prechod do mlieka a málo i do slín (Kováčik et al., 2000).

Olovo sa akumuluje v kostre a zuboch, kde môže byť zistené *in vivo* metódami, ktoré odzrkadľujú jeho dlhodobú absorpciu. Olovo je tiež distribuované do vaječníkov (Nordberg et al., 2007).

Vstrebávanie olova významne ovplyvňujú fyzikálno-chemické vlastnosti kovu a jeho zlúčenín, fyziologický stav organizmu ako celku ako aj stav orgánov, ktoré sú vstupnou bránou pre olovo a ďalšie faktory ako sú vek a pohlavie (Kováčik et al., 2000).

U pohlavne dospelých samíc, granulózne bunky majú oba FSH aj LH receptory, ktoré sú maximálne exprimované na povrchu bunkovej membrány počas skorej a neskej proestrálnej fázy ovariálneho cyklu. Porušenie väzbových aktivít receptorov by mohlo odzrkadľovať zmeny v samičej fyziológii vplyvom kontaminácie z prostredia. Olovo môže ovplyvňovať naviazanie FSH a LH vo vaječníkoch a pokles hladiny gonádových steroidov. Olovo zapríčiňuje významnú redukciu vo väzbe gonadotropínu, ktorý mení steroidogénnu enzýmovú aktivitu granulóznych buniek. Tieto zmeny preukázali pozitívnu koleráciu so zmenami membrány granulóznych buniek (Nampoothiri a Gupta, 2006).

1.5 Vplyv oxidatívneho stresu na reprodukčné funkcie samíc

Pochopenie úlohy oxidatívneho stresu v tkanivách samičej pohlavnej sústavy je stále v rannom štádiu. ROS a antioxidanty boli objavené v folikulárnej tekutine, vo vajcovodovej tekutine, v oocytoch a embryách (Agarwal a Allamaneni, 2006).

Oxidatívny stres zohráva významnú úlohu v množstve samičích reprodukčných chorôb a stratégie na prekonanie ich škodlivých účinkov na samičiu reprodukčnú sústavu môžu pomôcť pri prevencii alebo riadení reprodukčnej patológie. OS môže byť zodpovedné za pokles množstva folikulov, za pokles kvality a poškodenie oocytov (Tarin, 1996; Gupta et al., 2009).

1.5.1 Oxidatívny stres a poškodenie oocytov

Oocyty môžu byť poškodené oxidatívnym stresom vo folikulárnom prostredí počas ich

dlhodobého zotrvania vo vaječníku alebo v dôsledku ustupujúcej zásoby kyslíka (Goud et al., 2004; Goud et al., 2005b).

Poškodenie oocytov zahŕňa zoslabenie dynamiky ooplazmatických mikrotubúl (OMD), predčasné uvoľnenie kortikálnych granúl (CG) a spevnenie *zona pellucida* (ZP) s nárastom času rozpadu ZP (ZPDT) (Goud et al., 2004).

1.5.2 Oxidatívny stres a funkcia vaječníkov

Voľné radikály zohrávajú významnú úlohu vo fyziologických procesoch vo vaječníkoch. Mnohé štúdie dokázali angažovanosť ROS vo folikulárnom tekutine, pri folikulogenéze a steroidogenéze (Agarwal et al., 2006).

Oxidatívny stres vplýva na žlté teliesko a steroidogézu *in vitro* a *in vivo*. Zistilo sa, že počas luteogenézy je expresia Cu/Zn SOD v rovnováhe s tvorbou progesterónu. Expresia mRNA Cu/Zn SOD v žltom teliesku počas tehotenstva bola oveľa vyššia ako v strede cyklu žltého telieska. Tento faktor zvyšujúci expresiu SOD počas tehotenstva zapríčinil zvýšenie koncentrácie humánneho choriového gonadotropínu (hCG) a môže byť príčinou apoptózy žltého telieska. Podobne antioxidantné enzýmy glutationperoxidáza a MnSOD sú považované za markery pre zrenie cytoplazmy a sú zistené len v metafáze II. oocytov. Znížený vývojový potenciál oocytov zo slabo prekrvených folikulov môže byť tiež prisudzovaný intrafolikulárnemu oksyličeniu (Agarwal et al., 2006).

Zvýšená inzulínová rezistencia a hyperhomocysteinémia môže byť príčinou oxidatívneho stresu pacientiek so syndrómom polycystických vaječníkov. Rosiglitazón znižuje zvýšenú koncentráciu malondialdehydu (MDA) a zvyšuje prítomnosť antioxidantov u žien so syndrómom polycystických vaječníkov. Znížená úroveň antioxidantov a zvýšená úroveň oxidatívneho stresu prispievajú k zvýšenej kardiovaskulárnej chorobnosti týchto pacientiek (Agarwal a Gupta, 2006).

1.6 Mechanizmy protektivity voči účinku voľných radikálov

V priebehu evolučného vývoja sa vyvinuli určité antioxidantné mechanizmy, ktorými sa bunka bráni proti poškodeniu spôsobenému nekontrolovaným oxidačným procesom.

Antioxidantný ochranný systém je tvorený **antioxidantami**, teda látkami, ktoré sú schopné v relatívne nízkej koncentrácii súťažiť s inými oxidovateľnými biomolekulami, a tak významne spomaliť alebo inhibovať oxidáciu týchto substrátov.

Sú to:

- **nízkomolekulové neenzýmové látky**, najmä tokoferol (vitamín E), karotén, kyselina askorbová (vitamín C) a glutatión
- **enzýmy**, ktoré menia reaktívne formy kyslíka a dusíka na menej reaktívne produkty
- **bunkové a biochemické ochranné systémy**, odstraňujúce nebezpečné oxidačne poškodené štruktúry z organizmu (Kalousová et al., 2006).

Antioxidačné ochranné mechanizmy sa rozdeľujú do štyroch kategórií:

1. **Kompartimentalizácia** – predstavuje elimináciu voľných iónov kovov (Fe alebo Cu) rôznymi chelatačnými látkami (napr. feritín, albumín, deferoxamín), práve tak ako bunkovú a tkanivovo špecifickú distribúciu antioxidantov.
2. **Detoxikácia** oxidovaných molekúl (radikály, peroxidy) - je zabezpečená enzýmami a nízkomolekulovými antioxidantami. Chránia bunku pred vedľajším účinkom fyziologického metabolizmu tým, že bránia iniciácii a vetveniu reťazovej reakcie voľných radikálov. Tieto antioxidanty môžeme rozdeliť podľa mechanizmu eliminácie na:
 - **vychytávače** (scavengery) – napr. SOD vychytá $O_2^{\cdot\cdot}$ a premení ho na neradikálové molekuly O_2 a H_2O
 - **lapače** (trappingy) – napr. vitamín E vychytá $\cdot OH$ a premení ho na relatívne stabilný radikál
 - **zhášače** (quencher) – napr. karotén zháša singletový kyslík
3. **Opravné mechanizmy** - ich funkciou je zabezpečiť elimináciu výsledkov zatiaľ reverzibilnej modifikácie. Veľký význam majú enzýmy, ktoré sú schopné redukovať oxidované zlúčeniny a obnoviť ich funkciu, ako napr. glutatiónreduktáza a methemoglobínreduktáza.
4. Proteolytické systémy sú zodpovedné za degradáciu denaturovaných, potenciálne toxických proteínov a peptidov, a tým za ich opätovné **využitie** (utilizáciu). Lýza peroxidov membránových lipidov fosfolipázou A_2 zabráňuje ich účasti v pokračovaní reťazových reakcií. Patria sem aj reparačné enzýmy na opravu oxidačne poškodennej DNA (Muchová et al., 2004).

1.6.1 Nízkomolekulové endogénne antioxidanty

Nízkomolekulové antioxidanty (askorbát, tokoferoly, karotenoidy, koenzým Q, tioly

a disulfidy, kyselina lipová, urát, bilirubín, flavonoidy) poskytujú svoj elektrón reaktívnym formám kyslíka, tým ich inaktivujú a sami sa zmenia na relatívne neškodné zlúčeniny (tokoferolový radikál, dehydroaskorbát, disulfid). Takto zmenené antioxidanty sa často regenerujú na pôvodnú formu redukciou, dodaním elektrónov z živín prostredníctvom glutatiónreduktázy alebo inými redukčnými reakciami (Kalousová et al., 2006).

Kyselina askorbová (vitamín C) má mnohonásobné antioxidačné vlastnosti. Antioxidačná schopnosť askorbátu súvisí s rýchlosťou jeho reakcie s mnohými RMO (hlavne peroxidovým radikálom), a tiež s tým, že semidehydroaskorbátový radikál je slabo reaktívny. V podmienkach *in vivo* prebieha redukcia semidehydroaskorbátového radikálu späť na askorbát účinkom enzýmových systémov:

- a) NADH-semidehydroaskorbátreduktáza katalyzuje reakciu:



- b) Dehydroaskorbátreduktáza katalyzuje reakciu:



Antioxidačná funkcia vitamínu C spočíva v redukcii organických radikálov, ktoré vznikajú pri ionizačnom žiarení, lapaní radikálov O₂, OH, R, HO₂, NO, v regenerácii vitamínu E a radikálu kyseliny močovej a ochrane pred radikálmi v cigaretovom dyme (Zachar et al., 2004).

Vitamín E je skupina ôsmich izomérov, z nich biologicky najúčinnější je **α-tokoferol**. Je antioxidačnou látkou membrán, pretože jeho izoprénová štruktúra je lipofilná. Pri peroxidácii lipidov premieňa alkylperoxylové radikály LOO[•] na hydroperoxydy, s ktorými si poradí glutatiónperoxidáza (GPx). Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselín skôr, než môžu atakovať susedné „zdravé“ lipidy. Tokoferol sa pritom mení na tokoferylový radikál, ktorý je stabilnejší ako látky, s ktorými tokoferol reaguje. Askorbát aspoň z časti tokoferolový radikál redukuje späť na tokoferol. Popísaný antioxidačný cyklus tokoferolu tlmí propagáciu radikálových reakcií v lipidoch membrán a lipoproteínov (LDL, VLDL, HDL) (Štípek et al., 2000).

