

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE**

**FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

2118302

**VPLYV OLOVA NA KVALITATÍVNE A ANTIOXIDAČNÉ  
UKAZOVATELE *IN VITRO* KULTIVOVANÝCH  
KRÁLIČÍCH EMBRYÍ**

**2010**

**Jarmila Masaryková, Bc.**

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

**VPLYV OLOVA NA KVALITATÍVNE A ANTIOXIDAČNÉ  
UKAZOVATELE *IN VITRO* KULTIVOVANÝCH  
KRÁLIČÍCH EMBRYÍ**

**(Diplomová práca)**

Študijný program:	Biotechnológia
Študijný odbor:	5.2.25 biotechnológia
Školiace pracovisko:	Katedra fyziológie živočíchov
Školiteľ:	doc. Ing. Norbert Lukáč, PhD.

**Nitra 2010**

**Jarmila Masaryková, Bc.**

## Čestné vyhlásenie

Podpísaná Bc. Jarmila Masaryková čestne prehlasujem, že som záverečnú diplomovú prácu na tému „Vplyv olova na kvalitatívne a antioxidačné ukazovatele *in vitro* kultivovaných králičích embryí“ 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 20. marca 2010

.....

Podpis

## **Pod'akovanie**

V prvom rade by som chcela poďakovať doc. Ing. Norbertovi Lukáčovi, PhD., za vedenie pri výskume, poskytnutie materiálu a za cenné pripomienky pri spracovaní tejto diplomovej práce. Moja vďaka patrí aj Ing. Adriane Kolesárovej, PhD., Ing. Alexandrovi V. Makarevichovi, DrSc., doc. Ing. Petrovi Chrenkovi, DrSc. a celému kolektívu KFZ za pomoc pri experimentálnych prácach a všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli k úspešnému ukončeniu diplomovej práce.

Diplomová práca bola finančne podporená prostredníctvom projektov VEGA – 1/0696/08, DVVČ – FBP – 16/2009.

## Abstrakt

Vývoj preimplantačných embryí prebieha viacerými vývojovými štádiami, pri ktorých existujú medzidruhové rozdiely. Skorý vývoj ranného embrya je veľmi citlivý hlavne v priebehu prvých delení, pričom na jeho vývoj môžu vplývať rôzne cudzorodé látky, voľné radikály, ťažké kovy a mnoho ďalších. Je ovplyvnené aj prostredím, v ktorom sa embryo vyvíja. S účinkom voľných radikálov (VR) súvisí aj vznik oxidačného stresu. VR a oxidačný stres môžu spôsobovať rôzne ochorenia, ale môžu mať aj priamy vplyv na embryo, pričom môžu spôsobiť preeklampsiu, ktorá sa považuje za jednu z najzávažnejších porúch počas tehotenstva. Okrem voľných radikálov môžu mať negatívny vplyv na embryo aj ťažké kovy, napr. kadmium, ortuť, olovo. Cieľom našej práce bolo sledovanie vplyvu olova na kvalitatívne a antioxidantné ukazovatele králičích embryí, ktoré boli kultivované *in vitro*. V našej práci sme sa zamerali na stanovenie antioxidantného statusu FRAP (feroredukčná schopnosť plazmy/média), TAS (celková antioxidantná kapacita) a koncentrácie albumínu v kultivačnom médiu a na stanovenie morfolologickej charakteristiky embryí, kde sa sledoval výskyt apoptotických buniek embryí pomocou TUNEL metódy. Pri stanovení FRAP sa najvyššie priemerné hodnoty zistili v kultivačných médiách králičích embryí, ktoré boli vystavené koncentrácii olova  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , kde bola zaznamenaná priemerná hodnota  $324,56 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Rovnako ako pri stanovení celkovej antioxidantnej kapacity (TAS), tak aj pri koncentrácii albumínu, sa zistili najvyššie priemerné hodnoty vo vzorke kontroly. Pri TAS sa zistila priemerná koncentrácia kontroly  $0,086 \text{ mmol.L}^{-1}$ , koncentrácia albumínu v kontrolných vzorkách kultivačných médií bola  $1,882 \text{ g.L}^{-1}$ . Pri sledovaní vplyvu olova na vznik apoptózy, sme zistili na základe dosiahnutých výsledkov a ich vzájomným porovnaním, že olovo v sledovaných koncentráciách (Pb1 – koncentrácia olova –  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Pb5 – koncentrácia olova –  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) nemá vplyv na apoptózu králičích embryí. Najvyššia priemerná hodnota TN (počet embryonálnych buniek pozitívnych na apoptózu) sa zistila pri vzorke kontroly 1,533 v porovnaní so vzorkami embryí, ktoré boli vystavené vplyvu olova, kde sme prekvapujúco zistili nižšie hodnoty. V skupine Pb1 sa zistila hodnota 0,35 a v skupine Pb5 hodnota 0,3.

**Kľúčové slová:** voľné radikály, antioxidanty, embryonálny vývoj, oxidatívny stres, vplyv olova, apoptóza, ťažké kovy

## Abstract

The preimplantation embryo development involves several stages, which are characterised by interspecies differences. The early blastocyst stage is very sensitive, especially during the first divisions, whereas its development can be affected by various foreign substances, free radicals, heavy metals and many others. It is also affected by the environment in which the embryo develops. The effect of free radicals (FR) is related to the formation of oxidative stress. FR and oxidative stress can cause various diseases, but they can also directly affect the embryo and cause preeclampsia, which is considered to be one of the most serious conditions during pregnancy. Apart from the free radicals, heavy metals, such as cadmium, mercury and lead, can also have a negative impact on the embryo. The objective of our work was to assess the effects of lead on qualitative and antioxidative parameters of rabbit embryos cultivated *in vitro*. In our work, we concentrated on determining the FRAP (ferric reducing ability of plasma/medium) antioxidative status, TAS (total antioxidant status) and albumin concentration in cultivation medium and the morphological characteristics of embryos, where we observed the incidence of apoptotic cells in embryos using the TUNEL method. When performing FRAP, the highest average values were observed in the cultivation media of rabbit embryos exposed to lead concentration of  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , where we observed an average value of  $324,56 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ . When assessing the total antioxidation status (TAS) and albumin concentration, the highest average values were obtained in the control sample. In the case of TAS, we observed an average concentration in the control group  $0,086 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; the albumin concentration in the control samples was  $1,882 \text{ g.L}^{-1}$ . By observing the effects of lead on the incidence of apoptosis, we observed on contribution, on the results and their comparison, to the opinion that lead in observed concentrations (Pb1 – lead concentration –  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Pb5 – lead concentration –  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) does not affect the apoptosis of rabbit embryos. The highest average TN (number of embryonic cells positive for apoptosis) value of 1,533 was detected in the control group, in comparison to embryo samples exposed to lead, where we surprisingly obtained lower values. In the Pb1 group, we determined a value of 0,35 and in the Pb5 group a value of 0,3.

**Key words:** free radicals, antioxidants, embryonic development, oxidative stress, lead influence, apoptosis, heavy metals

# Obsah

<b>Obsah.....</b>	<b>6</b>
<b>Zoznam skratiek a značiek .....</b>	<b>8</b>
<b>Úvod .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí.....</b>	<b>13</b>
1.1 Intrauterinný vývoj jedinca.....	13
1.1.1 Oplodnenie.....	13
1.1.2 Ovulárna fáza.....	14
1.1.3 Embryonálna fáza.....	14
1.1.4 Fetálna fáza.....	18
1.2 Voľné radikály .....	18
1.2.1 Radikály odvodené od kyslíka.....	20
1.2.2 Radikály odvodené od dusíka .....	25
1.2.3 Radikály odvodené od organických zlúčenín .....	26
1.3 Oxidatívny stres .....	27
1.3.1 Poškodenie biologických membrán lipoperoxidáciou.....	27
1.3.2 Oxidačné poškodenie proteínov.....	28
1.3.3 Poškodenie DNA voľnými radikálmi .....	29
1.3.4 Oxidačné poškodenie enzýmových komplexov a bunkovej signalizácie.....	30
1.4 Vplyv oxidačného stresu na intrauterinný vývoj jedinca.....	31
1.5 Mechanizmy protektivity voči účinku voľných radikálov.....	33
1.5.1 Antioxidačné ochranné mechanizmy.....	34
1.5.1.1 Enzýmové antioxidačné systémy.....	36
1.5.1.2 Vysokomolekulové endogénne antioxidanty.....	37
1.5.1.3 Nízkomolekulové endogénne antioxidanty.....	38
1.6 Vplyv olova na organizmus.....	41
<b>2 Cieľ práce .....</b>	<b>44</b>
<b>3 Metodika práce a metódy skúmania .....</b>	<b>45</b>
3.1 Stanovenie antioxidačného statusu .....	45
3.1.1 FRAP - feroredukčná schopnosť plazmy/média.....	45
3.1.2 TAS - celková antioxidačná kapacita.....	46
3.1.3 Albumín.....	47

3.2 Morfológická charakteristika embryí.....	48
3.2.1 TUNEL metóda.....	48
<b>4 Výsledky práce .....</b>	<b>49</b>
4.1 Stanovenie antioxidačného statusu.....	49
4.2 Stanovenie morfológickej charakteristiky embryí.....	51
<b>5 Diskusia.....</b>	<b>53</b>
<b>6 Záver .....</b>	<b>56</b>
<b>7 Použitá literatúra.....</b>	<b>57</b>



## Zoznam skratiek a značiek

- $\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$**  – trichlórmetylperoxylový radikál
- $\cdot\text{OH}$**  – hydroxylový radikál
- $^1\text{O}_2$**  – singletový kyslík
- 4-HNE** – 4-hydroxynonenal
- AAS** – atómová absorbná spektrometria
- ADP** – adenzindifosfát
- Alb.** – Albumín
- ART** – asistovaná reprodukčná technológia
- BCG** – bromkresolová zeleň
- BSA** – bovinný (hovädzi) sérový albumín
- CSH** – cysteín
- DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DNA** – deoxyribonukleová kyselina
- dUTP** – Deoxyuridine Triphosphate – deoxyuridín trifosfát
- E $\cdot$**  – tokoferolový radikál
- ETAAS** – elektrotermická AAS
- FAAS** – plameňová AAS
- FCS** – fetálne teläacie sérum
- FITC** – Fluorescein isothiocyanate – Izotiokyanát fluorescínu
- FRAP** – feroredukčná schopnosť plazmy/média
- GFAAS** – AAS s grafitovou kyvetou
- GPx** – glutatiónperoxidáza
- GR** – glutatiónreduktáza
- GSH** – glutatión
- GSSG** – oxidovaný glutatión (glutatiónsulfid)
- GST** – glutatióntransferáza
- H $_2$ O $_2$**  – hydrogénperoxid (peroxid vodíka)
- hCG** – ľudský choriový gonadotropín
- HClO** – kyselina chlórna
- HO $_2\cdot$**  – superoxid (protonizovaná forma)
- ICP-MS** – indukčne viazaná plazmová a hmostnostná spektrometria
- ICSI** – intracytoplazmatické oplodnenie spermou

**IVF** – *in vitro* oplodnenie  
**KAT** – kataláza  
**LH** – nenasýtený lipid  
**LO<sup>•</sup>** – peroxylový radikál  
**LOO<sup>•</sup>** – lipoperoxylový radikál  
**LOOH** – lipoperoxid (hydroperoxid)  
**MDA** – malondialdehyd  
**MPO** – myeloperoxidáza  
**mtDNA** – mitochondriálna deoxyribonukleová kyselina  
**MZT** – prechod z materálnej na zygotickú kontrolu  
**NADPH** – nikotínamidifosfáthydrogenáza  
**NO** – oxid dusnatý  
**NOS** – syntetáza oxidu dusnatého  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** – superoxid (neprotionizovaná forma)  
**OS** – oxidatívny stres  
**p53** – transkripčný faktor  
**PARP** – poly(ADP)ribózapolymeráza  
**Pb** – olovo  
**PBS** – fosfátový tlmivý roztok  
**PVP** – polyvinylpyrrolidon  
**RNS** – reaktívne formy dusíka  
**RO<sup>•</sup>** – alkoxylový radikál  
**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – alkylperoxylový radikál  
**ROO<sup>•</sup>** – peroxylový radikál  
**ROS** – reaktívne formy kyslíka  
**rRNA** – ribozomálna ribonukleová kyselina  
**RS<sup>•</sup>** – alkylsulfanylový radikál  
**RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>** – alkyltioperoxylový radikál  
**SOD** – superoxiddismutáza  
**TAS** – celková antioxidačná kapacita  
**TdT** – transferáza terminálneho deoxynukleotidu  
**TdT pufer** – pufer transferázy terminálneho deoxynukleotidu

**TUNEL** – metóda detekcie mŕtvych/apoptotických buniek značením zlomov DNA

**UV** – ultrafialové žiarenie

**VNKK** – polynenasýtené vyššie karboxylové kyseliny

**VR** – voľné radikály

## Úvod

Vývoj preimplantačných embryí je veľmi zložitý a komplikovaný proces. Existujú medzidruhové rozdiely v časovom priebehu vývoja a v postupe delení medzi jednotlivými druhmi zvierat. Vývoj embrya prechádza viacerými štádiami, pričom všetky vývojové štádia sa vyznačujú kompaktnou a celistvou *zona pellucidou*. Najcitlivejším obdobím vývoja embrya je priebeh prvých niekoľko delení, pričom embryo je veľmi citlivé na zmeny a vplyvy prostredia, v ktorom sa embryo vyvíja. Pozitívny vplyv na skorý vývoj embrya majú proteíny, ktoré sú produkované bunkami vajcovodu. Na vývoj embrya, ale i dospelého organizmu zvierat môžu pôsobiť však i látky, ktoré môžu mať i negatívne účinky. Takými to látkami sú napr. voľné radikály, ťažké kovy napr. olovo, a mnoho ďalších, ktoré sú súčasťou životného prostredia, ktoré nás obklopuje.

Voľné radikály napriek tomu, že ich zaradujeme medzi látky s nepriaznivými účinkami, bol dokázaný aj ich pozitívny vplyv. Sú súčasťou metabolických pochodov v organizme, ochraňujú organizmus pred pôsobením rôznych častíc, podieľajú sa na reprodukčnom systéme a aktivujú celý rad enzýmov.

Súčasný výskum sa zameriava skôr na sledovanie negatívneho vplyvu voľných radikálov nielen na vývoj embrya ale i dospelého organizmu.