Flavonoidy predstavujú rozsiahlu skupinu prírodných rastlinných metabolitov, ktoré sa nachádzajú v zelenine, ovocí, víne, orechoch, obilí, v peli a v pletivách kvetov. Ich štruktúra je výhodná pre tvorbu chinoidných štruktúr a pre jednoelektrónové oxidoredukcie. Na bunky pôsobia antikarcinogénne, protizápalovo a zasahujú do bunkového signálneho systému. Flavonoidy chelatujú železo a tiež týmto mechanizmom tlmia oxidačný stres v tkanivách (Valenzuela et al., 2003).

Glutatión (GSH) je ďalším dôležitým nízkomolekulovým antioxidantom, ktorý je substrátom pre niektoré antioxidantné enzýmy a zároveň je „radikálovým quencherom“ v bunkách – vychytáva voľné radikály a RMO – reaguje s peroxidom vodíka za vzniku oxidovaného glutatiónu. Dôležitá je jeho úloha pri regenerácii tokoferolového a askorbátového radikálu *in vivo* (Muchová et al., 2004).

Glutatión je prítomný v oocytoch a vajcovodovej tekutine a má dôležitú úlohu v zlepšovaní vývoja zygoty a následne v štádiu moruly a blastuly (Agarwal et al., 2005b).

Karotenoidy sú skupinou tetraterpénov. Hlavná štruktúrna kostra karotenoidov sa skladá z izoprénových jednotiek. Rozdeľujú sa na dve triedy: karotény a xantofily. Karotény sú uhlíkovodíkové karotenoidy a xantofily obsahujú kyslík vo forme hydroxylovej, metoxylovej, karboxylovej alebo epoxylovej skupiny. **Lykopén** a **β -karotén** sú typické karotény, kým **luteín** v zelených listoch a **zeaxantín** v obilí sú typické xantofily. Karotenoidy môžu mať acyklickú, monocyklickú alebo bicyklickú štruktúru. Lykopén je acyklický, **karotény γ** a **δ** sú monocyklické a **karotény α** a **β** sú bicyklické. Dvojité väzby v karotenoidoch sú konjugované formy a všetky trans-formy karotenoidov sa zvyčajne nachádzajú v rastlinných pletivách (Lee et al., 2004).

V antioxidantnej ochrane sa karotenoidy uplatňujú pri odstraňovaní radikálov centrovaných na uhlík a alkylperoxylových radikálov (R-O-O \cdot) v lipidoch. Mechanizmus ich pôsobenia je stále nejasný, zdá sa, že sa uplatňujú prostredníctvom tokoferolu. Môžu tiež zhasať singletový kyslík, t.j. meniť túto excitovanú formu na bežný tripletový kyslík (Štípek et al., 2000).

Kyselina α -lipoová zabraňuje oxidatívne poškodeniu proteínov. Má významnú úlohu, pretože regeneruje GSH a tiež vitamín C a E. Neutralizáciou účinkov voľných radikálov podporuje zvýšenie mitochondriálneho membránového potenciálu a nárast úrovne kyseliny askorbovej a GSH v bunkách (Lee et al., 2004).

V organizme sa nevyskytuje voľná, po jej príjme z potravy sa časť mení na lipoamid, v ktorom sa viaže na lyzín, a časť zostane v neviazanej forme. Obsahovať môže síru vo forme -S-S- alebo S. Redukuje aj tiolové skupiny proteínov, čím sa obnovuje ich schopnosť transportovať glukózu regulovanú inzulínom (Zachar et al., 2004).

Je univerzálnym antioxidantom, pretože reaguje s alkylperoxylovými radikálmi (RO_2^{\cdot}), askorbylovými radikálmi, HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , tokoferylovými radikálmi, $O_2^{\cdot-}$ a $HClO$. Lipoát regeneruje tokoferylový radikál priamo alebo prostredníctvom askorbátu (Štípek et al., 2000).

1.6.2 Vysokomolekulové endogénne antioxidanty

Mnoho proteínov je schopných viazať prechodné prvky (železo a meď) a meniť ich oxidoredukčné vlastnosti tak, že tieto prvky prestanú katalyzovať radikálové reakcie. V tomto zmysle sa medzi antioxidanty zaraďuje **transferín** v plazme a **laktoferín** polymorfonukleárných leukocytov v mlieku. Viažu železo vo forme Fe^{3+} a tým ho zbavujú možnosti vstupovať do Fentonovej reakcie (Ďuračková et al, 1999; Attieh et al., 1999).

Ďalším proteínom separujúcim železo v bunke je **feritín**, ktorý pôsobí antioxidantne hlavne svojou feroxidázovou aktivitou, ktorá skladované železo udržiava v oxidovanom stave, pokiaľ ho odtiaľ neuvolní silne redukujúca látka (askorbát) (Aust, 1995).

Prooxidačne nebezpečnou formou železa je hemoglobín uvoľnený z erytrocytov a hém uvoľnený z hemoproteínu vrátane hemoglobínu a myoglobínu. Preto môžeme za antioxidant považovať tiež **haptoglobín**, vychytávajúci extracelulárny hemoglobín, a **hemopexín**, viažuci uvoľnený hém. Významným antioxidantným proteínom plazmy je **ceruloplazmín**. Tento proteín viaže meď, ktorá je podstatná pre ferooxidázovú aktivitu ceruloplazmínu oxidujúceho dvojmočné železo na trojmočné. Umožňuje tak uvoľnenie železa z buniek a jeho predanie transferínu. Súčasne sa kyslík oxiduje štyrmi elektrónmi na vodu, bez toho aby vznikli toxické medziprodukty (Attieh et al., 1999).

Reaktivitu voľných radikálov významne ovplyvňujú tiež tiolové skupiny niektorých proteínov. **Albumín** viaže ión Cu^{2+} , ktorý sa peroxidom vodíka oxiduje na Cu^{3+} a v tejto forme poškodzuje okolité štruktúry albumínu (Štípek et al., 2000).

Metalotioneíny sú proteíny obsahujúce veľa cysteínov a žiadne aromatické aminokyseliny. Hrajú významnú úlohu v bunkovom jadre. Prostredníctvom síry chelatujú ióny kovov. Pri oxidačnom strese sa zvýši ich syntéza (Štípek et al., 2000).

Posledné výskumy upozorňujú na reparačnú úlohu **chaperónov**. Základnou funkciou týchto proteínov je naviazať na seba ešte nezvinuté proteíny a pomáhať pri ich posttranslačnom priestorovom usporiadaní a začlenení do bunkových organel. Oxidačný stres indukuje syntézu chaperónov, ktoré rozpoznávajú oxidáciou poškodené proteíny, viažu ich na seba a urýchľujú ich odstránenie v proteozómoch. Môžu tiež pomôcť pri opravách konformácie proteínov (Benjamin a McMillan, 1998).

1.6.3 Enzýmové antioxidačné systémy

Enzymatické antioxidanty sú tiež známe ako prirodzené antioxidanty, neutralizujú nadbytočné ROS a predchádzajú poškodzovaniu štruktúry buniek. Medzi enzymatické antioxidanty patria superoxidodismutáza, glutatiónpoxidáza, glutatiónttransferáza a kataláza, ktoré redukujú peroxid vodíka na vodu a alkohol (Agarwal et al., 2005b).

Superoxiddismutáza (SOD) je známa viac ako 35 rokov. Jej objav bol medzníkom pri štúdiu biologického významu superoxidu i iných voľných radikálov. SOD je obsiahnutá v každej bunke. Spontánna dismutácia superoxidu na kyslík a peroxid vodíka je pri pH 7 veľmi rýchla, napriek tomu je superoxidodismutázou urýchlená o ďalšie 4 rady (rýchlostná konštanta je potom $2 \cdot 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Štípek et al., 2000; McCord a Edeas, 2005).

SOD mení superoxidový anión na kyslík a peroxid vodíka, ktorý je potom odstránený glutatiónpoxidázou alebo katalázou. Tým SOD zabraňuje tvorbe vysoko agresívnych ROS (Lee et al., 2004; Afonso et al., 2007).

V tkanivách cicavcov existujú 3 SOD: **superoxiddismutáza s mangánom (Mn-SOD)**, ktorá chráni cytoplazmu a metabolické procesy v nej, **superoxiddismutáza s meďou a zinkom (Cu/Zn-SOD)**, ktorá chráni mitochondrie a **extracelulárna SOD (EC-SOD)** (Zelko et al., 2002; Lee et al., 2004).

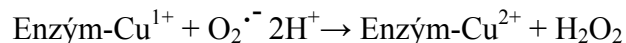
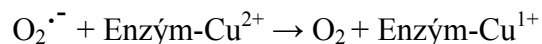
Superoxiddismutáza s mangánom (Mn-SOD) patrí vývojovo a štruktúrne do druhej rodiny superoxidodismutáz. Je enzýmom mitochondriálnej matrix. Gén pre Mn-SOD bol vývojovo prenesený do jadrovej DNA na 3. chromozóm. Proenzým má signálny úsek, ktorý je adresou pre presun vytvoreného proteínu do mitochondrie (Štípek et al., 2000).

Superoxiddismutáza s meďou a zinkom (Cu/Zn-SOD) sa skladá z dvoch identických podjednotiek, z ktorých každá má molekulovú hmotnosť 16 000 a v každej je jeden atóm medi a jeden atóm zinku. Je to stabilný enzým, katalyzuje pri pH v rozmedzí 4,5 – 9,5. Vyskytuje sa v cytosole a medzimembránovom priestore mitochondrií. Prenos elektrónov z jednej molekuly superoxidu na druhú obstaráva atóm medi. Cu(II) sa redukuje na Cu(I) a potom zase oxiduje. Zn(II) má stabilizačnú funkciu, katalýzy sa nezúčastňuje (Štípek et al., 2000).

Ako posledná bola objavená živočíšna extracelulárna SOD (EC-SOD). Jej molekula má 4 podjednotky a molekulovú hmotnosť 135 000. Dismutáciu katalyzuje ión medi a molekulu stabilizuje atóm zinku (Adachi et al., 1993; Fukushima et al., 1995).

Pretože mitochondriálny respiračný reťazec je hlavným miestom tvorby superoxidového radikálu $O_2^{\cdot-}$ v bunkách, zohráva superoxiddismutáza Mn-SOD dôležitú úlohu pri vychytávaní tohto radikálu a udržiavaní bunkovej ROS rovnováhy (Hu et al., 2005).

Enzým katalyzuje dismutáciu superoxidu, ktorá prebieha v dvoch nasledovných reakciách:



SOD pôsobí inhibične v iniciačnej fáze lipoperoxidácie (Muchová et al., 2004).

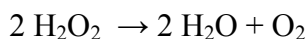
Najúčinnejšia a bez vedľajších účinkov je SOD v prírodnom stave, a to v brokolici, keli, kapuste, plazivom pýre a v mnohých druhoch zeleniny (Zachar et al., 2004).

Glutatiónpoxidáza (GPx) môže byť závislá alebo nezávislá od selénu. Antioxidačný účinok selénoenzýmov spočíva v tom, že eliminujú peroxidy a selenóny reagujú pri tom rýchlejšie ako tioly. V priebehu redoxných reakcií prenášajú 2 elektróny, takže sa z molekuly kyslíka nemôže vytvoriť superoxid, ktorého vznik vyžaduje len jeden elektrón. Glutatiónpoxidáza spolupracuje s glutatiónom, ktorý sa nachádza v organizme v pomerne vysokej koncentrácii. Rozkladá peroxid na vodu, prípadne alkohol. Aktivita glutatiónpoxidázy je závislá od koncentrácie glutatiónu. Obidve látky sú silným antioxidantom a detoxikantom (Zachar et al., 2004).

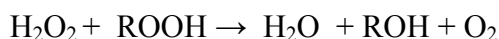
Štúdie dokazujú, že glutationperoxidáza môže pomôcť pri zachovaní nízkej úrovne peroxidu vodíka vo vnútri folikulu, čo má dôležitú úlohu pri poklese oxidatívneho stresu vo vaječníkoch (Agarwal et al., 2006).

Celá skupina cytozolových enzýmov nazývaných **glutatiónterazý (GST)** katalyzuje konjugačnú reakciu, pri ktorej je sulfhydrylová skupina GSH naviazaná na elektrofilnú organickú látku. Týmto spôsobom sú detoxikované niektoré látky telu cudzie (xenobiotiká). GST sú významnou ochranou pred následkami peroxidácie lipidov. Ich substrátom je totiž 4-hydroxynonenal, ktorý je konjugáciou s GSH inaktivovaný a vylúčený z tela. GSH je spotrebovaný nielen pri ochranných redukčných reakciách, ale aj pri odstraňovaní produktov peroxidácie (Štípek et al., 2000).

Kataláza (KAT) má štyri tetraedricky usporiadané podjednotky, v každej jednu prostetickú protoporfyrínovú skupinu s Fe^{3+} . Okrem dvojelektrónovej dismutácie peroxidu na kyslík a vodu:



môže katalyzovať peroxidázové reakcie typu:



Zatiaľ čo prvá reakcia má veľký význam pre inaktiváciu H_2O_2 v peroxizómoch, druhá reakcia sa v antioxidačnej ochrane asi neuplatňuje vzhľadom k nízkej reaktivite katalázy s alkylperoxidmi (ROOH). Túto ochranu zaisťujú glutatiónterazý (Štípek et al., 2000).

2 Cieľ práce

Voľné radikály sú v súčasnosti často diskutovanou témou nielen v odborných kruhoch, ale aj vo sfére laickej verejnosti. Porušenie rovnováhy medzi prooxidantami a antioxidantami vyvoláva oxidatívny stres, ktorý spôsobuje oxidatívne poškodenie lipidov, proteínov a DNA, čo vedie k poškodeniu bunkových membrán, porušeniu činnosti a funkcie buniek a tkanív.

Olovo je ťažký kov, ktorého toxické vplyvy sa prejavujú v centrálnej a periférnej nervovej sústave, krvi a kardiovaskulárnom systéme, v obličkách, endokrinnom a imunitnom systéme, rovnako ako aj v gastrointestinálnom trakte. Zistilo sa tiež, že olovo je schopné akumulovať sa vo vaječníkoch, kde mení štruktútu a steroidogénnu enzýmovú aktivitu granulóznych buniek.

Cieľom našej práce bolo na základe zistených poznatkov vyhodnotiť vplyv rôznych koncentrácií (5; 2,5; 0,83; 0,625 a 0,455 mg Pb.10 mL⁻¹) zlúčeniny trihydrátu octanu olovantého (Pb(CH₃COO)₂.3H₂O) na:

- celkový antioxidačný status (TAS) kultivačných médií granulóznych buniek prasničiek *in vitro*
- koncentráciu antioxidačného enzýmu superoxiddismutázy (SOD) v kultivačných médiách granulóznych buniek prasničiek *in vitro*

Východiskovým materiálom pre spracovanie tejto diplomovej práce bola bakalárska práca na tému „Voľné radikály a reprodukčné funkcie samíc“ obhájená v roku 2008.

3 Metodika práce a metódy skúmania

Odber vaječníkov

Do pokusu boli zaradené prasničky kombinovaného typu plemena biela ušľachtilá. Vaječníky pohlavne dospelých prasničiek v skorej a strednej folikulárnej fázy estrálneho cyklu boli získané na bitútku od zdravých zvierat bez viditeľných reprodukčných abnormalít. Vaječníky boli transportované do laboratória pri teplote 4°C a opláchnuté v sterilnom fyziologickom roztoku (Kolesárová et al., 2008; Capcárová et al., 2009).

Kultivácia granulóznych buniek

Folikulárna tekutina bola odobratá zo stredne veľkých folikulov (3-5 mm), ovariálne granulózne bunky boli izolované centrifugáciou 10 minút pri 200 x g. Nasledovalo ich opláchnutie sterilným médiom DMEM/F12 1:1 (BioWhittaker™, Verviers, Belgicko) a resuspendovanie v tom istom médiu doplnenom 10% fetálnym teľacím sérom (BioWhittaker™, Verviers, Belgicko) a 1% antibiotickým/antimykotickým roztokom (Sigma, St. Louis, MO, USA) na výslednú koncentráciu 10⁶ buniek.mL⁻¹ média. Časti bunkovej suspenzie boli rozdelené do 24-jamkových kultivačných platničiek (Nunc™, Roskilde, Dánsko, 1mL/jamka). Následne boli platničky inkubované pri 37,5°C a 5% CO₂ pri vlhkej atmosfére, kým bunky vytvorili na 75% súvislú monovrstvu (5-7 dní). Médium (1mL/jamka) bolo vymenené a granulózne bunky boli inkubované v rovnakom médiu (10% fetálne teľacie sérum a 1% antibiotický/antimykotický roztok) (Capcárová et al., 2009).

Pôsobenie olova

Granulózne bunky boli ošetrené trihydrátom octanu olovnatého (Pb(CH₃COO)₂.3H₂O; Slavus Bratislava, Slovenská Republika) v šiestich koncentráciách nasledovne: skupina MAX (5 mg Pb.10 mL⁻¹), skupina A (2,5 mg Pb.10 mL⁻¹), skupina B (0,83 mg Pb.10 mL⁻¹), skupina C (0,625 mg Pb.10 mL⁻¹), skupina D (0,455 mg Pb.10 mL⁻¹) a kontrolná skupina bez olova.

Kultivácia trvala 18 hodín. Po kultivácii boli kultivačné médiá z platničiek aspirované a uchované pri teplote -80°C až do analýzy TAS a SOD.

Každé experimentálne skupiny boli reprezentované 4 kultivačnými jamkami s granulóznymi bunkami. Mediá boli vyhodnotené duplicitne na aktivitu antioxidantov.

Rozsah antioxidantnej kapacity bol vypočítaný na 10⁶ buniek.mL⁻¹ média.

Analýza TAS a SOD

Celkový antioxidačný status a koncentrácia superoxiddismutázy v kultivačných médiách granulóznych buniek vaječníkov ošípaných boli analyzované spektrofotometrom Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) s použitím antioxidačného RANDOX kitu (Randox Labs, Crumlin, UK) podľa priloženého manuálneho návodu.

Princíp stanovenia celkového antioxidačného statusu (TAS)

Celkový antioxidačný status (TAS) je definovaný ako suma celkových endogénnych a potravou prijímaných antioxidantov v extracelulárnych tekutinách jednotlivca. Spolupôsobenie všetkých rozličných antioxidantov zaobstaráva ochranu proti vplyvu ROS alebo RNS lepšie ako jednotlivé zložky samostatne (Miller et al., 1993).

ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolin sulfonát]) produkuje po inkubácii s peroxidázou a H_2O_2 relatívne stabilný radikál ABTS modrozelenej farby, ktorého koncentráciu je možné stanoviť spektrofotometricky pri 600 nm. Antioxidanty v pridanej vzorke spôsobia úbytok sfarbenia, ktorý je priamoúmerný antioxidačnej kapacite vzorky.

Pri tomto stanovení boli použité tri kyvety s obsahom 1 mL. Prvá kyveta obsahovala regeneračná blank pozostávajúci z 1 mL z vopred pripraveného chromogénu a 20 μ L destilovanej vody. Druhá kyveta obsahovala 1 mL chromogénu a 20 μ L štandardu. Tretia kyveta obsahovala 1 mL chromogénu s 20 μ L stanovovanej vzorky.

Následne sa obsah všetkých kyviet premiešal a zmerala sa absorbanca A_1 . Do všetkých troch kyviet sa potom pridalo 200 μ L substrátu. Kyvety sa opäť premiešali a presne po 3 minútach sa zmerala absorbanca A_2 .