Voľné radikály spôsobujú mnoho ochorení, ktoré môžeme nazvať „voľnoradikálové ochorenia“. Sú to napríklad cukrovka, Alzheimerova a Parkinsonova choroba, ochorenia srdca a podobne. Môžu však spôsobiť aj oveľa závažnejšie poruchy, ako je poškodenie genetickej výbavy organizmu, onkologické ochorenia, dokonca aj preeklampsiu, ktorá sa považuje za jednu z najčastejších a najzávažnejších porúch počas tehotenstva.

Ako je spomenuté na začiatku, negatívny vplyv môžu mať okrem voľných radikálov aj ťažké kovy, konkrétne olovo.

Olovo môže vo vyšších koncentráciách spôsobiť apoptózu, čo je vlastne programovaná smrť bunky. Spôsobuje aj fragmentáciu embrya, ktorá následne vedie ku zníženej plodnosti.

Každý prirodzený organizmus má však voči účinku voľných radikálov vyvinuté antioxidantné mechanizmy, ktorými je schopný sa brániť, alebo potláčať ich účinky. Antioxidantné mechanizmy sú tvorené antioxidantami, ktorým sa venuje veľká pozornosť ako vo výžive ľudí, tak i zvierat. Ich hlavnou úlohou je podporovať optimálnu funkciu imunitného systému, chrániť DNA, ale napríklad spomaľujú aj procesy starnutia a majú význam aj pri prevencii rôznych ochorení.

Na antioxidanty je bohatá najmä potrava, či už je to zelenina, alebo ovocie, kde ich môžeme prijímať vo forme vitamínov, napr. vitamín C, vitamín A, vitamín E a mnoho ďalších. Tieto antioxidanty sú dôležité nielen pre ochranu dospelého jedinca, ale hlavne pre embryo, ktorého výživa závisí od výživy matky, takže pre jeho normálny vývoj je veľmi dôležitý aj antioxidačný ochranný systém matky.

# 1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí

## 1.1 Intrauterinný vývoj jedinca

### 1.1.1 Oplodnenie

Počas vaječnickového cyklu dochádza k ovulácií, teda k procesu, kedy sa z terciálneho folikulu uvoľní vajíčko (*ovum*). V tomto štádiu je vajíčko v konečnej fáze prvého zrecieho delenia, ktoré sa končí vo vajcovode. Vajíčko sa aj s folikulárnou tekutinou dostane do lievika (*infundibulum*) vajcovodu, kde dochádza najčastejšie k oplodneniu. Ak vnikne spermia do vajíčka, prebehne druhé zrecie delenie (Sova et al., 1981).

Oplodnenie je zložitý dej, počas ktorého sa stretnú a splynú dve úplne odlišné pohlavné bunky – gaméty. Vajíčko je nepohyblivá bunka, preto je počas oplodňovania pasívne a pohybuje sa vo vajcovode iba zásluhou riasiniek, ktoré obsahujú cylindrické bunky epitelu vajcovodu. Doba tohto prechodu vaječnikom trvá asi 2 – 3 dni. Naopak spermia sa aktívne pohybuje zásluhou svojho pohybového ústroja – bičíka. Proces oplodnenia môže byť ovplyvnený rôznymi faktormi a jeho úspešnosť závisí od schopnosti spermií dostať sa včas k vajíčku a preniknúť cez jeho obaly (Massányi et al., 2004).

Tak začína vlastný proces oplodnenia, prebiehajúci v niekoľkých etapách:

- uvoľnenie vajíčka z obalu folikulárných buniek (*corona radiata*)
- prenikanie spermií do sklovitej blanky (*zona pellucida*)
- vnikanie spermií do vaječnej cytoplazmy
- splynutie pohlavných buniek a vznik zygoty (Sova et al., 1981).

Po oplodnení vzniknutá zygota začína svoj ontogenetický vývoj, smerujúci k vytvoreniu nového individua a za tým účelom sa dopravuje do dutiny maternice, kde hniezdi (niduje) v maternicovej sliznici – u človeka v období sekrečnej fázy (*premenstrua*) reprodukčného cyklu (konceptia, počatie). V oplodnenom vajíčku ako v začiatku nového organizmu sú zastúpené dedičné vlastnosti oboch rodičov. U vyšších cicavcov a pravdepodobne aj u človeka sa oplodnenie odohráva najčastejšie v oblasti ampuly vajcovodu (miesto oplodnenie – *locus fecundationis*). Po vniknutí spermie do vajíčka sa u niektorých cicavcov vytvára medzi povrchom vajíčka a oolemmou (*zona pellucida*) úzky, štrbinovitý a tekutinou vyplnený priestor (perivitelinový priestor), ktorý údajne zabraňuje vniknutiu ďalších spermií do ooplazmy. U človeka je takýto mechanizmus sporný, faktom však ostáva, že do vajíčka normálne vnikne iba jediná spermia, čo azda závisí od rýchlej zmeny chemizmu ooplazmy pri styku s penetrujúcou hlavičkou spermie. Ostatné spermie ostávajú hlavičkami trčať v *zona pellucida*, zakrátko však odpadnú a

resorbujú sa. Máme teda u človeka a cicavcov vôbec monospermatický typ oplodnenia, t.j. do vajíčka za normálnych okolností vniká iba jedna spermia (Pivko, 1995).

Určuje sa aj pohlavie nového jedinca. Závisí to od toho, či spermia obsahuje pohlavný chromozóm X (určuje samičie pohlavie) alebo pohlavný chromozóm Y (určuje samčie pohlavie). Určujúcim faktorom pohlavia u cicavcov je spermia. Vajíčko cicavcov obsahuje vždy len pohlavný chromozóm X. Pohlavie jedinca sa môže počas vnútromaternicového vývoja ovplyvniť rôznymi faktormi. Ide najmä o pôsobenie mimochromozómové (pôsobenie pohlavných hormónov). Pôsobenie pohlavných hormónov sa uplatňuje v prípade vývoja dvojčiek nerovnakého pohlavia, hlavne hovädzieho dobytká. Krvné obehly plodov sú spojené a samčí pohlavný hormón semenníkov samčieho plodu pôsobí na vývoj samičieho plodu, ktorý začína nadobúdať samčie pohlavné znaky (Massányi et al., 2004).

### **1.1.2 Ovulárna fáza**

Je to obdobie od oplodnenia po 12. deň gravidity (Kováčik et al., 1996).

Po vniknutí ejakulátu do pohlavných orgánov samice, aktívne sa pohybujúce spermie, ktoré prešli procesom kapacitácie sa stretnú z ovulovaným vajíčkom vo vajcovode. Z hlavičky spermie vzniká vo vnútri oocyty dekonenzáciou samčie prvojadro. Samičie prvojadro vzniká z genetickej informácie oocyty po dokončení zrenia oocyty s vylúčením druhého pólaveho telieska. Po zblížení a splynutí prvojadier vzniká zygota a nasleduje delenie, ktoré je základom vývoja ranného embrya (Olexiková, 2009).

V prvých fázach svojho vývoja sa oplodnené vajíčko – zygota začína ryhovať a asi na 4. deň dosahuje maternicu, v ktorej je spočiatku voľne uložené. V tomto období získava živiny z tzv. maternicového mlieka, ktoré je vylučované maternicovými žľazami. Po svojom uhnieszení, alebo nidácií či implantácií v maternici si zárodok začína vytvárať zvláštne, dočasné orgány, ktoré mu sprostredkovávajú prísun kyslíka a živín, odsun splodín látkovej výmeny, ktoré mu až do narodenia vytvárajú optimálne ochranné prostredie (Kováčik et al., 1996).

### **1.1.3 Embryonálna fáza**

Začína od 13. a trvá do 45. dňa gravidity (Kováčik et al., 1996).

Embryo je skoré prenatálne vývojové štádium. Jeho vznik je iniciovaný syngamiou samčieho a samičieho prvojadra po splynutí samičej a samčej pohlavnej bunky v pohlavných orgánoch samíc (Olexiková, 2009).

V časovom priebehu vývoja a v postupe delení existujú medzidruhové rozdiely (Tab. 1.1).

**Tab. 1.1**

**[Chronológia delenia embryí niektorých druhov zvierat] (Chrenek, 2008)**

Druh	Vývojové štádia				
	2 - bunkové	4 - bunkové	8 – 16 bunkové	Morula	Blastocysta
Krava	36 hod.	72 hod.	96 hod.	6 -7 deň	8 – 9 deň
Prasnica	25 hod.	50 hod.	96 hod.	5 deň	6 deň
Kráľičica	24 hod.	35 hod.	48 hod.	3 deň	4 deň
Myš	22 hod.	32 hod.	40 hod.	3 deň	4 deň

Všetky tieto vývojové štádia sú za optimálnych podmienok v každom vývojovom štádiu charakteristické kompaktnou a celistvou *zona pellucida*, pravidelne sa deliacimi a homogénnymi blastomérmi (Pivko et al., 1988).

1. Neoplodnené vajíčko (1. deň) je jednobunková štruktúra. Zrelý oocyt sa nachádza v štádiu metafázy prvého meiotického delenia. Chromozómy sú usporiadané v metafáznej platničke. V perivitelinom priestore po *zona pellucida* je možné pozorovať vylúčené pólové teliesko. Transkripcia je zastavená a translácia sa k tomuto časovému bodu rovnako obmedzuje. Oocyt však obsahuje vysokú zásobu nasyntetizovaných potrebných molekúl (Olexiková, 2009).

2. Štádia 2 – 16 buniek (druhý – piaty deň po oplodnení), kde jednotlivé vývojové štádia sú charakterizované pravidelným výskytom blastomér v počte 2 až 16 buniek. V tomto období je embryonálny génom ešte zväčša inaktívny. Embryo je odkázané na maternálnu genetickú výbavu a génové transkripty, ktoré sa nahromadili ešte v priebehu vývoja oocytu, schopnosť adaptovať sa na zmenené podmienky je teda minimálna. Pokračovaním vývoja sa však zvyšuje potreba využívania produktov vlastného genómu. Doba aktivácie embryonálneho genómu je charakteristická medzidruhovými rozdielmi. Môže prebiehať počas druhého bunkového cyklu, v dvojbunkovom štádiu ako je tomu u myši (Thompson, 1996), resp. počas tretieho ako u ošípanej (Tománek et al., 1989), alebo počas štvrtého bunkového cyklu v štádiu 8 buniek ako je tomu u hovädzieho dobytká



(Laurinčík et al., 2000) a kráľíka (Baran et al., 1997). Tento prechod od maternálnej po zygotickú kontrolu vývoja je označovaný ako MZT (maternal zygotic transition). V priebehu MZT preimplantačných embryí chýbajú funkčné jadierka, ktoré sú miestom syntézy ribozomálnej RNA (rRNA). Proces tvorby funkčných jadierok – nukleologenéza je jeden z najdôležitejších dejov v priebehu preimplantačného vývoja embrya (Pivko, 1995).

3. Ranná morula (piaty – šiesty deň) sa všeobecne opisuje ako skupina – voľných blastomér. Jednotlivé blastoméry sú jedna od druhej zreteľne oddelené a zaberajú väčšiu časť priestoru, ktorý vytvára *zona pellucida*. Perivitelinový priestor je čistý a zreteľný. Vonkajší priemer ranných embryí kráv je 150 – 190  $\mu\text{m}$  vrátane *zona pellucida*, ktorá je hrubá približne 12 – 15  $\mu\text{m}$ . Veľkosť embryí zostáva nezmenená od zygoty až po blastocystu. V štádiu expanzie ranných embryí sa ich veľkosť zväčšuje.

4. Kompaktná morula (šiesty deň), jednotlivé bunky – blastoméry, ktoré formujú v tomto štádiu kompaktnú masu moruly, sú jedna pri druhej a splývajú. Proces kompaktizácie je ukončený. Perivitelinový priestor je čistý (Pivko et al., 2000).

Medzibunkové spojenia vytvárajúce sa medzi blastomérmi embrya súvisia aj s procesom diferenciacie dvoch odlišných typov buniek embryoblastu a trofoblastu. Veľký význam pre integritu a schopnosť ďalšieho vývoja embrya majú spojenia vytvárané medzi jednotlivými bunkami trofoblastu navzájom. Ide o pevné kontakty typu *zonula occludens*, čo sú nepriepustné kontakty medzi susednými bunkami trofoblastu potrebné pre oddelenie vonkajšieho prostredia od vnútorného prostredia dutiny embrya. Ďalším typom spojení sú adhezívne kontakty typu *zonula adherens* a *macula adherens*. Na vzniku týchto spojení sa podieľajú súčasti cytoskeletu bunky a jeho poškodením môže dochádzať k výraznému narušeniu ďalšieho vývoja embrya (Pivko, 1995).

5. Ranná blastocysta (siedmy deň), ranné embryo v tomto štádiu začína formovať blastocelovú dutinku v podobe excentricky sa formujúceho mechúrka. V tomto štádiu vývoja už môžu byť viditeľné rozdiely medzi trofoblastom a vnútornou bunkovou masou. Perivitelinový priestor je čistý.

6. Blastocysta (siedmy – ôsmy deň), v tomto štádiu nastáva diferenciácia vonkajšej vrstvy trofoblastu od tmavšej kompaktnejšej vnútornej masy buniek. Blastocelová dutina je rozšírená a perivitelinový priestor je zúžený.

7. Expandovaná blastocysta (ôsmy – deviaty deň), vonkajší priemer embrya v tomto štádiu sa rýchlo zväčšuje (1,2 až 1,5 – krát), perivitelinový priestor sa stráca za súčasného zužovania sa *zona pellucida* až na približne tretinu jej pôvodnej hrúbky. V tomto štádiu

získané embryá často podliehajú kolapsu, čo je charakterizované úplnou, alebo čiastočnou stratou blastocelu. *Zona pellucida* zostáva neporušená.

8. Voľná blastocysta (deviaty deň), v tomto vývojovom štádiu získané embryá aktívne vystupujú zo *zona pellucida* a ostávajú voľné. Majú zreteľne diferencovaný a pravidelne utváraný trofoblast, v ktorom je uzavretý excentricky sa tvoriaci embryoblast a dobre vyvinutú blastocelovú dutinu. Pri hodnotení embrya pripomína svetlý pravidelný, okrúhly mechúrik.

9. Predĺžená blastocysta (deviaty – desiaty deň), v tomto vývojovom štádiu získané embryá sú bez *zona pellucida* a charakterizuje ich zvýšená proliferácia trofoblastu a morfológická premena olávneho tvaru na trubicový (Pivko et al., 2000).