Absorbanca sa merala pri vlnovej dĺžke 600 nm a teplote 37 °C proti vzduchu.

$$A_2 - A_1 = \Delta A \text{ (pre blank/štandard/vzorku)}$$

Výpočet:

Celkový antioxidačný status (TAS):

$$\text{Faktor} = \frac{\text{koncentrácia štandardu}}{\Delta A(\text{blank}) - \Delta A(\text{štandard})}$$

$$\text{TAS (mmol.L}^{-1}\text{)} = \text{Faktor} \times [\Delta A(\text{blank}) - \Delta A(\text{vzorka})]$$

Princíp stanovenia superoxiddismutázy (SOD)

Funkciou superoxiddismutázy (SOD) je urýchliť dismutáciu toxického superoxidového radikálu (O_2^{\cdot}), ktorý je produkovaný oxidatívnym metabolizmom, na peroxid vodíka (H_2O_2) a kyslík (O_2). V tejto metóde sa uplatňuje xantín a xantínoxidáza (XOD), ktorých reakcia produkuje superoxidový radikál, ktorý dáva červenú reakciu s farbivom 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium chloridom (I.N.T). Aktivita superoxiddismutázy je stanovená mierou inhibície tejto reakcie (poklesom absorbančie farbiva).

Jednotka aktivity SOD je definovaná ako taká aktivita, ktorá spôsobí 50% pokles rýchlosti redukcie INT za podmienok tohto stanovenia.

Ako prvá bola pripravená sada štandardov – S1-S6. Do fľašky štandardu sa pridalo 10 mL redestilovanej vody. Tento roztok predstavoval štandard S6. Ostatné štandardy sa pripravili nasledovne: S5 pozostával z 5 mL roztoku S6 a 5 mL riediaceho pufru, S4 z 5 mL roztoku S5 a 5 mL riediaceho pufru, S3 z 5 mL roztoku S4 a 5 mL riediaceho pufru, S2 z 5 mL roztoku S3 a 6 mL riediaceho pufru. S1 predstavoval samotný riediaci roztok. Podľa štandardov sa pripravila štandardná krivka, na ktorú sa vyniesli absorbančie a pomocou ktorej sa odpočítala koncentrácia SOD.

Pri stanovení boli použité nasledovné kyvety. Prvá kyveta obsahovala 0,05 mL riediaceho roztoku a 1,7 mL zmiešaného substrátu. Kyvety so štandardami (S2-S6) obsahovali 0,05 mL štandardu a 1,7 mL zmiešaného substrátu. Tretia kyveta obsahovala 0,05 mL riedenej vzorky a 1,7 mL zmiešaného substrátu. Po premiešaní sa do všetkých kyvietsk pridala xantínoxidáza v množstve 0,25 mL. Následne boli kyvety znovu premiešané a po 30 sekundách sa odpočítala absorbančia A_1 . Konečná absorbančia A_2 bola zmeraná po 3 minútach. Meranie absorbančie sa uskutočnilo pri vlnovej dĺžke 505 nm a teplote 37°C proti vzduchu.

Výpočet:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = -A/\text{min štandardu alebo vzorky}$$

Rýchlosť zmeny absorbančie **S1** = rýchlosť neinhibovanej reakcie = 100%

Všetky namerané zmeny absorbancie (pre vzorky aj štandardy) sme previedli na percentá inhibície reakcie podľa:

$$100 - \frac{(-A_{\text{std/min}} \times 100)}{(-A_{\text{SI/min}})} = \% \text{ inhibície}$$

$$100 - \frac{(-A_{\text{vzorka/min}} \times 100)}{(-A_{\text{SI/min}})} = \% \text{ inhibície}$$

Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolou (bez obsahu octanu olovnatého) a experimentálnymi skupinami (s obsahom octanu olovnatého – MAX, A,B, C, D) bola zhodnotená *t*-testom s použitím štatistického softvéru GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego California USA) a MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA). Rozdiely medzi kontrolou a experimentálnymi skupinami sme zisťovali významnosť na hladine $\alpha = 95,0$ ($P < 0,05$), $\alpha = 99,0$ ($P < 0,01$) a $\alpha = 99,99$ ($P < 0,001$).

4 Výsledky práce

V našej práci sme sledovali koncentráciu superoxiddismutázy a celkový antioxidačný status po pôsobení trihydrátu octanu olovnateho na granulózne bunky prasničiek *in vitro*.

Granulózne bunky boli vystavené pôsobeniu rôznych koncentrácií trihydrátu octanu olovnateho ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Najvyššej koncentrácii olova boli vystavené granulózne bunky v skupine MAX ($5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$) a naopak najnižšej koncentrácii boli vystavené v skupine D s hodnotou $0,455 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$. V ostatných skupinách sa použili nasledovné koncentrácie: v skupine A koncentrácia $2,5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$, v skupine B $0,83 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$ a v skupine C bola koncentrácia olova $0,625 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$. Do kontrolnej skupiny sa olovo nepridávalo.

Maximálna nameraná koncentrácia pozorovaného antioxidačného enzýmu superoxiddismutázy (SOD) v kultivačných médiách granulóznych buniek spomedzi všetkých skupín bola zistená v skupine C s hodnotou $243 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Minimálna nameraná koncentrácia SOD spomedzi všetkých skupín bola zistená v skupine A s hodnotou $222 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. V kontrolnej skupine bez prítomnosti olova sa zistila maximálna nameraná koncentrácia SOD $239,8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ a minimálna nameraná koncentrácia $229,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Po 18 hodinách pôsobenia olova, sme zistili, že olovo nesignifikantne ($P > 0,05$) ovplyvnilo koncentráciu pozorovaného antioxidantu superoxiddismutázy v kultivačných médiách granulóznych buniek vaječníkov prasničiek v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde bola zistená najnižšia priemerná koncentrácia SOD $233,4 \pm 4,534 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Podobne nízku koncentráciu SOD ako v kontrolnej skupine sme zistili v skupine A ($234,25 \pm 8,342 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), kde koncentrácia olova dosahovala hodnotu $2,5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$. Vo všetkých ostatných skupinách bola v porovnaní s priemernou hodnotou koncentrácie SOD v kontrolnej skupine zaznamenaná vyššia priemerná koncentrácia SOD.

Naopak najvyššia priemerná koncentrácia superoxiddismutázy v porovnaní s ostatnými skupinami bola zistená v skupine B s hodnotou $238,75 \pm 2,5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pričom skupina B bola vystavená pôsobeniu olova s koncentráciou $0,83 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$. Podobne vysokú koncentráciu SOD sme zistili aj v skupine MAX ($238,5 \pm 2,887 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), ktorá bola vystavená pôsobeniu najvyššej koncentrácii olova ($5 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$).

Koncentrácia SOD klesla pri nižších koncentráciách olova, a to v skupine C ($238,25 \pm 4,330 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) s koncentráciou olova $0,625 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$, a v skupine D ($234,5 \pm 1,414 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) s koncentráciou olova $0,455 \text{ mg Pb} \cdot 10 \text{ mL}^{-1}$.

Koncentrácia superoxiddismutázy (SOD) v kultivačných médiách granulóznych buniek vaječníkov prasničiek je zaznamenaná v Tab. 4.1.

Tab. 4.1

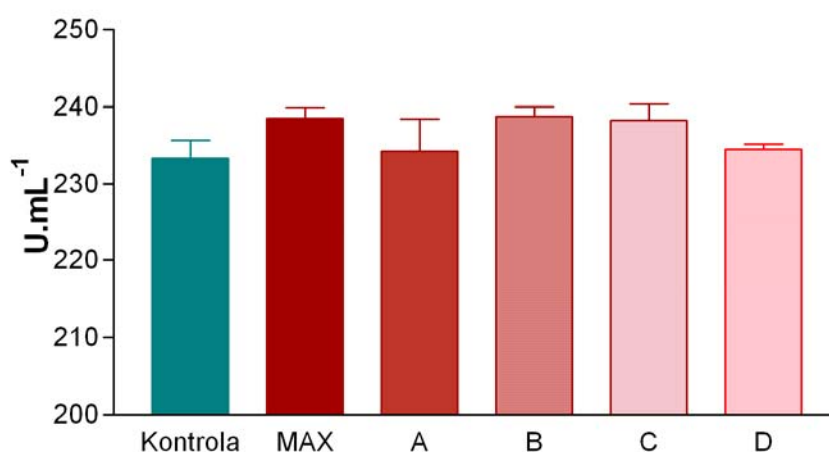
[Základné štatisticko-variačné ukazovatele koncentrácie SOD v médiách (U.mL⁻¹)]

	K	MAX	A	B	C	D
min	229,1	235	222	236	232,5	232,5
max	239,8	242	240	242	243	235,5
priemer	233,4	238,5	234,25	238,75	238,25	234,5
median	232,35	238,5	237,5	238,5	238,75	235
sd	4,534	2,887	8,342	2,5	4,330	1,414
cv (%)	1,942	1,210	3,561	1,047	1,817	0,603

K – kontrolná skupina bez olova, MAX – skupina s maximálnou koncentráciou olova 5 mg Pb.10 mL⁻¹, A – skupina s koncentráciou olova 2,5 mg Pb.10 mL⁻¹, B – skupina s koncentráciou olova 0,83 mg Pb.10 mL⁻¹, C – skupina s koncentráciou olova 0,625 mg Pb.10 mL⁻¹, D – skupina s koncentráciou olova 0,455 mg Pb.10 mL⁻¹

min – minimálna koncentrácia, max – maximálna koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, cv (%) – variačný koeficient

Grafické znázornenie priemerných koncentrácií SOD v kultivačných médiách granulóznych buniek vaječníkov prasničiek poskytuje Graf 4.1.



Graf 4.1

[Priemerné koncentrácie SOD v kultivačných médiách granulóznych buniek po inkubácii rôznymi koncentraciami olova]

Hodnoty celkového antioxidantného statusu (TAS) sú zaznamenané v Tab. 4.2, pričom sa zistilo, že maximálna nameraná koncentrácia TAS spomedzi všetkých skupín sa zistila v skupine C s hodnotou 1,495 mmol.L⁻¹, ktorá bola vystavená pôsobeniu olova s koncentráciou 0,625 mg Pb.10 mL⁻¹. Naopak minimálna nameraná koncentrácia TAS v porovnaní s ostatnými skupinami bola zistená pri skupine B s hodnotou 1,201 mmol.L⁻¹, pričom koncentrácia olova v tejto skupine mala hodnotu 0,83 mg Pb.10 mL⁻¹. V kontrolnej skupine bola maximálna nameraná koncentrácia TAS 1,445 mmol.L⁻¹ a minimálna nameraná koncentrácia TAS 1,412 mmol.L⁻¹.