Za vývoj každého embrya do určitého vývojového štádia, v závislosti od druhu zvierat, zodpovedá materská genetická výbava, ktorá je nahradená embryonálnou výbavou, hovoríme o štádiu „bloku“. U myších embryí je to 2-bunkové štádium, 4-bunkové u ošípanej, 8-bunkové u hovädzieho dobytká, oviec a kôz a 8-16-bunkového u králika. V tomto štádiu sú bunkami (epitelom) vajcovodu produkované špecifické proteíny, ktoré pozitívne ovplyvňujú skorý vývoj embrya (Menck et al., 1997).

Kvalitu získaných jednotlivých vývojových štádií ranných embryí treba určovať na základe morfológických kritérií do štyroch tried a označiť medzinárodným číselným kódom (1 - 4):

- 1, vynikajúce embryo (+)** je životaschopné ideálne embryo, okrúhle, symetrické s bunkami jednej veľkosti, sfarbenia a štruktúry,
- 2, dobré embryo (+ -)** je charakteristické výskytom niekoľkých fragmentov blastomér v perivitelinnom priestore, nepravidelným tvarom a výskytom vezikúl,
- 3, slabé, dostatočné embryo (- +)** je veľmi málo životaschopné s prítomnosťou fragmentov blastomér a niekoľkých degenerovaných buniek v perivitelinnom priestore, je charakteristické zvýšenou tvorbou vezikulácie,
- 4, degenerované, fragmentované embryo (-)** má početné fragmenty blastomér, degenerované bunky, bunky rôznej veľkosti, veľké početné vezikuly, podlieha totálnej fragmentácií (Pivko et al., 2000).

Na konci tohto obdobia má embryo vyvinuté všetky orgány. Embryo je veľmi citlivé na pôsobenie vonkajších a vnútorných vplyvov, ktoré ho môžu poškodiť (Kopecký et al., 2003).

#### 1.1.4 Fetálna fáza

Od 3. mesiaca gravidity postupne začínajú činnosť všetky orgány, plod – fetus v tomto období predovšetkým rastie (Kopecký et al., 2003).

Fetálna fáza je charakterizovaná aj rýchlym rastom a vývojom placenty, ktorá zabezpečuje výživu plodu až do pôrodu (Schubert, 1991).

### 1.2 Voľné radikály

Voľné radikály (VR) sú atómy, molekuly či ióny schopné samostatnej existencie, ktoré majú vo svojom elektrónovom obale jeden, alebo viacej nespárených elektrónov. Snažia sa preto získať ďalší elektrón a doplniť si tak elektrónový pár do stabilnej konfigurácie. Z tohto pramení ich veľká reaktivita a obmedzená doba existencie. Reagujú nielen s ostatnými voľnými radikálmi, ale i s intaktnými molekulami a tým vytvárajú ďalší voľný radikál, tento dej má tendenciu pokračovať formou reťazovej reakcie (Racek, 2003).

Voľné radikály majú v živote organizmov veľký význam (Zachar et al., 2004).

Organizmy na jednej strane VR využívajú pre svoj prospech – k ničeniu fagocytovaných organizmov, pri ovulácii a oplodnení vajíčka (Racek a Holeček, 1999).

Zúčastňujú sa na mnohých reakciách, často sú produktmi alebo substrátom pre rôzne enzýmy. Podieľajú sa na ochrane organizmu pred cudzorodými časticami, na reprodukčnom procese a aktivujú celý rad enzýmov (Kimáková, 2002).

Na druhej strane môžu voľné radikály organizmus závažne poškodiť (Racek a Holeček, 1999).

Voľné radikály môžu byť pre náš organizmus veľmi nebezpečné. Keď naše telo nie je schopné s nimi efektívne bojovať, môžu nás aj zabiť (Youngson, 1995).

Reaktívne kyslíkové druhy, alebo voľné radikály v biologickom systéme sa môžu tvoriť prooxidatívnymi enzýmovými systémami, lipidovou oxidáciou, ožiareními, zápalom v tele, fajčením, látkami znečisťujúcimi ovzdušie a procesom glykoxidácie (Dlugošová a Pšenáková, 2004).

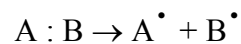
Klinické štúdie potvrdili, že reaktívne kyslíkové druhy spolu s voľnými radikálmi spôsobujú s vekom spojené degeneratívne ochorenia, zahrňujúc aterosklerózu, rakovinu, mozgovú príhodu, astmu, srdcový infarkt, poškodenie pečene a ďalšie (Dlugošová a Pšenáková, 2004).

Reakciou voľných radikálov s oxidovanou látkou sa tvoria metabolity, ktoré môžu byť reaktívnejšie a teda škodlivejšie ako pôvodný radikál (Dlugošová a Pšenáková, 2004).

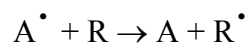
Pre organizmus sú najdôležitejšie voľné radikály kyslíka a dusíka, ďalšími zmenami z nich môžu vzniknúť iné reaktívne látky, ktoré však už nemajú nepárový elektrón (peroxid vodíku, kyselina chlórna). Tieto látky sa spolu s VR označujú spoločným názvom reaktívne formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) či dusíku (RSN) (Racek a Holeček, 1999).

Z chemického pohľadu môžu vzniknúť nasledovnými typmi reakcií:

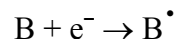
a) **homolyticky** – rozpadom kovalentnej väzby vplyvom radiácie, ultrafialového alebo ionizujúceho žiarenia, viditeľného svetla v prítomnosti fotosenzorov, tepelnou degradáciou organických materiálov a podobne:



b) **oxidáciou** látky A dochádza ku strate elektrónu a vzniká radikál R<sup>•</sup>:



c) **redukciou** látky B dochádza ku vzniku radikálu B<sup>•</sup>:



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

V organizme vznikajú voľné radikály pri rade procesov. Ich hlavnými zdrojmi sú v živých organizmoch za bežných podmienok nasledujúce procesy:

1. Bežné životné pochody, pri ktorých bunka získava energiu (napr. aj na svalovú prácu), alebo štiepi látky potrebné pre bunkovú výživu (napr. bielkoviny, sacharidy, tuky).

2. Niektoré chemické reakcie spontánne prebiehajúce vo vnútri buniek za prítomnosti cudzorodých látok (napr. ťažkých kovov – najmä ortuti, kadmia, olova, titanu, nikla, ďalej napríklad z dymu tabakových aj marihuanových cigariet, ale taktiež rozkladom liekov).

3. Ionizujúce žiarenie reprezentované najčastejšie ultrafialovým žiarením (UV) pochádzajúcim zo slnka, ale aj röntgenové a rádioaktívne žiarenie (Mariassy, 2006).

Voľné radikály môžu byť:

a) odvodené od kyslíka,

b) odvodené od dusíka,

c) odvodené od organických zlúčenín (Muchová et al., 2004).

**Tab. 1.2****[Vnútorne a vonkajšie zdroje voľných radikálov] (Ďuračková et al., 1999)**

Vnútorne zdroje	Vonkajšie zdroje
Fagocyty	Cigaretový dym
Mitochondrie	Znečistenie životného prostredia
Peroxizómy	Radiácia
Xantínoxidáza	Chemoterapeutiká
Kaskáda kyseliny arachidónovej	Ultrafialové svetlo
Reakcie zahrňujúce ióny prechodných prvkov	Ozón
Zápal	Niektoré lieky, pesticídy, anestetiká,
Ischemicko-reperfúzne stavy	Organické rozpúšťadlá
Aterogenéza	

### 1.2.1 Radikály odvodené od kyslíka

Kyslík je pre ľudský život nevyhnutný, ale ako väčšina chemických látok i on môže byť pre organizmus toxický (Kimáková, 2002).

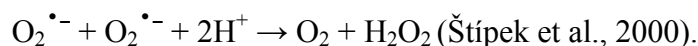
Kyslík je esenciálny prvok pre aeróbne organizmy, je terminálnym akceptorom elektrónov počas respirácie, ktorá je hlavným zdrojom energetických substrátov, vytvára chemické formy molekúl radikálového typu, ktoré sú veľmi reaktívne, nestabilné, s veľmi krátkym polčasom života, a tým aj s nízkou rovnovážnou koncentráciou (Halliwell et al., 1987).

Potenciálne škodlivé reaktívne formy kyslíka (ROS)<sup>2</sup> sú produkované v dôsledku normálneho aeróbného metabolizmu. Tieto „voľné radikály“ sú zvyčajne odstránené, alebo inaktivované *in vivo* skupinou antioxidantov. Jednotliví členovia antioxidačnej obrannej skupiny sú aktivovaní, aby zabránili tvorbe ROS, zničili potenciálne oxidanty a zneškodnili ROS. Tým sa minimalizuje poškodenie tkaniva spôsobené oxidatívnym stresom (Benzie a Strain, 1996).

**Superoxid** ( $O_2^{\bullet -}$ ) je súčasne jedoelektrónový reduktant aj oxidant. Môže prechádzať bunkovými membránami cez aniónové kanály. Zdá sa, že sám superoxid nemá významné toxické účinky. Je však základným intermediátom, z ktorého vznikajú iné toxické ROI,

z ktorých medzi najdôležitejšie patrí hydrogénperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ) a singletový kyslík (Ferenčík et al., 1997).

Superoxid podlieha dizmutácii, pri ktorej jedna jeho molekula poskytuje elektrón druhej, takže superoxid sa vlastne zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakcie sú kyslík a peroxid vodíka:

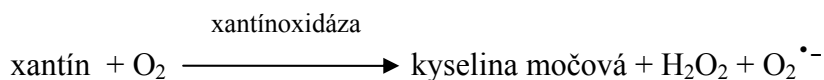


V organizme môže vznikať pri reakciách katalyzovaných enzýmami. Príkladom pozitívneho vzniku superoxidu je reakcia katalyzovaná NADPH-oxidázou v neutrofiloch. Vzniknutý superoxid podmieňuje celý rad následných reakcií, pričom vznikajú látky, ktoré sú súčasťou mikrobicídnych systémov fagocytov:



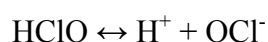
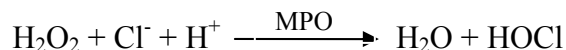
NADPH oxidáza je vlastne elektrónovo transportný reťazec, ktorý sa nachádza v cytoplazmovej membráne a fagocytovej vakuole všetkých profesionálnych fagocytov a niektorých B- a T- lymfocytov. Názov je odvodený z toho, že NADPH slúži ako donor elektrónov pri redukcii kyslíka na superoxid (Ferenčík et al., 1997).

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 nie je veľmi reaktívny, ale niektoré biologické terče sú naň citlivé. Všeobecne sa prijíma názor, že v poškodeniach organizmu zohráva úlohu najmä neprotonizovaná forma ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), aj keď protonizovaná forma ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) je reaktívnejšia a spôsobuje poškodenie DNA (Muchová et al., 2004).

**Hydrogén peroxid** reaguje s myeloperoxidázou (MPO), nachádzajúcou sa v azurofilných granulách s chloridovým aniónom za vzniku kyseliny chlórnej, ktorá sa ďalej metabolizuje na chlórnan až voľný chlór:

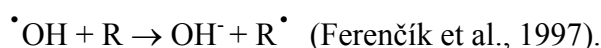


Medzi najtoxickejšie radikály patrí **hydroxylový radikál** ( $\cdot\text{OH}$ ) vznikajúci z peroxidu vodíka, ktorý je schopný meniť a ničiť molekuly bielkovín, nukleových kyselín, membránových lipidov atď. Pri odbúravaní sacharidov (glukózy), voľne alebo chemicky viazaných na polypeptidové reťazce proteínov, sa významne zvýši hladina hydroxylového radikálu. Tieto procesy sa významnou mierou podieľajú na vzniku chronických diabetických komplikáciách (Racek, 2003).

Tvorí sa viacerými metabolickými cestami, z ktorých najdôležitejšou je rozklad  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalyzovaný  $\text{Fe}^{2+}$ :



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:

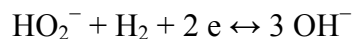
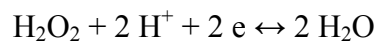
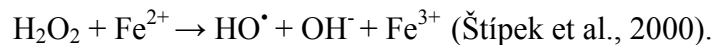


Superoxid je účinkom superoxiddismutázy (SOD) zapracovaný na peroxid vodíka, ktorý nie je voľným radikálom, ale je škodlivý a preniká cez bunkové membrány a má dlhší polčas trvania ako voľné radikály. Pretože superoxid samotný je málo účinný, je vo fagocytoch ďalej formovaný na účinnejšie metabolity:

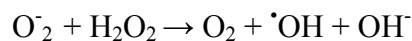
- reakcia katalyzovaná superoxiddismutázou vzniká peroxid vodíka
- reakcia peroxidu vodíka s chloridovými iónmi vzniká kyselina chlórna, reakciu katalyzuje myeloperoxidáza

- kyselina chlórna môže s reakciou so superoxidom či  $\text{Fe}^{2+}$  poskytnúť hydroxylový radikál
- hydroxylový radikál môže vzniknúť i reakciou peroxidu vodíka s prechodnými kovmi (Fentonova reakcia)
- superoxid s oxidom dusnatým reaguje na peroxynitrit, ktorý môže štiepením poskytnúť veľmi reaktívne radikály oxidu dusičitého a hydroxylového radikálu (Racek, 2003).

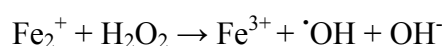
**Peroxid vodíka** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nepatrí medzi radikály, avšak do skupiny ROS určite patrí, lebo sa podieľa na vzniku radikálov. Reakcie samotného peroxidu vodíka s biomolekulami sú pomerne pomalé, avšak v prítomnosti tranzitných kovov ( $\text{Fe}^{2+}$  alebo jednomocná meď  $\text{Cu}^+$ ) sa peroxid vodíka pohoťovo redukuje:



Peroxid vodíka je produktom dvojelektrónovej redukcie molekulového kyslíka alebo dismutácie superoxidového radikálu. Nie je voľný radikál. Ale môže byť substrátom pre vznik voľných radikálov, a preto ho do skupiny voľných radikálov odvodených od kyslíka zaraďujeme.  $\text{H}_2\text{O}_2$  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:

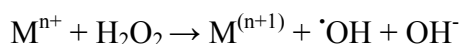


Reakcia je veľmi rýchla ak je katalyzovaná napr. iónmi  $\text{Fe}^{2+}$  alebo  $\text{Cu}^{1+}$ . Peroxid vodíka môže reagovať s iónmi kovu aj priamo podľa tzv. Fentonovej reakcie, keď opäť vzniká hydroxylový radikál:





alebo všeobecne:



Týmito reakciami môže vzniknúť v organizme veľké množstvo radikálov nielen v priebehu všeobecného metabolizmu, ale aj vplyvom cudzorodých látok (Muchová et al., 2004).

**Singletový kyslík** ( $^1O_2$ ) 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 (chemiluminiscencie), ktoré môže mať antimikróbné a cytotoxické účinky (Ferenčík et al., 1997).

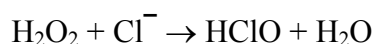
Singletový kyslík vzniká pri niektorých fotochemických reakciách, kedy látka absorbujúca svetlo prevedie tripletový kyslík na reaktívny kyslík singletový, i pri fyziologických biochemických reakciách (napr. v dýchacom reťazci) vzniká malé množstvo tejto reaktívnej molekuly.

Singletový kyslík je excitovaná forma tripletového kyslíka, ktorá 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 cytotoxickosť (Muchová et al., 2004).

**Kyselina chlórna** (HClO) syntetizuje neutrofilné granulocyty (polymorfonukleáry) pomocou svojej myeloperoxidázy:



Kyselina chlórna je silný oxidant. Polymorfonukleáry ho používajú spolu s ďalšími ROS a RNS ako bakteriocídny prostriedok (Štípek et al., 2000).

### 1.2.2 Radikály odvodené od dusíka

**Oxid dusnatý** (NO) hrá nezastupiteľnú úlohu v regulácii mnohých bunkových funkcií (Racek, 2003).

Syntetizuje sa z L-arginínu skupinou enzýmov nazývaných syntázy oxidu dusnatého (NOS) vo viacerých typoch buniek vrátane chondrocytov (Halliwell et al., 1987).

Reakcia prebieha dvojstupňovo. V prvej fáze dochádza k hydroxylácii jedného z guanidínových dusíkov L-arginínu, vzniká tak N-hydroxy-L-arginín. Pri tejto reakcii je spotrebovaná jedna molekula NADH a jedna molekula kyslíku. Druhým krokom je potom trojelektrónová oxidácia tohto intermediátu. Uvoľňuje sa pri nej oxid dusnatý a L-citrullin za spotreby jednej molekuly kyslíku a 0,5 molekuly NADPH (Racek, 2003).

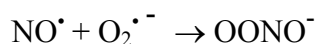
Chemické vlastnosti NO<sup>•</sup> a jeho metabolitov (reactive nitrogen species – RNS) veľmi výstižne zhrnuli Beckman a Koppenolem (1996). NO<sup>•</sup> pri svojich koncentráciách *in vivo* reaguje veľmi pomaly s väčšinou biomolekúl vrátane kyslíka, lebo difúzia oxidu dusnatého do krvi a jeho inaktivácia hemoglobínom je omnoho rýchlejšia. *In vivo* reaguje dostatočne rýchlo len s tranzitnými kovmi a radikálmi.

*In vivo* v prítomnosti akceptorov elektrónov (NO<sup>•</sup><sub>2</sub>, tranzitných kovov) sa oxid dusnatý ľahko zlučuje s fenolmi (tyrozínom), thiolmi (cysteínom, GSH, albumínom) a so sekundárnymi amínmi:



### Peroxynitrit

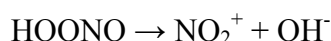
Patologicky najvýznamnejšia je reakcia NO<sup>•</sup> so superoxidom, kedy vzniká toxický peroxynitrit:



Fyziologické podmienky (pH 7,0) nie sú pre vznik peroxynitritu výhodné vzhľadom k nízkej koncentrácii NO<sup>•</sup> a predovšetkým superoxidu, avšak pri intenzívnej syntéze NO<sup>•</sup> a O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (napr. aktivovanými polymorfonukleármí) môže koncentrácia peroxynitritu dosiahnuť

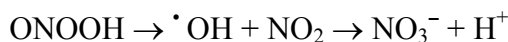
významné mikromolárne hladiny. NO<sup>•</sup> je jediná biologická molekula produkovaná v koncentrácii postačujúcej ku kompetícii o superoxid so superoxiddismutázou. Peroxynitrit je oxidačným činidlom (Štípek et al., 2000).

Peroxynitrit je *in vivo* zodpovedný za nitráciu a hydroxyláciu aminokyseliny tyrozínu. Tranzitné kovy, vrátane kovov aktívnych centier superoxiddismutázy a myeloperoxidázy (Beckman a Koppenol, 1996) katalyzujú jeho heterolytické štiepenie na hydroxidový anión a nitroniový kation, ktorému je tradične pripisovaná schopnosť napadnúť fenolové zlúčeniny a *in vivo* v proteínoch meniť napríklad tyrozín na 3-nitrotyrozín:



Squadrito a Pryor (1998) si myslí, že katalyzátorom nitrácie je oxid uhličitý, ktorý rýchlo reaguje s peroxynitritom za vzniku oxidačných a nitratačných medziproduktov, vrátane NO<sub>2</sub><sup>•</sup> a CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>.

**Kyselina peroxodusitá**, ktorá vzniká protonizáciou peroxonitritového aniónu, sa rýchlo rozkladá a vzniká reaktívny hydroxylový radikál:



Týmito reakciami sa uskutočňuje spojenie medzi reaktívnymi metabolitmi kyslíka (v neutrofiloch a makrofágoch ich produkuje NADPH-oxidáza) a reaktívnymi metabolitmi dusíka. Výsledkom je vznik najúčinnnejšej mikrobicídnej a cytotoxickéj substancie profesionálnych fagocytov – hydroxylového radikálu (Muchová et al., 2004).

### 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<sup>•</sup>). Je to radikál **síry**, ktorý má značnú reaktívnosť. V prítomnosti kyslíka môže tvoriť alkyltioperoxylový radikál (RSO<sub>2</sub><sup>•</sup>), ale aj oxidovať ďalšie látky za tvorby iných radikálov. 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 trichlórmetylový radikál, ktorý v prítomnosti kyslíka tvorí trichlórmetylperoxylový radikál ( $\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$ ).

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

### 1.3 Oxidatívny stres

Oxidatívny stres (OS) vzniká ako dôsledok negatívneho pôsobenia voľných radikálov a reaktívnych metabolitov kyslíka a dusíka. V živých bunkách dochádza k prevahe oxidačných častíc nad bunkovými antioxidantami, kedy sa porušuje rovnováha medzi tvoriacimi sa radikálmi a ich prirodzenými vychytávačmi (Ďuračková, 1998).

Určité množstvo ROS je potrebné vo vajíčkovode (Attaran et al., 2000), rovnako ako pri normálnom pôsobení spermie (de Lamirande et al., 1997).

Avšak zvýšená hladina ROS môže mať škodlivý efekt (Alvarez, 2003).

Bunky znesú mierny oxidačný stres a často odpovedajú zvýšenou syntézou antioxidantných obranných enzýmov a ďalších ochranných protektívnych proteínov. Silný oxidačný stres môže zapríčiniť poškodenie buniek alebo dokonca vedie k ich usmrteniu. Oxidačné poškodenie DNA, proteínov a lipidov poškodí alebo zničí bunky. Indukované usmrtenie buniek sa vyskytuje pri nekróze alebo apoptóze. Oxidačný stres zapríčini zvýšenie intracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  a vedie k vyplaveniu intracelulárneho železa, ktoré katalyzuje tvorbu  $\text{OH}\cdot$  (Halliwell, 1995).

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).

#### 1.3.1 Poškodenie biologických membrán lipoperoxidáciou

Voľné kyslíkové radikály (VR) a reaktívne metabolity kyslíka predstavujú nebezpečie oxidačného poškodenia biologických membrán – lipoperoxidáciou. Pod peroxidáciou lipidov sa rozumie *oxidačné poškodenie polynenasýtených vyšších karboxylových kyselín* (VNKK), ktoré sú zložkou membránových fosfolipidov. Čím je vyššia karboxylová kyselina (VNK) viac nenasýtená, tým je citlivejšia na oxidačné poškodenie. VNKK len s jednou dvojitou väzbou, napr. kyselina olejová sa lipoperoxidáciou takmer nepoškodujú.

Vhodnými substrátmi na oxidačné poškodenie sú kyseliny s dvomi a viacerými dvojitými väzbami. Peroxidácia lipidov začína účinkom akéhokoľvek faktora, ktorý má dostatočnú schopnosť odoberať vodíkový atóm z metylénovej skupiny (-CH<sub>2</sub>-) nenasýteného lipidu (LH) za tvorby lipidového radikálu (L<sup>•</sup>) (*iniciácia*). Môže to byť napríklad hydroxylový radikál (•OH), peroxylový radikál (ROO<sup>•</sup>), alkoxylový radikál (RO<sup>•</sup>). V molekule lipidového radikálu sa preskupia dvojité väzby a vznikne radikál s konjugovanými dvojitými väzbami. Takýto radikál veľmi rýchlo reaguje s kyslíkom za tvorby lipoperoxylového radikálu (LOO<sup>•</sup>). Ten je schopný reagovať s ďalšou molekulou lipidu (LH) a tvoria sa ďalšie radikály (L<sup>•</sup>), 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).

**Neenzýmová peroxidácia lipidov** – dáva zmes rôznych produktov, lebo reťazce modifikovaných mastných kyselín sa ľahko štiepia na kratšie produkty, vrátane uhl'ovodíkov, ktoré vydychujeme – **etán**, **pentán** a toxických aldehydov – **malondialdehyd (MDA)** a **4-hydroxynonenal (4-HNE)**, ktoré sa pevne naviažu na proteíny a menia ich životnosť a funkciu. Táto peroxidácia mení fluiditu membrán, zvyšuje ich priepustnosť pre ióny, a tak spôsobí lýzu buniek a znižuje i membránový potenciál.

**Enzýmová peroxidácia lipidov** – prebieha na aktívnych centrách hydroperoxidáz a endoperoxidáz (cyklooxygenáza, lipoxigenáza) a produkuje stereošpecifické a biologicky aktívne látky (prostaglandíny, leukatrieny), dôležité v riadení bunkových dejov a v ochranných pochodoch. Voľné radikály sú nenahraditeľné medziprodukty týchto syntéz, nie sú však uvoľňované z enzýmov, a preto neškodia. Okrem toho vznikajú aj silné oxidanty, ktoré sú uvoľňované do prostredia a zneškodňované antioxidantným systémom organizmu (Štípek et al., 2000).

### 1.3.2 Oxidačné poškodenie proteínov

Oxidačné poškodenie proteínov sa oveľa menej študovalo ako peroxidácia lipidov. Je to prirodzené vzhľadom k veľkému množstvu rôznych proteínov a aminokyselinových jednotiek v nich prítomných, ktoré môžu byť substrátom pre oxidanty (Holley a Cheeseman, 1993).

Metionín je účinkom ROS napríklad oxidovaný na jeho sulfid, cysteín na kyselinu cysteínovú, tryptofán na kynurenín. Pri oxidácii prolínu sa asi ruší peptidový reťazec. Rada aminokyselín je hydroxylovaná hydroxylovým radikálom a nitrovaná peroxynitritom (tryptofán, fenylalanín, tyrozín). S väčšinou biomolekúl peroxynitrit reaguje pomaly, je selektívnym antioxidantom. V proteínoch mení tyrozín na nitrotyrozín, ktorý je veľmi stály (Štípek et al., 2000).

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. Poznáme dva mechanizmy ich účinku – oxidačný a redukčný. Oxidačným pôsobením karbonylových skupín vznikajú hydroperoxy proteínov. Na ich redukciu sa v bunke vyčerpávajú významné reductanty, ako je kyselina askorbová a glutatión. Pri druhom 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).

Oxidačné poškodenie proteínov *in vivo* môže ovplyvniť funkciu receptorov, enzýmov, transportných proteínov, prípadne tvorbu nových antigénov, ktoré môžu vyvolávať rôznu imunitnú odpoveď. Oxidačne poškodené proteíny môžu spôsobiť sekundárne poškodenia iných biomolekúl, ako reparačných enzýmov DNA alebo DNA polymerázy. Rôzne RMO môžu reagovať s histidínovými, arginínovými, lyzínovými a prolínovými jednotkami za tvorby karboxylových skupín, ktoré sa môžu dokázať reakciou s 2,4-dinitrofenylhydrazínom (Ďuračková et al., 1999).

### 1.3.3 Poškodenie DNA voľnými radikálmi

Rovnako ako lipidy a proteíny i deoxyribonukleové kyseliny sú poškodzované predovšetkým hydroxylovým radikálom  $\text{OH}^\bullet$ . Reaguje s deoxyribózou za vzniku malondialdehydu a ďalších produktov, modifikuje a uvoľňuje purínové a pyrimidinové bázy. Následkom týchto reakcií sa môže prerušiť polynukleotidový reťazec, alebo sa môžu vytvoriť krížové väzby DNA s proteínmi. Primárna reakcia  $\text{OH}^\bullet$  s DNA je vynatie vodíkového atómu z deoxyribózy, čo vedie k deštrukcii sacharidov a prerušeniu reťazca.  $\text{OH}^\bullet$  je schopný pripojiť sa (addovať) k purínovým a pyrimidinovým bázam a tak ich zmeniť na hydroxyderiváty a oxoderiváty (Štípek et al., 2000).

Energia väzby C-H v aromatickom kruhu je veľmi vysoká, a preto hydroxylový radikál reaguje prostredníctvom interakcie s  $\pi$ -elektrónmi s následnou hydroxyláciou týchto látok. Hlavným produktom oxidačného poškodenia je **8-oxo-2-deoxyguanozín**, ktorý považujeme za marker oxidačného poškodenia DNA. Identifikovalo sa viac ako 20 oxidačným poškodením modifikovaných purínov a pyrimidínov.

Superoxid a peroxid vodíka sa pravdepodobne priamo nezúčastňujú na štiepení DNA. Môžu pôsobiť sekundárne ako medziprodukty pri tvorbe hydroxylového radikálu.

Procesy oxidačného poškodenia DNA v zdravých bunkách sú pre organizmus vysoko toxické, pretože sú základom mutácií a môžu byť príčinou smrti bunky a organizmu (Muchová et al., 2004).

ROS môže nielen urýchliť odumieranie v bunkách pomocou priameho poškodenia DNA, ale taktiež ovplyvňuje opravný mechanizmus DNA v bunkovom cykle (Barzilai a Yamamoto, 2004).

**Mitochondriálna DNA (mtDNA)** je omnoho citlivejšia k oxidačnému poškodeniu, je zrejme prokaryotického pôvodu, a tak nemá intróny a nie je chránené histónmi. Molekulárne zmeny v mitochondriách sa prejavia apoptózou, alebo nekrozou bunky. Membránové póry otvorené oxidačnému stresu zavinia pokles membránového potenciálu mitochondrií, čo je jedna zo základných fáz apoptózy.