Najvyššia priemerná koncentrácia celkového antioxidantného statusu v porovnaní s ostatnými skupinami bola zistená v kontrolnej skupine bez olova, kde dosahovala hodnotu 1,429 ± 0,014 mmol.L⁻¹. Štatistické analýzy ukázali signifikantne nižšiu koncentráciu (*P* < 0,05) v skupine B (1,271 ± 0,054 mmol.L⁻¹), kde koncentrácia olova dosahovala hodnotu 0,83 mg Pb.10 mL⁻¹. Podobné výsledky boli zistené pri ostatných skupinách (A, C, D, MAX), ale rozdiely neboli štatisticky signifikantné (*P* > 0,05).

Rovnaká priemerná koncentrácia celkového antioxidantného statusu 1,361 mmol.L⁻¹ bola zistená pri skupine A so smerodajnou odchýlkou 0,078 mmol.L⁻¹ a pri skupine C so smerodajnou odchýlkou 0,109 mmol.L⁻¹.

V porovnaní s priemernou koncentráciou celkového antioxidantného statusu v skupinách A a C, boli hodnoty v skupinách MAX a D nižšie, pričom v skupine MAX vystavenej najvyššej koncentrácii olova sa zistila priemerná koncentrácia TAS 1,351 ± 0,057 mmol.L⁻¹. V skupine D bola zistená priemerná koncentrácia TAS 1,352 ± 0,057 mmol.L⁻¹.

Koncentrácia celkového antioxidantného statusu (TAS) v kultivačných médiách granulóznych buniek vaječníkov prasničiek je zaznamenaná v Tab. 4.2.

Tab. 4.2

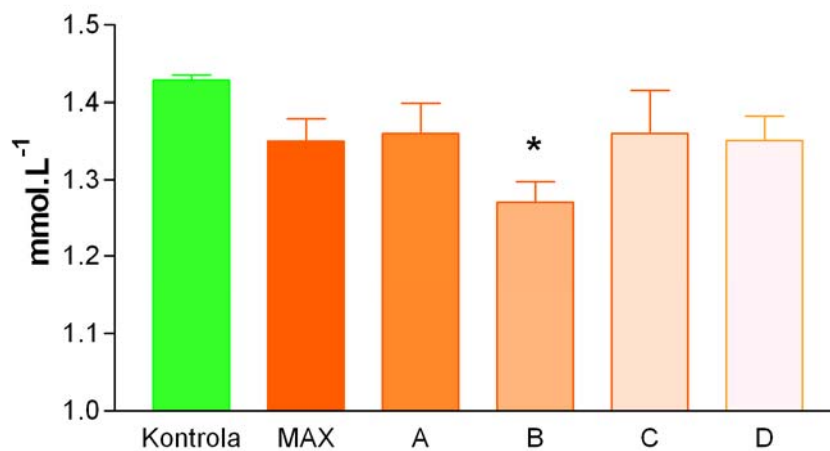
[Základné štatisticko-variačné ukazovatele koncentrácie TAS v médiách (mmol.L⁻¹)]

	K	MAX	A	B	C	D
min	1,412	1,268	1,286	1,201	1,238	1,286
max	1,445	1,389	1,458	1,332	1,495	1,421
priemer	1,429	1,351	1,361	1,271	1,361	1,352
median	1,430	1,373	1,350	1,276	1,355	1,350
sd	0,014	0,057	0,078	0,054	0,109	0,057
cv (%)	0,948	4,234	5,710	4,260	7,976	4,232

K – kontrolná skupina bez olova, MAX – skupina s maximálnou koncentráciou olova 5 mg Pb.10 mL⁻¹, A – skupina s koncentráciou olova 2,5 mg Pb.10 mL⁻¹, B – skupina s koncentráciou olova 0,83 mg Pb.10 mL⁻¹, C – skupina s koncentráciou olova 0,625 mg Pb.10 mL⁻¹, D – skupina s koncentráciou olova 0,455 mg Pb.10 mL⁻¹

min – minimálna koncentrácia, max – maximálna koncentrácia, sd – smerodajná odchýlka, cv (%) – variačný koeficient

Grafické znázornenie priemerných koncentrácií TAS v kultivačných médiách granulóznych bunkách vaječníkov prasničiek poskytuje Graf 4.2



Graf 4.2

[Priemerné koncentrácie TAS v kultivačných médiách granulóznych buniek po inkubácii rôznymi koncentraciami olova]

5 Diskusia

Reprodukčný cyklus samíc predstavuje komplexné interakcie medzi nervovým, endokrinným a reprodukčným systémom, ktorého výsledkom je produkcia zreých gamét a priaznivého prostredia pre vznik a zachovanie gravidity. Podľa terminológie reprodukcie cyklus má 5 základných štádií: vývoj zreých oocytov – folikulogenéza, uvoľnenie zreých oocytov z vaječníka – ovulácia, transport gamét a zygoty, vývoj endometria vhodného pre implantáciu a podporenie skorých štádií gravidity žltým telieskom. Defekty v ktoromkoľvek z týchto štádií vedú k poruchám reprodukcie (Scialli a Zinaman, 1993).

Pohlavné orgány slúžia ako citlivý barometer výskytu rizikových prvkov v životnom prostredí (Kováčik et al., 2000).

Toxické kovy vrátane kadmia zapríčiňujú zvýšenú produkciu bioreaktívnych foriem kyslíka, ktoré následne indukujú oxidačný stres v bunkách. Je to následok toxického účinku týchto kovov, a tiež vyčerpania antioxidantov v organizme (Lovásová et al., 2002).

Oxidatívny stres významne ovplyvňuje kvalitu a zrenie oocytov, ovariálnu steroidogézu, ovuláciu, luteolýzu, oplodnenie, vývoj embrya a implantáciu (Agarwal a Allamaneni, 2004; Agarwal a Gupta, 2006).

Graafov folikul obsahuje potenciálne zdroje ROS, ako sú makofágy, neutrofilny a metabolicky aktívne granulózne bunky. Folikulárna tekutina a bunky *cumulus oophorus* sa môžu využívať pre ich úzky vzťah k oocytom ako biomarkery pre predpovedanie úspechov *in vitro* oplodnenia (IVF). Produkujú veľké množstvo antioxidantov a tým chránia oocyty pred oxidatívnym poškodením vyvolaným ROS (Agarwal a Allamaneni, 2006; Matos et al., 2009).

Granulózne bunky predstavujú hlavný endokrinný kompartment vaječníkov produkujúci steroidné hormóny. Zohrávajú tiež úlohu pri regulovaní fyziológie vaječníkov. Mechanizmy zmiernovania oxidatívneho stresu v prasačích oocytoch sú veľmi zložité. Pridanie antioxidantov k zrejúcim oocytom môže zvýšiť enzýmovú aktivitu a odstrániť voľné radikály (Whitaker a Knight, 2008).

Olovo (Pb) a jeho zlúčeniny majú v súčasnosti rozsiahle technické použitie, preto olovo predstavuje dnes významný priemyselný jed nielen pre ľudí, ale aj pre hospodárske zvieratá (Jesenská et al., 2003).

Olovo je známy reprodukčný toxín, ktorý sa akumuluje v granulóznych bunkách vo vaječníkoch (Nampoothiri et al., 2007).

Olovo je schopné indukovať oxidatívny stres v závislosti na použitej koncentrácii olova

a času jeho pôsobenia (Annabi Berrahal et al., 2007; Wang et al., 2009).

Bíreš et al. (1995) zistili pri štúdiu distribúcie rizikových kovov v organizme oviec, že orgánom s najvyšším obsahom boli práve vaječníky, tiež obličky a pečeň.

U samíc sa účinky ťažkých kovov najčastejšie prejavujú vo zvýšenej atézii folikulov vo vaječníku ako aj zmenami stavby endometria maternice. Mnohé ťažké kovy výrazne negatívne ovplyvňujú steroidogénu (Kováčik et al., 2000). Zistilo sa, že v granulóznych bunkách vystavených pôsobeniu olova dochádza k zmenám v produkcii steroidov (Nampoothiri a Gupta, 2006), k zmenám vo folikulogéze (Priya et al., 2004) a k poklesu počtu buniek (Priya et al., 2004; Nampoothiri a Gupta, 2006). Poškodenia podobného charakteru potvrdzujú aj Paksy et al. (1997), ktorí skúmali kadmium (Cd) a zistili, že sa akumuluje v granulóznych bunkách vaječníkov, kde ovplyvňuje morfológiu týchto buniek a steroidogénu. Tiež Massányi et al. (2000) zistili zmeny v ultraštruktúre (nárast počtu lyzozómov, poškodenie Golgiho aparátu) a steroidogéze granulóznych buniek ošipovaných. Zemanová et al. (2006) zistili, že medzi ťažké kovy, ktoré negatívne ovplyvňujú reprodukciu, patrí aj nikel (Ni). Nampoothiri a Gupta (2006) uviedli, že olovo je oveľa toxickejšie ako kadmium a jeho intoxikácia inhibovala syntézu hormónov v granulóznych bunkách.

Tekálne bunky produkujú C_{19} steroidy, ktoré sa potom rozširujú do granulóznych buniek produkujúcich estradiol. Rozdiel v produkcii steroidných hormónov vzniká v dôsledku rozdielnej expresie kľúčových steroidogénnych enzýmov: 3β -hydroxysteroiddehydrogenáza (3β HSD) hlavne exprimovaných v tekálnych bunkách a 17β -hydroxysteroiddehydrogenáza (17β HSD) v granulóznych bunkách, ktoré produkujú estradiol pod vplyvom folikulostimulačného hormónu (FSH) a luteinizačného hormónu (LH) (Nampoothiri a Gupta, 2006).

Superoxididismutáza (SOD) je dôležitý antioxidantný enzým zodpovedný za elimináciu superoxidového radikálu, pričom mení tento radikál na kyslík a peroxid vodíka, ktorý je potom odstránený glutatiónpoxidázou alebo katalázou (Hu et al., 2005; Afonso et al., 2007).

Mn-SOD, ktorá chráni cytoplazmu a metabolické procesy v nej, bola objavená v granulóznych bunkách a v tekálnych bunkách zrejúcich oocytov, v luteálnych bunkách žltého telieska a epiteliálnych bunkách vajcovodov, kým Cu/Zn-SOD, ktorá chráni mitochondrie, bola lokalizovaná v tekálnych bunkách zrejúcich folikulov, na okraji žltého telieska a epiteliálnych bunkách vajcovodov (Lee et al., 2004).

Expresia Mn-SOD a Cu/Zn-SOD bola pozitívna v luteinizovaných a tekálnych bunkách. Expresia Cu/Zn-SOD vzrastá od skorej k strednej sekrečnej fáze súbežne s produkciou progesterónu v žltom teliesku. Cu/Zn-SOD má teda ochrannú funkciu pri zachovaní žltého telieska. Expresia Mn-SOD vrcholí v neskorej luteálnej fáze, čo naznačuje jej úlohu v luteálnej regresii. Najvyššie koncentrácie markerov OS sa prejavili v strede cyklu žltého telieska a boli spojené so syntézou steroidov, ktorá je v tejto etape maximálna (Agarwal et al., 2005b).

Nampoothiri a Gupta (2006) vystavili granulózne bunky samíc potkanov samostatnému pôsobeniu octanu olovnatého, octanu kadmennatého a tiež kombinácii týchto zlúčenín v dávke $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ hmotnosti počas 15 dní, pričom zistili, že oba tieto kovy sa akumulovali vo vaječníkoch po pôsobení týchto zlúčenín. Prítomnosť kovov a tiež ich kombinácie v granulóznych bunkách zapríčinila maximálny nárast lipoperoxidov a koncentrácie katalázy, súčasne s poklesom glutatiónového statusu a koncentrácie superoxididismutázy.

V našej práci sme zistili naopak vzrastajúcu koncentráciu SOD v médiách granulóznych buniek prasničiek, rozdiely však neboli štatisticky signifikantné ($P > 0,05$). Najvyššia priemerná koncentrácia superoxididismutázy v porovnaní s ostatnými skupinami bola zistená v skupine B s hodnotou $238,75 \pm 2,5 \text{ U.mL}^{-1}$, pričom skupina B bola vystavená pôsobeniu olova s koncentráciou $0,83 \text{ mg Pb.10 mL}^{-1}$. Najnižšia priemerná koncentrácia superoxididismutázy v porovnaní s ostatnými skupinami bola zistená v kontrolnej skupine s hodnotou $233,4 \pm 4,53 \text{ U.mL}^{-1}$.

Mechanizmy zmierňovania oxidatívneho stresu v oocytoch sú veľmi zložité. Nárast enzymatickej aktivity môže súvisieť so zvýšením expresie enzýmov, pretože vieme, že oxidatívne poškodenie vyvoláva bunkovú odpoveď, ktorou sa snaží vyvážiť tvorbu ROS. Takéto úvahy potvrdzujú Oberley et al. (1981) a Laloraya et al. (1989), ktorí uviedli, že prítomnosť vysokej koncentrácie superoxididismutázy v granulóznych bunkách a rastúcich folikuloch súvisí s veľkým množstvom superoxidu a jeho premenou na peroxid vodíka, ktorý predstavuje substrát pre glutatiónperoxidázu počas luteálnej steroidogenézy v žltom teliesku získaného z ovulovaných folikulov.

Ak je aktivita jedného alebo viacerých z antioxidantných enzýmov porušená, výsledný nárast ROS môže byť príčinou poškodenia DNA, destabilizácie proteínov, poškodenia cytoplazmatickej membrány a v konečnom dôsledku aj smrti bunky (Rueda et al., 1995).

Bíreš et al. (1995) zistili, že olovo vyvoláva rozpad červených krviniek a brzdí metabolizmus železa.

V súlade s výsledkami koncentrácie superoxiddismutázy dosiahnutými v našej práci sú výsledky Kasperczyk et al. (2004), ktorí uskutočnili experiment, pri ktorom sledovali vplyv olova (s koncentráciami 25-35 $\mu\text{L.dL}^{-1}$ a 35 $\mu\text{L.dL}^{-1}$) v krvnej plazme pracovníkov na koncentráciu superoxiddismutázy, pričom zistili, že koncentrácia Cu/Zn-SOD signifikantne vzrástla v krvnej plazme v skupinách vystavených pôsobeniu olova v porovnaní s kontrolnou skupinou. Celková koncentrácia SOD v krvnej plazme v kontrolnej skupine pracovníkov nevystavených pôsobeniu olova dosahovala hodnotu $10,4 \pm 4,65 \text{ U.mL}^{-1}$. Celková koncentrácia SOD v krvnej plazme v skupine pracovníkov s koncentráciou olova 25-35 $\mu\text{L.dL}^{-1}$ bola $12,6 \pm 4,87 \text{ U.mL}^{-1}$ a v skupine pracovníkov s koncentráciou olova viac ako 35 $\mu\text{L.dL}^{-1}$ bola $11,1 \pm 5,57 \text{ U.mL}^{-1}$.

K opačným výsledkom dospeli Kulikowska-Karpińska a Moniuszko-Jakoniuk (2001), ktorí sledovali koncentráciu antioxidantných enzýmov v krvi potkanov intoxikovaných olovom (v koncentrácii 500 mg Pb.dm^{-3} po dobu 6 týždňov). Zistili, že pridávanie olova zapríčinilo pokles koncentrácie superoxidismutázy, pričom jej hodnota bola $143,00 \pm 11,30 \text{ U.mL}^{-1}$. V kontrolnej skupine bez prítomnosti olova bola zistená vyššia koncentrácia SOD $178,00 \pm 17,20 \text{ U.mL}^{-1}$.

K podobný výsledkom sa dopracovali aj Patil et al. (2006), ktorí sledovali koncentráciu SOD a KAT v krvi pracovníkov vystavených pôsobeniu olova počas 15 rokov, pričom zistili signifikantný pokles koncentrácie týchto enzýmov v skupine pracovníkov s koncentráciou olova v krvi 25,8-78,0 $\mu\text{L.dL}^{-1}$ v porovnaní s kontrolnou skupinou pracovníkov, u ktorých koncentrácia olova dosahovala hodnoty 2,8 – 22, 0 $\mu\text{L.dL}^{-1}$. Predpokladali, že pokles koncentrácie SOD v skupine pracovníkov s vysokou koncentráciou olova v krvi bol pravdepodobne spôsobený interakciou olova s molekulami medi. Keďže Cu/Zn-SOD je enzým, ktorý obsahuje meď, dlhodobé pôsobenie olova spôsobuje deficit medi a s tým spojený pokles koncentrácie SOD.

Lovásová (2004) sledovala vplyv vyšších dávok iných ťažkých kovov - kadmia (Cd) a ortuti (Hg) na zmeny aktivity superoxiddismutázy červených krviniek u potkanov. Pokusné skupiny v prvej sérii prijímali po dobu 30 dní $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ rozpustený v pitnej vode v dávkach 1,83 - 29,27 mg $\text{CdCl}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{deň}^{-1}$ a skupiny v druhej sérii prijímali HgCl_2 rozpustený v pitnej vode v dávkach 0,15 - 2,47 mg $\text{HgCl}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{deň}^{-1}$. Kontrolné skupiny v prvej a druhej sérii prijímali čistú pitnú vodu. V odobranej krvi sa zistilo zvýšenie aktivity SOD. Tieto výsledky vypovedajú o tom, že Cd a Hg majú na aktivitu SOD podobný vplyv ako olovo. K rovnakým výsledkom dospeli aj Kostic et al. (1993),

ktorí sa domnievajú, že takéto zmeny sú odpoveďou bunky na zvýšenú tvorbu ROS, ktorá je vyvolaná dlhodobou intoxikáciou ťažkými kovmi.

Olovo má tiež negatívny vplyv na kvalitu spermií (Massányi et al., 2003; Massányi et al., 2005). V súvislosti s intoxikáciou olovom sa popisuje hyperplázia Leydigových buniek v atrofických tubuloch, ako aj poruchy spermatogenézy vrátane výskytu oligospermie, azospermie a atenospermie (Scialli, Zinaman, 1993) a tiež pokles objemu semenotvorného epitelu, poklesu objemu interstícia, zväčšeniu objemu lúmenu kanálikov semenníka a zvýšený výskyt apoptózy semenotvorných buniek potkanov (Toman et al., 2006).

Celkový antioxidačný status (TAS) je definovaný ako suma celkových endogénnych a potravou prijímaných antioxidantov v extracelulárnych tekutinách jednotlivca. Spolupôsobenie všetkých rozličných antioxidantov zaobstaráva ochranu proti vplyvu ROS alebo RNS lepšie ako jednotlivé zložky samostatne (Miller et al., 1993).

V našej práci sme zistili, že najvyššia hodnota koncentrácie TAS v granulóznych bunkách bola nameraná v kontrolnej skupine bez olova ($1,429 \pm 0,014 \text{ mmol.L}^{-1}$) v porovnaní s ostatnými skupinami, ktoré boli vystavené rôznym koncentráciám olova. Preukaznosť ($P < 0,05$) bola zistená pri skupine B ($1,27125 \pm 0,054 \text{ mmol.L}^{-1}$), kde koncentrácia olova dosahovala hodnotu $0,83 \text{ mg Pb.10 mL}^{-1}$.

K rovnakým výsledkom dospeli Lovásová et al. (2003), ktorí skúmali vplyv kadmia a ortuti na celkový antioxidačný status v krvnej plazme potkanov. V prvej sérii pokusu bol celkový antioxidačný status plazmy skupín zvierat, ktoré prijímali CdCl_2 (v dávkach od 1,83 do 29,27 $\text{mg CdCl}_2.\text{kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$) oproti kontrolnej skupine ($1,17 \pm 0,09 \text{ mmol.L}^{-1}$) signifikantne znížený. V druhej sérii pokusu bol celkový antioxidačný status plazmy vo všetkých skupinách zvierat, ktoré prijímali HgCl_2 (v dávkach od 0,15 do 2,47 $\text{mg HgCl}_2.\text{kg}^{-1}.\text{deň}^{-1}$) oproti kontrolnej skupine ($1,05 \pm 0,08 \text{ mmol.L}^{-1}$) tiež znížený.