Taktiež **jadrová DNA** býva poškodzovaná radikálovým mechanizmom. Na zlomy v reťazci DNA sa naviaže **poly(ADP)ribózapolyméraz (PARP)**. Súčasne je indukovaná syntéza transkripčného faktora **p53**, ktorý sa ako produkt supresorového génu presunie do jadra, aby zastavil bunkový cyklus. V tomto štádiu sa signálne mechanizmy bunky rozhodujú, či je možné opraviť DNA, alebo skôr aktivovať kaskádu cysteínových proteáz, ktorá odstráni PARP a spustí apoptózu. Pokiaľ sa bunka rozhodne k opravám DNA, PARP samu seba modifikuje [poly(ADP)ribozilácia], oddelí sa od DNA a poly(ADP) sa odbúra. Do procesu vstúpi reparačný enzýmový systém, ktorý opraví zlom. Proces je však tak energeticky náročný, že môže skončiť nekrozou bunky (Štípek et al., 2000).

#### **1.3.4 Oxidačné poškodenie enzýmových komplexov a bunkovej signalizácie**

Hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ) mení aktivitu enzýmov tým, že uvoľňuje železo z enzýmových centier Fe/S (napr. akonitáza, ferochelatáza). Taktiež  $\text{NO}\cdot$  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<sup>\*</sup> tento enzým inaktivuje tým, že nitruje tyrozín v aktívnom centre enzýmu (Štípek et al., 2000).

#### 1.4 Vplyv oxidačného stresu na intrauterinný vývoj jedinca

Oxidačný stres môže mať škodlivý vplyv na embryonálny vývoj. ROS môže vznikáť z metabolizmu embrya a z okolitého prostredia (Agarwal a Allamaneni, 2004).

Produkcia ROS môže vznikáť počas oxidačnej fosforylácie v mitochondriách. Elektróny sa uvoľnia z elektrónového transportného reťazca na vnútorných mitochondriálnych membránach. Tieto elektróny sú transferované do kyslíkových molekúl, a výsledkom je nespárený elektrón v orbite. Toto vedie k produkcii superoxidových molekúl. Ďalšie zdroje produkcie ROS sú cytoplazmická NADPH-oxidáza, cytochrómové p450 enzýmy a xantín-oxidoreduktázy (Knott et al., 2003).

Stav oxidačného stresu môže byť limitujúcim činiteľom embryogenézy. Nadprodukcia ROS je škodlivá pre embryo, vedie k zmenám vnútrobunkového prostredia a k porušeniu metabolizmu embryonálnych buniek (Geurin et al., 2001; Harvey et al., 2002).

Superoxid, peroxid vodíka, a hydroxylové radikály, môžu mať škodlivé účinky na plod. Oxidačné napätie mikroprostredia môže byť zvýšené prítomnými spermiami, leukocytmi. Spermia, ktorá sprostredkuje aktiváciu vajíčka môže zvýšiť oxidačné napätie v embryonálnom genóme (Harvey et al., 2002).

Pre *in vivo* oplodnenie a vývoj embrya je vyhovujúcejšie prostredie s nízkym oxidačným napätím (Burton et al., 2003).

Počas asistovanej reprodukčnej technológie je dôležité sa vyhnúť podmienkam, ktoré podporujú tvorbu ROS a vystavujú gamétu resp. embryo ROS. Počas kultivácie, nízke kyslíkové napätie je viac efektívne v zlepšovaní koncepcie, nidácie a implantácie zárodka ako vyššie kyslíkové napätie. Množstvo vnútorných a vonkajších faktorov môžu indukovať oxidačné napätie embrya. Rozdielne, metabolické dráhy a enzýmy môžu produkovať vnútorné ROS, vrátane oxidačnej fosforylácie, oxidáz a xantínoxidázy (XO). Niekoľko vonkajších faktorov môže prispievať k produkcii ROS embryami, ako je koncentrácia oxidovateľných substrátov, metalické katióny, viditeľné svetlo, a spermie. ROS môžu zmeniť veľa biomolekúl, ako sú lipidy, proteíny DNA, ako aj samotné procesy v bunkách (Agarwal et al., 2005a).



## **Oxidačný stav a *in vitro* vývoj embrya**

Vývoj ranného embrya cicavcov v období od oplodnenia po základnú diferenciáciu prebieha v prostredí s nízkou koncentráciou kyslíka. Pacientom po IVF resp. ICSI sa zlepšila preimplantačná životaschopnosť embrya, pokiaľ sa uvedené biotechnické postupy vykonali v prostredí nižšou koncentráciou kyslíka (Dumoulin et al., 1999).

Nízke koncentrácie kyslíka v *in vitro* prostredí počas kultivácie prasačích embryí znížili obsah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, výsledkom bola znížená fragmentácia DNA, čo prispelo k zlepšeniu vývoja (Kitagawa, 2004).

Vyššia koncentrácia kyslíka o 20% v *in vitro* prostredí spôsobuje nižšiu vývojovú spôsobilosť embrya. Zrýchlený vývoj embrya bol zistený pod nižšou (5%) koncentráciou kyslíka (Catt a Henman, 2000).

Oxidačný stres môže spôsobovať chybný vývoj embrya a retardáciu, toto je spôsobené poškodením membrán bunky a DNA (Guerin et al., 2001; Agarwal et al., 2006).

**Apoptóza**, alebo programovaná smrť bunky je dôležitá vo vývoji ako mechanizmus eliminujúci bunky, ktoré sú poškodené, chybné, alebo abnormálne (Meier et al., 2000).

Je to aktívny fyziologický proces spôsobujúci elimináciu buniek na základe špecifických, geneticky kontrolovaných programov (Chrenek et al., 2006).

Je protipólom bunkového delenia, súčasťou rovnováhy medzi vznikom a zánikom buniek v tkanivách (Staunton a Gaffney, 1998; Skulachev, 1998).

U preimplantačných embryí sa vyskytuje spontánne, alebo môže byť indukovaná viacerými faktormi prostredia pôsobiacimi na embryo (Edwards, 1998).

Apoptóza spôsobí fragmentáciu embrya, čo spôsobuje zníženú plodnosť. Zvýšený oxidačný stres v spermách môže taktiež znížiť koncepciu ako aj životaschopnosť embrya. V asistovanej reprodukčnej technológii (ART) je fyziologické prostredie stimulované modifikáciou média takisto, ako používaná technika, ale *in vitro* podmienky nemôžu nikdy mať také isté fyziologické podmienky ako *in vivo*. Embryá kultivované *in vitro* sú vystavené zosilnenému množstvu oxidačného napätia. Je to z dôvodu nedostatku antioxidantov, ktoré sa správajú ako prirodzená fyziologická ochrana proti OS a taktiež ako výskyt potenciálneho zdroja ROS v embryu (Gupta et al., 2006).

Apoptóza môže byť škodlivá i pre embryá v skorých štádiách delenia a v konečnom dôsledku viesť k zhoršeniu vývoja až k smrti preimplantačného embrya (Jurisicová et al., 1996).

**Preeklampsia** je jedna z najčastejších závažných porúch tehotenstva. K jej charakteristickým príznakom patria hypertenzia, proteínúria, edémy, sklon k hemokoagulácii, poruchy funkcie pečene a obličiek a intrauterinné retardácie rastu plodu. Ohrozuje zdravie a život plodu a matky. Primárna príčina preeklampsie nie je známa. Celý proces je pravdepodobne dvojfázový. Začne poškodením uteroplacentárnej cirkulácie (Caruso et al., 1996).

Celkovo preeklampsia komplikuje 5% zo všetkých tehotenstiev a 11% prvoroďčiek. Pacienti s preeklampiou majú nižšiu antioxidačnú odpoveď (Aydin et al., 2004; Harma a Erel, 2005), pričom dochádza k peroxidácii základných štruktúr embrya (Makhail et al., 1994; Takagi et al., 2004).

V súčasnosti nie je metóda prevencie proti preeklampsii. Antioxidanty, vitamín C a vitamín E boli skúmané v niekoľkých výskumoch ako prevencia proti preeklampsii. Skorý zásah v 16-22 týždni tehotenstva s dodaním vitamín E a C mal za následok významnú redukciu preeklampsie (Agarwal et al., 2005b).

## **1.5 Mechanizmy protektivity voči účinku voľných radikálov**

Mnohé štúdie dokazujú, že vajíčka degenerujú resp. prechádzajú do procesov apoptózy pri výraznom pôsobení oxidačného stresu. Oxidácia bunkových sulfhydrylových (-SH-) skupín bola zistená počas meiotického delenia a indukciu apoptózy vajíčok. Pôsobenie oxidačného napätia na zygotu a blastocystu môže mať za následok zastavenie bunkového cyklu, odumretie alebo smrť bunky. Rozdelené embryá majú limitovaný vývojový potenciál a zriedkavé výsledky v implantácii. Apoptotická konfigurácia vyvolaná prooxidantami v deliacich sa bunkách embrya bola zistená v stave pred formovaním blastocysty. Vyššie koncentrácie peroxidu vodíka ako aj zvýšené odumieranie embryí sa zisťuje v neplodných vajíčkach v porovnaní s fertílnymi bunkami. Poškodená DNA spermií vplyvom ROS môže výrazne redukovať počet oplodnení a následný vývoj embrya (Sharma a Agarwal, 2004).

*In vivo* oplodnenie a vývoj embrya prebieha v prostredí s nízkym oxidačným napätím (Burton et al., 2003), znižovanie oxidačného napätia v umelo vytvorenom prostredí zlepšuje implantáciu a zvyšuje percento úspešných gravidít žien (Catt a Henman, 2000).

Vajíčka a embryá sú chránené proti smrtiacim účinkom OS antioxidantami prítomnými vo folikuloch, vajcovode ako aj v celej peritoneálnej dutine. Počas ART, je dôležité sa vyhnúť podmienkam, ktoré podporujú tvorbu ROS a vystavujú gaméty ako aj embryá OS (Catt a Henman, 2000).

Oxidačný stav je možné kontrolovať počas *in vitro* kultivácie čo nám zvyšuje prežívanie embrya. V cicavčích folikuloch vaječníka je prirodzená prooxidačná/antioxidačná rovnováha (Sharma a Agarwal, 2004).

Štúdie uvádzajú, že bunkový antioxidačný stav moduluje rôzne funkcie bunky. Glutatión (GSH) zmierňuje mnoho významných procesov oogenézy, oplodnenia a vývoja embrya (Gardiner a Reed, 1994; Tarin et al., 1998).

Oxidačný stav bunky je hlavným faktorom sprostredkujúcim odumieranie a GSH pravdepodobne hrá významnú úlohu v sprostredkovaní odumierania buniek vyvolaných oxidačným stavom. Oxidačné napätie indukuje aneuploidiu vajíčka, čo môže vyvolať neplodnosť (Sharma a Agarwal, 2004).

### **1.5.1 Antioxidačné ochranné mechanizmy**

Látky, ktoré neutralizujú potenciál účinku voľných radikálov, sa všeobecne zokupujú do tzv. antioxidačných ochranných mechanizmov (Greguška, 1997).

Antioxidačné systémy zodpovedné za ochranu buniek proti oxidačnému stresu sa rozlišujú podľa samých voľných radikálov. Na dosiahnutie maximálnej ochrany obsahujú bunky rôzne látky schopné odstraňovať rôznorodé formy voľných radikálov. Tieto odstraňovače sú strategicky umiestňované v subcelulárnych organelách buniek s cieľom dosiahnuť maximálnu ochranu. Napríklad superoxidodismutáza, kataláza a glutatiónperoxidáza nie sú len v cytoplazme, ale aj v mitochondriách, kde sa väčšina intracelulárnych voľných radikálov produkuje (Greguška, 1997).

Kooperácia interakcií medzi rôznymi antioxidantmi v plazme je rozhodujúca pre maximálne potlačenie voľnoradikálových reakcií v extracelulárnom priestore. Najvýznamnejšie biologické extracelulárne antioxidanty sú glutatión, vitamín E, kyselina močová, glutatiónperoxidáza, SOD, KAT, ceruloplazmín a transferín. Antioxidačné ochranné systémy sa tradične označujú ako primárne a sekundárne. Primárne ochranné zložky reagujú s voľnými radikálmi vytváranými priamo z kyslíka, hlavne zo superoxidového aniónu, sekundárne ochranné zložky odstraňujú radikály pochádzajúce z ďalších metabolických premien superoxidového aniónu.

Primárna ochrana zahŕňa: 1. antioxidantné enzýmy, ako sú SOD, KAT a peroxidázy, 2. antioxidantné látky, ako sú vitamíny E, A, C, glutatión a kyselina močová.

Pre sekundárnu ochranu sa vyčleňujú lipolytické enzýmy, fosfolipázy, proteolytické enzýmy, proteázy, peptidázy, DNA reparačné endonukleázy, exonukleázy a lipázy (Greguška, 1997).

Antioxidančný ochranný systém je tvorený antioxidantami, látkami, ktoré sú schopné v relatívne nízkej koncentrácii súťažiť s inými oxidovateľnými biomolekulami, a tak významne spomaliť alebo inhibovať oxidáciu týchto substrátov (Kalousová et al., 2006).

Proti toxickému účinku pôsobenia voľných radikálov a reaktívnych metabolitov má organizmus vybudované ochranné mechanizmy (Ďuračková, 1998).

Tieto ochranné mechanizmy môžu byť rozdelené do štyroch kategórií:

- kompartmentalizácia,
- detoxikácia,
- oprava,
- využitie.

**Kompartmentalizácia** predstavuje elimináciu voľných iónov kovov (Fe alebo Cu) rôznymi chelatačnými látkami (napr. feritín, albumín, deferoxamíny a i.), práve tak ako bunkovú a tkanivovo špecifickú distribúciu antioxidantov.

**Detoxikáciu** oxidovaných molekúl (radikály, peroxidy) zabezpečujú enzýmy a nízkomolekulové antioxidanty. Tieto chránia bunku 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  $\cdot\text{O}_2$  a premení ho na neradikálové molekuly  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ ,
- **lapače** (trappingy) – napr. vitamín E vychytáva  $\cdot\text{OH}$  a premení ho na relatívne stabilný radikál,
- **zhášače** (quencher) – napr. karotén zháša singletový kyslík

Základný význam pre detoxikačnú ochranu proti oxidačnému poškodeniu majú neenzýmové antioxidanty, ktoré na rozdiel od enzýmov sú prítomné vo všetkých kompartmentoch organizmu.

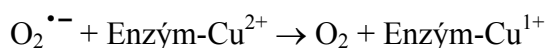
Funkciou **opravných enzýmov**, ktoré tvoria druhú líniu obrany, je zabezpečiť elimináciu výsledkov zatiaľ reverzibilnej modifikácie. Veľký význam majú enzýmy, ktoré

sú schopné redukovať oxidované zlúčeniny a obnoviť ich funkciu ako napr. glutatiónereduktáza a methemoglobínreduktáza.

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<sub>2</sub> zabraňuje ich účasti v pokračovaní reťazových reakcií. Do tejto skupiny patria aj reparačné enzýmy na opravu oxidačne poškodenej DNA (Muchová et al., 2004).

#### 1.5.1.1 Enzymové antioxidačné systémy

**Superoxiddismutáza** (SOD) je metaloenzým, ktorý v aktívnom centre obsahuje meď a zinok (v cytoplazme eukaryotických buniek) alebo Mn (v mitochondriách eukaryotických buniek) alebo Fe (v primitívnych anaeróboch a vo fotosyntetizujúcich baktériách). Enzým katalyzuje dismutáciu superoxidu, ktorá prebieha v dvoch následných reakciách:

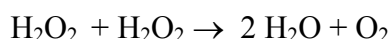


SOD pôsobí inhibične v iniciačnej fáze lipoperoxidácie (Muchová et al., 2004).

Znížená aktivita SOD u niektorých ochorení môže viesť následkom nedostatočného odstraňovania superoxidu k poškodeniu organizmu pôsobením ROS. Nižšia aktivita SOD bola popísaná napr. u niektorých hemodialyzovaných ochorení, môže sa na nej podieľať napr. inhibícia enzýmu hliníkom (Racek a Holeček, 1999).

**Kataláza (KAT)** sa nachádza v perioxómoch väčšiny živočíšnych buniek (Ďuračková et al., 1999).

Je to enzým, zaisťujúci štiepenie peroxidu vodíka na vodu a kyslík:

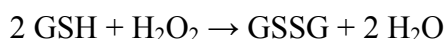


Pôsobí pritom na peroxid vodíka vo vysokých koncentráciách. Tým sa líši od peroxidáz, kde okrem peroxidu vodíka je ešte ďalší kosubstrát, ktorý je v reakcii

oxidovaný. Peroxidázy navyše pôsobia na nízke koncentrácie peroxidu vodíka, resp. iných hydroperoxidov (Racek a Holeček, 1999).

Katalázu obsahuje väčšina aeróbných buniek živočíchov, kde sa jej vyskytuje najviac v pečňových bunkách a erytrocytoch (Muchová et al., 2004).

**Glutatiónpoxidáza (GPx)** nie je na rozdiel od katalázy špecifiká voči substrátu. Je schopná rozkladať peroxid vodíka alebo mnohé organické peroxidy (a teda aj lipoperoxidy) na vodu, prípadne alkohol, za súčasnej oxidácie GSH:



Oxidovaná forma glutatiónu je spätne redukovaná prostredníctvom glutatiónereduktázy (GR) v reakcii, ktorá vyžaduje NADPH ako koenzým:



Výsledkom je teda rozštiepenie peroxidu a súčasná oxidácia NADPH:



Celá skupina cytosolových enzýmov nazývaných **glutatiónterferázy (GST)** katalyzuje konjugačnú reakciu, pri ktorej je sulfhydrylová skupina GSH naviazaná na elektrofilnú organickú látku. Týmto spôsobom sú detoxikované niektoré látky telu cudzie (xenobiotika). 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).

#### 1.5.1.2 Vysokomolekulové endogénne antioxidanty

Rada proteínov je schopná 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** mlieka

a polymorfonukleárných leukocytov. Tieto proteíny pevne viažu železo vo forme Fe (III) a tým ho zbavujú možnosti vstupovať do Fentonovej reakcie.

Ďalším proteínom separujúci železo v bunke je **feritín**, ktorý pôsobí antioxidantne hlavne svojou feroxidázovou aktivitou, ktorá skladované železo udržiava v oxidovanom stave, dokiaľ ho odtiaľ neuvoľní silne redukujúca látka (askorbát).

Prooxidačne nebezpečnou formou železa je hemoglobín, uvoľnený z erytrocytov a hém uvoľnený z hemoproteínov vrátane hemoglobínu a myoglobínu. Preto môžeme za antioxidanty považovať tiež **haptoglobín**, vychytávajúci extracelulárny hemoglobín, a **hemopexín**, viažuci uvoľnený hém. Významným antioxidantným proteínom plazmy je **ceruloplazmín**. Tento proteín viaže meď, ktorý je podstatný pre ferooxidázovú aktivitu ceruloplazmínu oxidujúceho dvojmocné železo na trojmocné. Umožňuje tak uvoľnenie železa z buniek a jeho predanie transferínu. Súčasne sa kyslík oxiduje štyrmi elektrónmi na vodu, bez toho aby vznikali toxické medziprodukty.

Reaktivitu voľných radikálov významne ovplyvňujú tiež tiolové skupiny niektorých proteínov. **Albumín** viaže ión  $\text{Cu}^{2+}$ , ktorý sa peroxidom vodíka oxiduje na  $\text{Cu}^{3+}$  a v tejto forme poškodzuje okolité štruktúry albumínov.

**Metalothioneíny** sú proteíny obsahujúce mnoho cysteínu a žiadne aromatické aminokyseliny. Hrajú zrejme dôležitú úlohu v bunkovom jadre. Prostredníctvom síry chelátujú ióny kovov. Pri oxidačnom strese sa zvýši ich syntéza.

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 zrejme rozpoznávajú oxidáciou poškodené proteíny, viažu ich na seba a urýchľujú ich odstránenie v proteozómoch. Môžu tiež pomôcť pri opravách konformácie lipidov (Štípek et al., 2000).

#### 1.5.1.3 Nízkomolekulové endogénne antioxidanty

Patria k nim vo vode rozpustné antioxidanty ako glutatión a vitamín C a v lipidoch rozpustné antioxidanty ako vitamín E, koenzým Q10, kyselina močová a mnohé ďalšie.

Medzi najúčinnšie nízkomolekulové antioxidanty patrí  **$\alpha$ -tokoferol (vitamín E)**. Jeho účinok sa vysvetľuje:

- inhibíciou peroxidácie lipidov,
- zhášaním singletového kyslíka  $^1\text{O}_2$ ,

- ochranou membrány pred deštrukčnými účinkami voľných vyšších karboxylových kyselín, s ktorými vytvára komplexy.

**$\alpha$ -tokoferol** inhibuje peroxidáciu lipidov tým, že reaguje s peroxylovým radikálom ( $LO^{\bullet}$ ). Takto dochádza k prerušeniu radikálovej reakcie vytvorením relatívne stabilného tokoferolového radikálu ( $E^{\bullet}$ ). Ten môže reagovať s ďalším peroxylovým radikálom a vytvoriť produkt (EOOL), alebo sa môže regenerovať (Muchová et al., 2004).

**Kyselina askorbová (vitamín C)** je nutná ako kofaktor enzýmu pri syntéze kolagénu a pri premene dopamínu na noradrenalín. Redukuje Fe (III) na Fe (II) a Cu (II) na Cu (I). Umožňuje tak vstrebávanie železa z čreva a využitie prechodných prvkov v aktívnom centre hydroxyláz. Antioxidačný účinok askorbátu spočíva v tom, že redukuje anorganické i organické radikály, ako  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO_2^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$ , hydrofilný  $RO_2^{\bullet}$ ,  $NO_2^{\bullet}$  a reaguje s  $^1O_2$  a HClO (Štípek et al., 2000).

Môže sa podieľať na recyklácii s vitamínom E, a tak udržiavať účinnú antioxidačnú obranu. Čerstvé zelené ovocie a zelenina sú dobré zdroje askorbátu, ale počas spracovania potravy ľahko oxidujú. Následkom toho, koncentrácia askorbátu tejto potravy je v podstate nižšia. Vplyvom vysokého inhibujúceho potenciálu v kombinácii s Fe iónmi sa askorbát môže stať prooxidantom (Surai, 2002).

V podmienkach *in vivo* prebieha redukcia semidehydroaskorbátového radikálu späť na askorbát účinkom enzýmových systémov:

a) NADH-semidehydroaskorbátreduktáza katalyzuje reakciu:



b) Dehydroaskorbátreduktáza katalyzuje reakciu:



**Glutatión - (GSH)** je tripeptid v bunkách cicavcov, a je aktívny antioxidant v biologickom systéme poskytujúci bunkám ich redukčné prostredie (Surai, 2002).

Patrí medzi najvýznamnejšie redoxné pufré bunky, pretože sa ľahko oxiduje a s ďalšou molekulou glutatiónu tvorí glutatiónsulfid (oxidovaný glutatión GSSG). Jeho funkciou je



odstraňovať ROS, udržiavať v redukovanej forme sulfhydrylové skupiny proteínu, cysteínu, koenzýmu A a regenerovať tokoferol a askorbát (Štípek et al., 2000).

Bunkový GSH hrá kľúčovú úlohu v biologických procesoch a môže byť syntetizovaný v ľudskom tele (Surai, 2002).

**Flavonoidy** – sú nízkomolekulárne polyfenolové substancie, založené na flavonovom základe (Surai, 2002).

Sú to exogénne zlúčeniny, ktorých chemická povaha závisí od štruktúry, stupňa hydroxylácie, stupňa substancií a konjugácií, stupňa polymerizácie a od ďalších substancií (Aherne a O'Brien, 2002).

Flavonoidy majú antioxidačný účinok silnejší ako vitamín C a E (Dlugošová a Pšenáková, 2004).

Ovplyvňujú účinok reaktívnych kyslíkových radikálov na rôznych úrovniach:

- ako účinné lapače alebo zhášače voľných radikálov inhibujú lipidovú peroxidáciu
- majú chelatačné účinky, tvoria komplexy s kovmi, ktoré by vo voľnej forme mohli viesť k zvýšenej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka
- inhibujú enzýmy kaskády kyseliny arachidónovej a aj týmto spôsobom znižujú tvorbu reaktívnych foriem kyslíka
- spolupracujú s antioxidačnými vitamínmi (A, E,  $\beta$ -karotén), zvyšujú účinok a znižujú ich degradáciu (Mojžiš a Mojžišová, 2001).

Medzi flavonoidy patria **kamferol**, **kvercetín**, **myrecitín**, **hesperidín**. Flavonoidy môžu inhibovať tvorbu lipidoperoxidázy a tým chrániť pred aterosklerózou a potláčajú aj tvorbu karcinogénnych produktov - aldehydov inhibíciou peroxidácie lipidov v membránach nádorových buniek, ktorá je čiastočne zodpovedná za ich špecifické vlastnosti. Preto flavonoidy majú aj protinádorovú aktivitu (Surai, 2002).

Flavonoidy taktiež chelatujú železo, takže i týmto mechanizmom by mohli tmiť oxidačný stres tkanív (Acker et al., 1998).

**Isoflavonoidy** - majú limitovanú distribúciu v prírode a pre praktické použitie. Sójové potraviny sú nutrične významné zdroje týchto fytochemikálií. Isoflavonoidy sú slabé estrogény ale majú ďalšie dôležité biologické vlastnosti nezávislé od schopnosti obsadzovať estrogénové receptory (Surai, 2002).

**Koenzým Q (ubichinon)** - je nepostrádateľný pre normálnu funkciu buniek. Starnutím sa jeho množstvo v organizme znižuje. Bez koenzýmu Q 10 sa preruší tvorba energie, čím sa zastavia všetky biochemické pochody v bunke. Jedným z najlepšie preskúmaných

účinkov koenzýmu Q10 je jeho schopnosť dodávať energiu pre prácu srdca a posilniť srdcový sval. Na základe niekoľkých výskumov sa potvrdilo, že chronický nedostatok koenzýmu Q10 môže mať pre srdce nepriaznivé dôsledky. Koenzým Q10 chráni pred civilizačnými chorobami vrátane rakoviny, predchádza rýchlemu starnutiu, únave, stresu a priaznivo pôsobí na imunitný systém. Má tiež priaznivé účinky pri ochoreniach zubov a pri paradentóze, ochoreniach dýchacích ciest a astmy. Užíva sa pri liečbe porúch mozgových činností súvisiacich so schizofréniou a Alzheimerovou chorobou. Spomaľuje proces starnutia. Koenzým Q je významná látka prenášajúca redukované ekvivalenty v dýchacom reťazci. Lapa peroxylový a alkoxylový radikál a má schopnosť regenerovať lipofilný antioxidant tokoferol. Možno inhibuje LDL a má protektívny účinok v procese aterogenézy (Štípek et al., 2000).

**Cystein (CSH)** patrí do skupiny neenzymatických antioxidantov. Pôsobí proti hydroxylovým radikálom. Významné množstvo CSH bolo zaznamenané vo folikulárnej tekutine u mnohých zvierat (Guyader-Joly et al., 1998).

Bol popísaný účinok CSH na vývoj ranných embryí a ich dozrievanie po pridaní do kultivačného média (Gruppen et al., 1995).

**Kyselina  $\alpha$ -lipoová** je kofaktorom pyruvátdehydrogenázového a  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázového komplexu. Je univerzálnym antioxidantom, pretože reaguje s alkylperoxylovými radikálmi ( $RO_2^{\cdot}$ ), askorbylovými radikálmi,  $HO^{\cdot}$ ,  $NO^{\cdot}$ , tokoferolovými radikálmi,  $O_2^{\cdot-}$  a  $HClO$ . Lipoát regeneruje tokoferolový radikál priamo alebo prostredníctvom askorbátu (Štípek et al., 2000).

## 1.6 Vplyv olova na organizmus

Olovo je hlavný toxín životného prostredia, ktorý spôsobuje hematologické, gastrointestinálne a neurologické poruchy. Dlhodobejšia intoxikácia organizmu olovom môže tiež spôsobovať poruchy v reprodukcii, hypertenziu, nefropatiu, zníženie rýchlosti vedenia nervových vzruchov, zmenu homeostázy, vápnika a inhibíciu enzýmov. Hlavné zdroje olova sú prach, voda, kozmetika, prírodné liečivá a potrava (Lockitch, 1993).

Hoci olovo nie je prechodný prvok, predpokladá sa, že hlavný dôvod jeho toxickosti je katalýza peroxidačných reakcií, napr. vyšších karboxylových kyselín (Donaldson a Knowles, 1993).