6 Záver

Reprodukčný cyklus samíc ovplyvňuje pôsobenie nervového, endokrinného a reprodukčného systému, pričom výsledkom tohto vzájomného pôsobenia je produkcia zreých a oplodnenia schopných oocytov, rovnako ako aj vytvorenie priaznivého prostredia pre vznik a zachovanie gravidity. Pohlavné orgány slúžia ako veľmi citlivý barometer prítomnosti rôznych rizikových prvkov nachádzajúcich sa v životnom prostredí. Toxické kovy zapríčiňujú zvýšenú produkciu reaktívnych foriem kyslíka, ktoré následkom ich účinku a tiež vyčerpaním antioxidantov v organizme indukujú vznik oxidatívneho stresu v bunkách.

V našej práci sme sledovali vplyv octanu olovnatého (v koncentráciách 5; 2,5; 0,83; 0,625 a 0,455 mg Pb.10 mL⁻¹) na celkový antioxidačný status a koncentráciu superoxiddismutázy v kultivačných médiách granulóznych buniek prasničiek *in vitro*, pričom po vyhodnotení experimentu sme zistili, že:

- koncentrácia superoxiddismutázy (SOD) v skupinách vystavených olovu v porovnaní s kontrolnou skupinou bez olova vzrástla
- celkový antioxidačný status (TAS) v skupinách vystavených olovu v porovnaní s kontrolnou skupinou poklesol
- preukaznosť ($P < 0,05$) bola zistená v skupine B ($1,27125 \pm 0,054$ mmol.L⁻¹) pri analýze TAS, kde koncentrácia olova dosahovala hodnotu 0,83 mg Pb.10 mL⁻¹

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že olovo vo forme octanu olovnatého ovplyvňuje antioxidačný status granulóznych buniek. Takže olovo pridané v kultivačnom médiu môže indukovať oxidatívny stres.

7 Zoznam použitej literatúry

- ADACHI, T. et al. 1993. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. In *The Biochemical journal*, roč. 289, 1993, s. 523-527. ISSN 0264-6021.
- AFONSO, V. et al. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. In *Joint Bone Spine*, roč. 74, 2007, č. 4, s. 324-329. ISSN 1297-319X.
- AGARWAL, Ashok – ALLAMANENI, Shyam S. R. 2004. Oxidants and antioxidants in human fertility. In *Middle East Fertility Society Journal*, roč. 9, 2004, č. 3, s. 187-197. ISSN 1110-5690.
- AGARWAL, Ashok – ALLAMANENI, Shyam S. R. 2006. Oxidative Stress and Human reproduction. In *Oxidative stress, disease and cancer*, 2006, s. 696-698. ISSN 0268-1161.
- AGARWAL, Ashok – GUPTA, Sajal – SHARMA, Rakesh K. 2005a. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. In *Reproductive BioMedicine Online*, roč. 11, 2005, č. 5, s. 641-650. ISSN 1472-6483.
- AGARWAL, Ashok – GUPTA, Sajal – SHARMA, Rakesh K. 2005b. Role of oxidative stress in female reproduction. In *Reproductive Biology and Endocrinology*, roč. 3, 2005, s.3-28. ISSN 1477-7827.
- AGARWAL, Ashok – GUPTA, Sajal. 2006. The Role of Free Radicals and Antioxidants in Female Infertility and Assisted Reproduction. In *US Genito-urinary disease*, 2006. s. 60-65. ISSN 0003-4819.
- AGARWAL, Ashok – GUPTA, Sajal – SIKKA, Suresh. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. In *Current Option in Obstetrics and Gynecology*, roč. 18, 2006, č. 3, s. 325-332. ISSN 1040-872X.
- ANNABI BERRAHAL, Alya et al. 2007. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. In *Comptes rendus biologies*, roč. 330, 2007, č. 8, s. 581-588. ISSN 1631-0691.
- ATTIEH, Z.K. et al. 1999. Celuroplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. In *The Journal of Biological Chemistry*, roč. 274, 1999, s. 1116-1123. ISSN 0021-9258.
- AUST, Steven D. 1995. Ferritin as a source of iron and protection from iron-induced toxicities. In *Toxicology Letters*, roč. 82-83, 1995, s. 941-944. ISSN 0378-4274.
- BECKMAN, J.S. – KOPPENOL, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite : the good, the bad, and ugly. In *The American journal of physiology*, roč. 271, 1996, č. 5,

s. 1424-1437. ISSN 0002-9513.

BENJAMIN, Ivor J. – McMILLAN, D. Randy. 1998. Stress (heat shock) proteins:molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. In *Circulation research*, roč. 83, 1998, č. 2, s 117-132. ISSN 0009-7330.

BERLETT, Barbara S. – STADTMAN, Earl R. 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. In *Journal of Biological Chemistry*, 1997, s. 20313-20316. ISSN 0021-9258.

BÍREŠ, Jozef et al. 1995. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. In *Veterinary and human toxicology*, roč. 37, 1995, č. 4, s. 349-356. ISSN 0145-6296.

BLACKMORE, Daniel G. et al. 2004. Biosynthesis of Canine Zona Pellucida Requires the Integrated Participitacion of Both Oocytes and Granulosa Cells. In *Biology of reproduction*, 2004, s. 661-668. ISSN 0006-3363.

CAPCAROVÁ, Marcela et al. 2009. Antioxidant status and selected biochemical parameters of porcine ovarian granulosa cells exposed to lead *in vitro*. In *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2009, s. 1617-1623. ISSN 1093-4529.

ĎURAČKOVÁ, Zdena et al. 1999. *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (II)*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1999. 315 s. ISBN 80-88908-46-9.

FERENČÍK, Miroslav et al. 1997. *Zápal, bolesť, horúčka*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1997. 209 s. ISBN 80-85665-81-6.

FUKUSHIMA, T. – ADACHI, T. – HIRANO, K. 1995. The heparin-binding site of human xanthine oxidase. In *Biological & pharmaceutical bulletin*, roč. 18, 1995, č. 1, s. 156-158. ISSN 0918-6158.

GOUD, A.P. et al. 2004. Dynamic changes in microtubular cytoskeleton of human postmature oocytes revert after ooplasm transfer. In *Fertility and sterility*, roč. 81, 2004, č. 2, s. 323-331. ISSN 0015-0282.

GOUD, A.P. et al. 2005a. Nitric Oxide Delays Oocyte Aging. In *Biochemistry*, roč. 44, 2005, č. 34, s. 11361–11368. ISSN 0302-4369.

GOUD, A.P. et al. 2005b. Microtubule turnover in ooplasm biopsy reflects ageing phenomena in the parent oocyte. In *Reproductive biomedicine online*, roč. 11, 2005, č. 1, s. 43-52. ISSN 1472-6483.

GUPTA, Sajal et al. 2009. Antioxidants and female reproductive pathologies. In *Archives of Medical Science*, 2009, č. 5, s. 151-173. ISSN 1734-1922.

- GURAYA, Sardul S. 1971. Morphology, histochemistry and biochemistry of human ovarian compartments and steroid hormone synthesis. In *Physiological Reviews*, 1971, č. 5, s. 785. ISSN 0031-9333.
- HALLIWELL, Barry. 1989. Tell me about free radicals, doctor: a review. In *Journal of the Royal Society of Medicine*, roč. 82, 1989, č. 12, s. 747-752. ISSN 0141-0768.
- HALLIWELL, Barry. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. In *Nutrition reviews*, 1997, č. 55, s. 44-52. ISSN 0029-6643.
- HARMAN, Denham. 2000. Aging: overview. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, s. 1-21. ISSN 0077-8923.
- HARRIS, Jeffrey D. et al. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families. In *Mitochondrial DNA*, roč. 4, 1994, s. 361 – 393. ISSN 1940-1736.
- HU, Yumin et al. 2005. Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase Expression in Ovarian Cancer. In *Journal of Biological Chemistry*, roč. 280, 2005, č. 47, s. 39485-39492. ISSN 0021-9258.
- CHEN, Quan – CROSBY, Meredith – ALMASAN, Alex. 2003. Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. In *Korean Journal of Biological Sciences*, 2003, s. 1-9. ISSN 1226-5071.
- CHOI, W.J. et al. 2007. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. In *Fertility and sterility*, roč. 88, 2007, s. 1220-1231. ISSN 0015-0282.
- CHRENEK, Peter. 2008. *Genetické manipulácie s embryami*. Nitra : SCPV, 2008. 98 s. ISBN 978-80-88872-79-5.
- JAKUŠ, V. – LOPÚCHOVÁ, M. 1999. Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systém in liver diseases. In *Bratislavské lekárske listy*, 1999, č.10, s. 548-559. ISSN 0006-9248.
- JESENSKÁ, M. et al. 2003. Koncentrácia olova v krvnom sére, mlieku a moči dojnic. In *Rizikové faktory potravinového reťazca III : zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2003, s. 51-52. ISBN 80-8069-282-3.
- KALOUSOVÁ, Marta et al. 2006. *Patobiochemie ve schématech*. Praha : Grada Publishing, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.