Olovo už v nízkych koncentráciách inhibuje niektoré biochemické procesy a to predovšetkým syntézu hémovej zložky hemoglobínu, pričom sa súčasne skracaje prežívanie cirkulujúcich erytrocytov. Dochádza k anémii so všetkými dôsledkami na produkčné i reprodukčné schopnosti organizmu. Pôsobenie Pb na reprodukčné funkcie sa prejavuje tak pri expozícii matiek ako aj otcov (Kováčik et al., 2000).

Anorganické olovo je nepochybne najviac skúmaným zo všetkých toxických agentov. K expozícii dochádza pri širokej škále podmienok, často aj v bežnom životnom prostredí. Expozícia a riziko sa zvyčajne hodnotia biologickým monitorovaním, najmä koncentráciou olova v krvi (PbB). PbB má však svoje obmedzenia, pretože pri vysokej expozícii dochádza k saturácii. Olovo sa akumuluje v zuboch a kostre, kde sa dá zistiť metódami *in vivo*, ktoré reflektujú dlhodobý príjem. Toxické účinky môžu nastať v centrálnej a periférnej nervovej sústave, krvi (vrátane inhibície syntézy hému, čo má vplyv aj na iné bunky), obličkách, kardiovaskulárnom, endokrinnom a imunitnom systéme, zažívacom trakte a mužskej reprodukcii (kvalita spermií).

Olovo navyše prechádza do placenty a môže vplývať na nervovú sústavu plodu. Má mierne (ale škodlivé) účinky na mentálny vývoj novorodencov a detí. Najdôležitejšie organické zlúčeniny olova sú tetraetylolovo a tetrametylolovo. Sú ľahko absorbovateľné inhaláciou a pokožkou a môžu spôsobiť akútnu encefalopatiu.

Existuje viacero metód na stanovenie koncentrácie olova vo vzduchu, pôde, vode, potravinách, biologických vzorkách, kozmetike, náteroch a iných matriciach. Inštrumentácia siaha od prenosných prístrojov na röntgenovú fluorescenciu (XRF) slúžiacich na priamu detekciu olova v náteroch, pôde a iných vzorkách životného prostredia, cez prístroje na anodickú voltometriu určenú na detekciu olova napr. vo vzorkách krvi a vody, až po väčšie stacionárne prístroje ako sú atómová absorbná spektrometria (AAS) a indukčne viazaná plazmová a hmostnostná spektrometria (ICP-MS).

Najbežnejšia biologická matrica na zisťovanie olova je plná krv. Vo všeobecnosti sa analyzuje žilová krv. Pri alternatívnom použití kapilárnych vzoriek sú získané hodnoty falošne vysoké kvôli kontaminácii, a to aj keď je personál odoberajúci vzorky odborne vyškolený.

Kapilárne vzorky môžu byť užitočné pre skriningové účely, no ich použitie môže byť ťažko odôvodniteľné v epidemiologických štúdiách. Existujú tri bežne používané princípy na zisťovanie koncentrácie olova v krvi. Tieto sú ASV, elektrotermická AAS (ETAAS; niekedy označovaná aj ako AAS s grafitovou kyvetou, GFAAS) a ICP-MS. Všetky môžu

byť veľmi účinné pri zisťovaní PbB, ale významné rozdiely boli zaznamenané medzi ASV a ETAAS vo vzorkách zbieraných vo veľkých nadmorských výškach, pravdepodobne kvôli vplyvu na chemické zloženie krvi (Nordberg et al., 2007).

## 2 Cieľ práce

Dospelý jedinec, ale i embryo je počas vývoja ovplyvňovaný viacerými faktormi. Na jednej strane majú voľné radikály pre organizmus prospech, no na strane druhej sa v súčasnosti venuje veľká pozornosť sledovaniu ich negatívnemu pôsobeniu. Porušenie rovnováhy medzi tvorbou voľných radikálov a antioxidantami, vedie ku vzniku oxidačného stresu. Oxidačný stres môže spôsobiť poškodenie lipidov, proteínov, DNA a vyvolať porušenie činnosti a funkcie buniek a tkanív, v konečnom dôsledku spôsobuje apoptózu až nekrózu buniek.

Olovo patrí medzi ťažké kovy, vo vyšších koncentráciách, rovnako ako voľné radikály môže pôsobiť toxicky. Zistilo sa, že olovo taktiež môže spôsobovať rôzne poškodenia buniek, čo má za následok chybný vývoj embrya.

Cieľom našej diplomovej práce bolo na základe zistených poznatkov stanoviť vplyv olova, rôznych koncentrácií (Pb1 – koncentrácia olova – 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, Pb5 – koncentrácia olova – 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) na antioxidačný status embryí, pomocou dostupných metód FRAP (feroredukčná schopnosť plazmy/média), TAS (celková antioxidačná kapacita) a Alb. (stanovenie koncentrácie albumínu) a pomocou TUNEL analýzy stanoviť morfológickú charakteristiku embryí, t.j. vplyv olova na vznik apoptózy. Experimenty boli uskutočnené na ranných embryách králikov.

Východiskovým materiálom na spracovanie tejto diplomovej práce bola bakalárska práca na tému "Voľné radikály a intrauterinný vývoj jedinca", obhájená v roku 2008.

## 3 Metodika práce a metódy skúmania

### Získavanie embryí králik

Samice králikov boli pred pripúšťaním intramuskulárne hormonálne ošetrené hCG a o 13<sup>00</sup> hod. pripustené samcami rovnakých plemien. Nasledujúci deň sa získavali embryá. Embryá sa získali od samíc králika plemena Novozélandsky biely, respektíve Kalifornský po usmrtení elektrickým prúdom v porážkarni. Po usmrtení samice v porážkarni a odobratí vajcovodov spolu s vaječníkmi a rohom maternice boli sterilne prenesené do laboratória. Embryá sa vyplavili s vajcovodov injekčnou striekačkou, v ktorej sa nachádzalo vyplavovacie médium (zohriaty PBS na 37°C). Tieto vyplavené embryá v 1-2 bunkovom štádiu boli následne presunuté do kultivačného média DMEM v Petriho miske a takto vložené do CO<sub>2</sub> inkubátora s atmosférou 5% CO<sub>2</sub> a temperovaného na 37,5 °C. Následne boli 3x premyté v zohriatom (37°C) independent médiu s prídavkom 10% FCS. V danom médiu sa embryá selektovali na základe morfológických kritérií.

Nasledujúci deň o 10<sup>00</sup> hod. sa embryá už v 6 - 8 bunkovom štádiu vystavili pôsobeniu olova. V každej kultivačnej jamke bolo 800 µL kultivačného média.

Pri koncentrácii 0,1 µL.mL<sup>-1</sup> sa použilo médium zmiešané z :

- a) 0,160 µL.mL<sup>-1</sup> roztoku ťažkého kovu (Pb)
- b) 0,640 µL.mL<sup>-1</sup> kultivačného média

Získalo sa 74 embryí od 4 samíc, pričom 2 boli neoplodnené. Kultivácia embryí s prídavkom Pb trvala 24 hodín. Následne sa preložili do 4-komôrkových kultivačných platničiek a vložili znovu do CO<sub>2</sub> inkubátora, kde boli až do nasledujúceho dňa.

Ďalší deň sa pozorovali pod mikroskopom embryá kultivované v normálnom médiu v štádiu 8 – 16 bunkovom (mali normálny vývoj bez akýchkoľvek zmien) a porovnávali sa s embryami vystavenými ťažkému kovu, pri ktorých sa spozorovali zmeny v štruktúre blastomér a mali porušenú *zonu pellucidu*.

Po kultivácii sa odseparovali embryá z média do Ependorfových skúmaviek a uchovali sa pri -80 °C pre dodatočnú analýzu. Embryá sa podrobili analýze TUNEL.

### 3.1 Stanovenie antioxidačného statusu

#### 3.1.1 FRAP – feroredukčná schopnosť plazmy/média

Test FRAP je prezentovaný ako nová metóda na stanovenie „antioxidačnej sily“. Redukcia železitých iónov na železnaté pri nízkom pH má za následok tvorbu farebného železnatého-tripyridyltriazínového komplexu.

Test FRAP a jeho výsledky sú prezentované s dôrazom na nasledovné: reakčná kinetika a vzťah dávka-odozva (dose-reponse) s roztokmi kyseliny askorbovej, kyseliny močovej, bilirubínu, Troloxu (vo vode rozpustný analóg vitamínu E),  $\alpha$ -tokoferolu a albumínu, so zmesami týchto antioxidantov s plazmou/médiom.

Na test FRAP bol použitý centrifugálny analyzátor Cobas Fara, a to nasledovne: 300  $\mu$ L čerstvo pripraveného FRAP činidla sa zahrialo na 37°C a vykonala sa slepá činidlová skúška (M1) pri 593 nm; následne sa pridalo 10  $\mu$ L vzorky, spolu s 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O; konečné zriedenie vzorky v reakčnej zmesi bolo 1/34. Hodnoty absorbancie (A) sa odčítali po 0,5 s a potom každých 15 s až do konca monitorovania. Pre každú vzorku sa kalkulovala zmena v absorbancii ( $\Delta A_{593\text{nm}}$ ) medzi posledným zvoleným odčítaním a odčítaním M1, ktorá sa porovnávala s  $\Delta A_{593\text{nm}}$  Fe<sup>II</sup> štandardného, paralelne testovaného roztoku (Benzie a Strain, 1996).

### 3.1.2 TAS – celková antioxidačná kapacita

ABTS (2,2-azino-di-[ethylbenzthiazolin sulfonát]) produkuje po inkubácii s peroxidázou a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relatívne stabilný radikál ABTS modrozelenej farby, ktorého koncentráciu je možné stanoviť fotometricky pri 600 nm. Antioxidanty v pridanej vzorke spôsobia úbytok farbiva, ktorý je priamo úmerný antioxidačnej kapacite vzorky.

Boli pripravené tri kyvety s obsahom 1 mL. Do prvej kyvety sa napipetoval reagenčný blank, do druhej štandard v množstve 20  $\mu$ L a do tretej kyvety sa pridala stanovovaná vzorka v množstve 20  $\mu$ L. Následne sa do kyviet pridávali ďalšie zložky.

Chromogen v množstve 1 mL sa pridala do všetkých troch kyviet. Do kyvety s reagenčným blankom sa pridala destilovaná voda v množstve 20  $\mu$ L. Kyvety sa premiešali a bola zmeraná absorbanca A<sub>1</sub>. Následne sa do všetkých troch kyviet pridalo 200  $\mu$ L substrátu. Kyvety sa opäť premiešali a po troch minútach sa zmerala absorbanca A<sub>2</sub>.

Absorbancia bola meraná proti vzduchu, pri vlnovej dĺžke 600 nm, pričom bola použitá teplota 37 °C, pomocou spektrofotometra Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

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

## Výpočet:

Celková antioxidačná kapacita (TAS):

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

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

### 3.1.3 Albumin

Bromkresolová zeleň (BCG) tvorí s albumínom v slabo kyslom prostredí za prítomnosti povrchovo aktívnych látok komplex, ktorý je vhodný k fotometrickému stanoveniu.

Rovnako ako pri predchádzajúcom postupe boli použité tri kyvety. V prvej kyvete sa nachádzal reagenčný blank, v druhej bola prítomná stanovovaná vzorka v množstve 10  $\mu\text{L}$  a v tretej štandard, čiže kalibrátor, v celkovom množstve 10  $\mu\text{L}$ .

Do všetkých troch kyviet sa pridávali nasledujúce zložky: do všetkých sa pridalo činidlo R1 [bromkresolová zeleň (BCG) v množstve 0,21  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , sukcinátový pufr v množstve 100,0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , azid sodný v množstve 0,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ], pričom sa do každej kyvety pridal 1,0 mL. Destilovaná voda v množstve 0,01 mL do pridala do prvej kyvety, ktorá obsahovala reagenčný blank.

Následne sa kyvety premiešali a po 5 minútach inkubácie sa zmerala absorbanca vzoriek  $A_1$  a absorbanca štandardu (kalibrátoru) proti reagenčnému blanku  $A_2$ .

Absorbancia sa merala pri vlnovej dĺžke 578 nm, pri použitej teplote 37 °C, pomocou spektrofotometra Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA).

## Výpočet:

$$\text{Albumín}(\text{g/L}) = \frac{A_1}{A_2} \times \text{Cst}$$

Cst – koncentrácia štandardu (kalibrátora)



## **3.2 Morfológická charakteristika embryí**

### **3.2.1 TUNEL metóda**

Tunel metóda (terminal dUTP-transferase-mediated DNA nick end-labelling – zlomky DNA označené terminálnou transferázou) sa používa na detekciu apoptotických buniek a na vizualizáciu DNA fragmentov (Makarevich et al., 2008).

Napriek rozsiahlemu využitiu, nevýhodou tejto techniky je možnosť označenia falošne-pozitívnych nekrotických buniek (Negoescu et al., 1996; 1998).

Embryá boli prenesené z kultivačného média, premyté 3 x 5 min. v PBS obsahujúcom polyvinylpyrrolidon (PVP, 4 mg.mL<sup>-1</sup>), potom fixované 5 min. v 3,7% formalíne a 10 min. v 70% etanole. Na permeabilizáciu membrány embryá boli inkubované 15 min. v 0,5% Triton X-100 v PBS. Inkubácia v blokovacím médiu (1% BSA v PBS) bola potlačená nešpecifická väzba. Embryá boli spracované na TUNEL pomocou apoptotickej súpravy reagentov MEBSTAIN Direct Apoptosis Detection Kit (Imunotech, Marseilles, Francúzsko) v súlade s návodom. Fixované a permeabilizované embryá sa inkubovali v TdT - značiacej zmesi (TdT pufer, FITC – dUTP a TdT) pri 37 °C 1 hodinu. Po uplynutí tohto času TUNEL-reakciu zastavili premytím 3 krát v PBS-PVP. Pre kontrafarbenie jadier použili 20 min. inkubáciu vo fluorescenčnom farbive propidium jodide (PI, 1 µL.mL<sup>-1</sup> PBS).

Po premytí embryá boli prenesené na krycie sklíčko a prekryté 5 µL montovacieho média Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (Chrenek et al., 2006).

Pripravené preparáty boli pozorované fluorescenčným mikroskopom Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Nemecko), pri vlnovej dĺžke 488 nm.

### **Štatistické analýzy**

Zo získaných výsledkov laboratórnych analýz sme pomocou štatistického programu GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego California USA) vypočítali základné štatistické ukazovatele (priemer, S.D. – smerodajnú odchýlku, minimum, maximum, VC% - variačný koeficient).