- KASPERCZYK, Slawomir et al. 2004. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, roč. 11, 2004, č. 2, s. 291-296. ISSN 1232-1966.
- KLIMENT, Jozef et al. 1989. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*, 2. vyd. Bratislava : Príroda, 1989. 378 s. ISBN 80-07-00027-5.
- KOLESÁROVÁ, Adriana – SIROTKIN, Alexander – KOVÁČIK, Jaroslav. 2008. *Endokrinné a vnútrobunkové mechanizmy pohlavného dospievania prasničiek*. Nitra : SPU, 2008. 131 s. ISBN 978-80-552-0109-2.
- KOSTIC, M. M. et al. 1993. Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. In *European Journal of Haematology*, roč. 51, 1993, s. 86-92. ISSN 0902-4441.
- KOVÁČIK, Jaroslav et al. 2000. *Rizikové faktory potravinového reťazca človeka*. Nitra : SPU, 2000. 143 s. ISBN 80-7137-796-1.
- KRONCKE, Klaus D. – FEHSEL, Karin – KOLB-BACHOFEN, Victoria. 1997. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when, and where? In *Nitric Oxide*, roč. 1, 1997, č. 2, s. 107-120. ISSN 1089-8603.
- KRZYSZTOFOWICZ, Anna – STOKLOSOWA, Stanislaw. 2007. Ultrastructure of Theca Interna Cells of Porcine Ovarian Follicle. In *Anatomia, Histologia, Embryologia*, roč. 6, 2007, s. 359-364. ISSN 0340-2096.
- KULIKOWSKA-KARPIŃSKA, E. – MONIUSZKO-JAKONIUK, J. 2001. Lead and Zinc Influence on Antioxidant Enzyme Activity and Malondialdehyde Concentrations. In *Polish Journal of Environmental Studies*, roč. 10, 2001, č.3, s. 161-165. ISSN 1230-1485.
- KULÍŠEK, Václav et al. 1996. *Cytológia, histológia a emryológia*. Nitra : Vysoká škola poľnohospodárska, 1996. 172 s. ISBN 80-7137-334-6.
- KULÍŠEK, Václav – HLUCHÝ, Svätoslav – TOMAN, Róbert. 2006. *Cytológia, histológia a emryológia*. Nitra : SPU, 2006. 196 s. ISBN 80-8069-764-7.
- LALORAYA, M. – KUMAR, G. P. – LALORAYA, M. M. 1989. Histochemical study of superoxide dismutase in the ovary of the rat during the oestrus cycle. In *Journal of Reproduction and Fertility*, 1989, č. 86, s. 583-587. ISSN 0022-4251.
- LEE, J. – KOO, N. – MIN, D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. In *Comprehensive reviews in food science and food safety*, roč. 3, 2004, s. 21-33. ISSN 1541-4337.
- LOCKITCH, Gillian. 1993. Perspectives on lead toxicity. In *Clinical Biochemistry*, roč. 26, 1993, č.5, s. 371-381. ISSN 0009-9120.

- LOVÁSOVÁ, E. et al. 2002. The effect of chronic cadmium and mercury exposure on the plasma total antioxidant status in rats. In *Folia Veterinaria*, roč. 46, 2002, č. 2, s. 61-64. ISSN 0015-5748.
- LOVÁSOVÁ, E. – ŠIPULOVÁ, A. – RÁČZ, O. 2003. Vplyv intoxikácie kadmíom a ortuťou na celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy. In *Rizikové faktory potravinového reťazca III : zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2003, s. 84-85. ISBN 80-8069-282-3.
- LOVÁSOVÁ, E. 2004. Vplyv subchronickej intoxikácie ťažkými kovmi na antioxidačný status organizmu. In *Risk factors of food chain*. Nitra : Slovak Agricultural University, 2004, s. 152-154. ISBN 80-8069-416-8.
- LUKÁČOVÁ, Jana. 2008. *Volné radikály a reprodukčné funkcie samíc* : bakalárska práca. Nitra : SPU, 2008. 43 s.
- MALINA, Radovan. 2004. *Všeobecná zoológia*. Banská Bystrica : Telperion, 2004. 98 s. ISBN 80-8055-897-3.
- MASSÁNYI, Peter. 1996. *Štrukturálne zmeny vaječníka, vajcovodu a maternice samice kráľika po podaní kadmia*. Nitra : Vysoká škola poľnohospodárska, 1996. 70 s. ISBN 80-7137-336-2.
- MASSÁNYI, Peter et al. 1999. *Reprodukčná toxikológia*. Nitra : SPU, 1999. 147 s. ISBN 80-7137-641-8.
- MASSÁNYI, Peter et al. 2000. Effects of cadmium on ultrastructure and steroidogenesis in cultured porcine ovarian granulosa cells. In *Acta Veterinaria Brno*, 2000, č. 69, s. 101-106. ISSN 0001-7213.
- MASSÁNYI, Peter et al. 2003. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in boar semen and relation to the spermatozoa quality. In *Journal of environmental science and health Part A*, roč. 38, 2003, č. 11, s. 2643-2651. ISSN 1093-4529.
- MASSÁNYI, Peter et al. 2005. Seminal concentration of trace elements in fox and relationships to spermatozoa quality. In *Journal of environmental science and health Part A*, roč. 40, 2005, č. 5, s. 1097-1105. ISSN 1093-4529.
- MATOS, L. et al. 2009. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. In *Molecular Human Reproduction*, roč. 15, 2009, č. 7, s. 411-419. ISSN 1360-9947.
- McCORD, Joe M. 2006. Free radicals and antioxidants. In *African Journal of Biochemical Research*, 2006, s. 1-10. ISSN 1996-0778.

- McCORD, Joe M. – EDEAS, Marvin A. 2005. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. In *Biomedecine & Pharmacotherapy*, roč. 59, 2005, s. 139-142. ISSN 0753-3322.
- MILLER, N.J. – RICE-EVANS, C. – DAVIES, M.J. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. In *Clinical Science*, 1993, č.84, s. 407–412. ISSN 0143-5221.
- MUCHOVÁ, J. et al. 2004. *Lekárska chémia a toxikológia pre nelekárske študijné odbory*. Bratislava : Vydavateľstvo UK, 2004. 152 s. ISBN 80-223-1934-1.
- NAMPOOTHIRI, Laxmi Priya – GUPTA, Sarita. 2006. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: A cellular model for ovarian toxicity. In *Reproductive Toxicology*, roč. 21, 2006, č. 2, s. 179-185. ISSN 0890-6238.
- NAMPOOTHIRI, Laxmi Priya – AGRAWAL, Avnika – GUPTA, Sarita. 2007. Effect of co-exposure to lead and cadmium on antioxidant status in rat ovarian granulosa cells. In *Archives of Toxicology*, roč. 81, 2007, č. 3, s. 145-150. ISSN 0340-5761.
- NORDBERG, Gunnar F. et al. 2007. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press/Elsevier, 2007. 975 s.
- OBERLEY, L.W. – OBERLEY, T.D. – BUETTNER, G.R. 1981. Cell division in normal and transformed cells: the possible role of superoxide and hydrogen peroxide. In *Medical Hypotheses*, roč. 7, s. 21-42. ISSN 0306-9877.
- PATIL, Arun J. et al. 2006. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in Battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, roč. 3, 2006, č. 4, s. 329-337. ISSN 1661-7827.
- PAKSY, Katalin et al. 1997. Effect of Cadmium on Morphology and Steroidogenesis of Cultured Human Ovarian Granulosa Cells. In *Journal of Applied Toxicology*, roč. 17, 1997, č. 5, s. 321-327. ISSN 0260-437X.
- PIVKO, Juraj. 1995. *Morfogenéza oocytov a raných embryí niektorých živočíchov*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1995. 113 s. ISBN 80-85665-53-0.
- POPESKO, Peter et al. 1992. *Anatómia hospodárskych zvierat*. Bratislava : Príroda, 1992. 536 s. ISBN 80-07-00542-0.
- PRIYA P.N. – PILLAI, A. – GUPTA, S. 2004. Effect of simultaneous exposure to lead and cadmium on gonadotropin binding and steroidogenesis on granulosa cells: An in vitro study. In *Indian journal of experimental biology*, roč. 42, 2004, č. 2, s. 143-148. ISSN 0019-5189.

- RUEDA, Bo R. et al. 1995. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. In *Endocrine*, 1995, s. 227-232. ISSN 0969-711X.
- SCIALLI, R.A. – ZINAMAN, J.M. 1993. *Reproductive toxicology and infertility*. New York : McGraw-Hill Inc., 1993. 338 s. ISBN 0-07-106438-3.
- SHARMA, R.K. – AGRAWAL, A. 1994. Role of reactive oxygen species in male infertility. In *Urology*, roč. 48, 1996, č. 6, s. 835-850. ISSN 0090-4295.
- SOLTNER, Dominique. 1989. *La reproduction des animaux d'élevage*. Sciences et techniques agricoles. Le clos Lorelle, 241 s.
- ŠTÍPEK, Stanislav et al. 2000. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha : Grada Publishing, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- TARIN, Juan J. 1996. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. In *Molecular Human Reproduction*, roč. 2, 1996, č. 10, s. 717-724. ISSN 1360-9947.
- TOMAN, Róbert et al. 2006. Toxické účinky vybraných kovov zistené v experimentoch. In *Rizikové faktory potravinového reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 311-317. ISBN 80-8069-760-4.
- VALENZUELA, Alfonso B. – SANHUEZA, Julio – NIETO, Susana. 2003. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. In *Grasas y aceites*, 2003, s. 295-303. ISSN 0017-3495.
- WANG, L. et al. 2009. Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. In *Archives of Toxicology*, roč. 83, 2009, č. 5, s. 417-427. ISSN 0340-5761.
- WASSARMAN, P. et al. 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. In *The Journal of experimental zoology*, roč. 285, 1999, č. 3, s. 251-258. ISSN 0022-104X.
- WESSELS, Norman K. – HOPSON, Janet L. 1998. *Biology*. New York : Random House, 1998. 1251 s. ISBN 80-394-3372-8.
- WHITAKER, D.B. – KNIGHT, J.W. 2008. Mechanisms of oxidative stress in porcine oocytes and the role of anti-oxidants. In *Reproduction, Fertility and Development*, roč. 20, 2008, č. 6, s. 694-702. ISSN 1031-3613.
- ZACHAR, Dušan et al. 2004. *Humánna výživa II*. Zvolen : TU, 2004. 218 s. ISBN 80-228-1293-5.

ZALBA, G. et al. 2000. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. In *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2000, s. 57-64. ISSN 1138-7548.

ZELKO, IGOR N. – MARIANI, THOMAS J. – FOLZ, RODNEY J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. In *Free Radical Biology & Medicine*, roč. 33, 2002, č. 3, s. 337-349. ISSN 0891-5849.

ZEMANOVÁ, Jiřina et al. 2006. Aktivita granulóznych buniek vaječníka kráľika po podaní niklu a zinku. In *Rizikové faktory potravného reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 311-317. ISBN 80-8069-760-4.

<http://genetika.wz.cz/gametogeneze.htm> [2008-03-10]