## 4 Výsledky práce

### 4.1 Stanovenie antioxidantného statusu

V kultivačných médiách králičích embryí sme sa zamerali na stanovenie antioxidantného statusu králičích embryí, ktoré boli kultivované *in vitro*.

Králičie embryá boli vystavené pôsobeniu rôznych koncentrácií olova (Pb1 – koncentrácia olova –  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Pb5 – koncentrácia olova –  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Do kontrolnej skupiny sa olovo nepridávalo. Namerané hodnoty pri jednotlivých metódach sú uvedené v Tab. 4.1.

Metóda FRAP slúži na stanovenie feroredukčnej schopnosti plazmy/média. Maximálna nameraná hodnota bola v skupine média Pb1 (olovo s koncentráciou  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde bola zistená hodnota  $666,667 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Minimálna hodnota bola zistená v skupine Pb5 (olovo s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde sa zistila hodnota  $14,25 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . V kontrolnej skupine, bez pridania olova sa zistila maximálna hodnota  $575,44 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  a minimálna hodnota  $140,35 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Najvyššia priemerná hodnota feroredukčnej schopnosti plazmy/média bola nameraná v skupine olova s koncentráciou  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , kde hodnota dosiahla  $324,56 \pm 272,29 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Nižšia priemerná hodnota bola nameraná v kontrolnej skupine, kde sa zistila hodnota  $301,75 \pm 164,95 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$ , a najnižšia priemerná hodnota bola nameraná v skupine olova s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , kde bola zistená hodnota  $124,44 \pm 122,11 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}$ .

Druhým ukazovateľom antioxidantného statusu bola TAS, čiže išlo o stanovenie celkovej antioxidantnej kapacity média. Najnižšia priemerná hodnota celkovej antioxidantnej kapacity média bola v skupine Pb5, kde bola priemerná hodnota  $0,046 \pm 0,006 \text{ mmol.L}^{-1}$ . O niečo vyššia priemerná hodnota bola v skupine Pb1, kde sa zistila hodnota  $0,057 \pm 0,006 \text{ mmol.L}^{-1}$ . V kontrolnej skupine, bez pridania olova sa zistila najvyššia priemerná hodnota celkovej antioxidantnej kapacity média, kde sa namerala hodnota  $0,086 \pm 0,009 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

Tretím ukazovateľom antioxidantného statusu bol Albumín, čiže sa stanovovala koncentrácia albumínu. Najvyššia priemerná hodnota koncentrácie bola zistená v kontrolnej skupine ( $1,882 \pm 0,293 \text{ g.L}^{-1}$ ). Pri skupinách s prídavkom olova sa zistila vyššia hodnota pri Pb1 (koncentrácia olova –  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde bola nameraná hodnota  $1,408 \pm 0,800 \text{ g.L}^{-1}$ , o niečo nižšia hodnota sa zistila v skupine olova s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $1,350 \pm 0,166 \text{ g.L}^{-1}$ ).

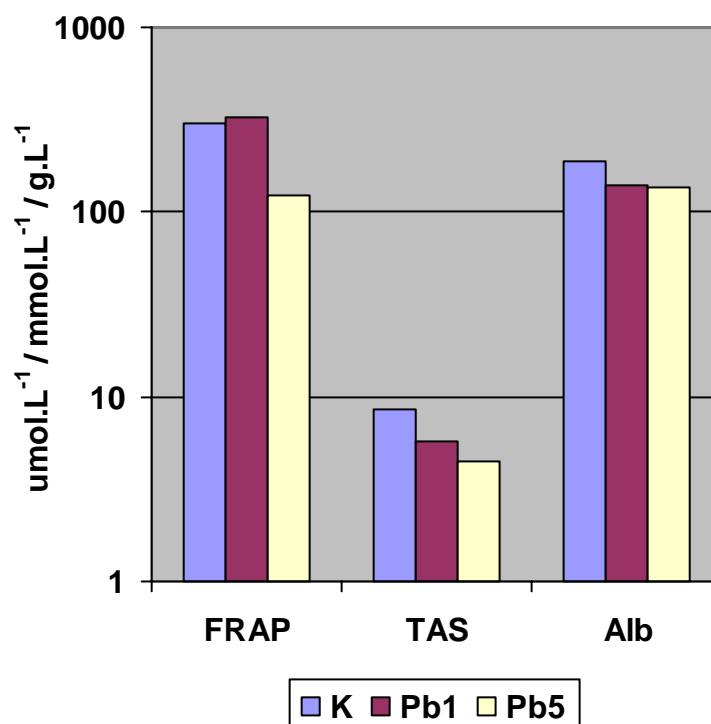
**Tab. 4.1**

**[Základné štatisticko - variačné hodnoty koncentrácií antioxidantov v kultivačných médiách králičích embryí]**

	FRAP ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )			TAS ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )			Alb ( $\text{g.L}^{-1}$ )		
	K	Pb1	Pb5	K	Pb1	Pb5	K	Pb1	Pb5
$\bar{x}$	<b>301,75</b>	<b>324,56</b>	<b>124,44</b>	<b>0,086</b>	<b>0,057</b>	<b>0,046</b>	<b>1,882</b>	<b>1,408</b>	<b>1,350</b>
min	140,35	38,60	14,25	0,077	0,049	0,042	1,568	0,089	1,112
max	575,44	666,667	323,25	0,098	0,064	0,054	2,325	2,248	1,568
S.D.	<b>164,95</b>	<b>272,29</b>	<b>122,11</b>	<b>0,009</b>	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>	<b>0,293</b>	<b>0,800</b>	<b>0,166</b>
C.V. (%)	54,664	83,895	98,127	10,623	10,146	12,238	15,588	56,844	12,274

FRAP – feroredukčná schopnosť plazmy/média, TAS – celková antioxidačná kapacita, Alb – koncentrácia albumínu, K. – kontrolná skupina bez pridania olova, Pb1 – skupina s koncentráciou olova –  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Pb5 – skupina s koncentráciou olova –  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , SD – smerodajná odchýlka, C.V. (%) – variačný koeficient

Grafické znázornenie nameraných hodnôt v kultivačných médiách králičích embryí poskytuje Graf 4.1.



**Graf 4.1**

**[Priemerné koncentrácie antioxidantov v kultivačných médiách]**

## 4.2 Stanovenie morfolologickej charakteristiky embryí

Morfologickú charakteristiku kultivovaných králičích embryí sme vyhodnotili pozorovaním embryí pod optickým mikroskopom a pomocou TUNEL analýzy. TUNEL analýza slúži na detekciu apoptotických buniek prostredníctvom vizualizácie DNA fragmentov. Jednotlivé zistené hodnoty sú zaznamenané v tabuľke 4.2. Na základe analýzy sme zistili, že:

- najvyšší priemerný počet embryonálnych buniek pozitívnych na apoptózu bol zistený v kontrolnej skupine, kde bola zistená hodnota  $1,533 \pm 1,50$ . Priemerný počet kultivovaných embryí bol  $7,5 \pm 0,5$  a priemerný celkový počet embryonálnych buniek bol  $78,6 \pm 35,57$ . V tejto kontrolnej skupine T – tunel index (%) dosiahol priemernú hodnotu  $2,889 \pm 3,068$ . Minimálna hodnota počtu embryonálnych buniek pozitívnych na apoptózu bola zistená 0 a maximálna 4.
- v skupine Pb1 (olovo s koncentráciou  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) bola zistená priemerná hodnota počtu embryonálnych buniek pozitívnych na apoptózu  $0,35 \pm 0,572$ ; čiže nastala fragmentácia DNA, pričom priemerný počet kultivovaných embryí bol  $10 \pm 0$  a priemerný celkový počet embryonálnych buniek  $94,3 \pm 35,02$ . T – tunel index (%) v tejto skupine bol zistený  $0,515 \pm 0,835$ . Minimálnu hodnotu pozitivity na apoptózu predstavovalo 0 embryonálnych buniek a maximálnu 2 embryonálne bunky.
- v skupine olova s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Pb5) priemerná hodnota TN (počet embryonálnych buniek pozitívnych na apoptózu) predstavovala  $0,3 \pm 0,458$ . Táto hodnota bola zistená pri priemernom počte kultivovaných embryí  $10 \pm 0$  a pri priemernom celkovom počte embryonálnych buniek  $91,4 \pm 32,19$ . Zistená priemerná hodnota T – tunel indexu (%) bola  $0,340 \pm 0,674$ ; pričom minimálna hodnota TN bola 0 a maximálna 1.

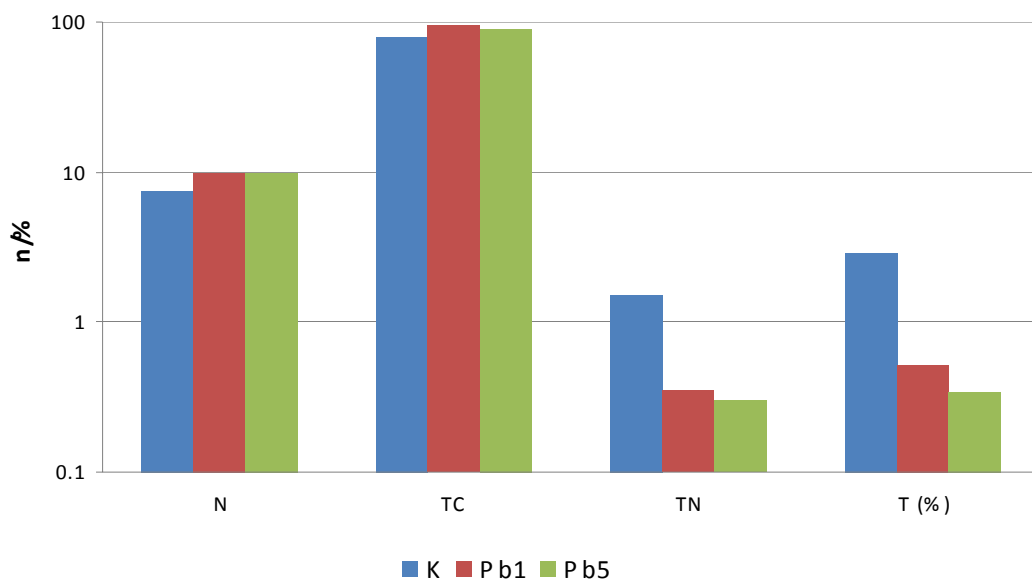
**Tab. 4.2**

**[Vplyv olova na apoptózu králičích embryí]**

	N			TC			TN			T (%)		
	K	Pb1	Pb5	K	Pb1	Pb5	K	Pb1	Pb5	K	Pb1	Pb5
$\bar{x}$	<b>7,5</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>78,6</b>	<b>94,3</b>	<b>91,4</b>	<b>1,533</b>	<b>0,35</b>	<b>0,3</b>	<b>2,889</b>	<b>0,515</b>	<b>0,340</b>
min	7	10	10	42	22	44	0	0	0	0	0	0
max	8	10	10	139	142	152	4	2	1	9,52	2,56	2,27
S.D.	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>35,57</b>	<b>35,02</b>	<b>32,19</b>	<b>1,50</b>	<b>0,572</b>	<b>0,458</b>	<b>3,068</b>	<b>0,835</b>	<b>0,674</b>
C.V. (%)	6,667	0	0	42,25	37,15	35,22	97,80	163,51	152,75	106,18	162,24	168,81

N – počet embryí, TC – celkový počet embryonálních buniek, TN – počet embryonálních buniek pozitivních na apoptózu, T (%) – tunel index, K. – kontrolná skupina bez pridania olova, Pb1 – skupina s koncentraciou olova – 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, Pb5 – skupina s koncentraciou olova – 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, SD – smerodajná odchýlka, C.V. (%) – variačný koeficient

Grafické znázornenie nameraných hodnôt TUNEL analýzy poskytuje Graf 4.2.



**Graf 4.2**

**[Výsledky kvalitatívnych parametrov králičích embryí kultivovaných v rôznych koncentráciách olova]**

## 5 Diskusia

Embryonálny vývoj je veľmi citlivý na pôsobenie viacerých faktorov. Jedným z týchto faktorov sú voľné radikály a s tým súvisiaci vznik oxidačného stresu, ale i ťažké kovy svojimi účinkami môžu vyvolávať závažné poškodenia embrya, čo môže viesť ku vzniku rôznych vývojových chýb. Cieľom našich experimentov bolo stanovenie vplyvu olova na kvalitatívne a antioxidačné ukazovatele králičích embryí kultivovaných *in vitro*.

Podľa doterajších údajov, ťažké kovy predstavujú jednu z najnebezpečnejších skupín škodlivín.

Štúdiu vplyvu cudzorodých látok vonkajšieho prostredia na organizmus zvierat je v ostatnom období venovaná veľká pozornosť. Pri hodnotení účinku cudzorodých látok treba brať do úvahy skutočnosť, že u mnohých z nich sa uplatňuje kumulatívny efekt, t.j. ich negatívny účinok sa prejaví až po dlhšej dobe ich pôsobenia, keď kumulované množstvo danej látky dosiahne určitú koncentráciu (Lukáč et al., 2009).

Posledné štúdie ukazujú, že placenta nie je účinnou bariérou pre ťažké kovy ako je Cd a Pb. Predpokladá sa, že tieto látky prechádzajú cez transplacentárnu bariéru viacerými transportnými mechanizmami ako sú jednoduchá difúzia pre malé molekuly, aktívny transport pre molekuly s hmotnosťou menšou ako 400 000 a pinocytóza pre makromolekuly (Goyer, 1990).

Jedným z najtoxickejších cudzorodých prvkov je kadmium. Jednotlivé štúdie ukázali, že plod môže tolerovať priame injekcie chloridu kademnatého v množstvách vyšších ako sú tie, ktoré prechádzajú placentou po maternálnej injekcii. Priamy účinok kadmia na plod nemá za následok jeho smrť. Levin a Miller (1981) zistili alterácie uteroplacentárneho krvného prietoku ako možný mechanizmus fetálnej toxicity. Z ich experimentov vyplýva, že utero-placentárny krvný prietok sa nelíši od kontrolných hodnôt za 8 – 10 hodín po aplikácii chloridu kademnatého. Po 12 – 16 hodinách sa ale znižuje o 40% a po 18 – 24 hodinách až o 73%. Fetálna úmrtnosť sa zvýšila z 5% na 20%. Decker (1975) popisuje podávanie kadmia gravidným samiciam chrčka a myši intravenózne v rozličných štádiách gestácie. Kadmium podané na 8 deň. sa akumulovalo v primitívnom čreve embryí. Nulové koncentrácie kadmia boli detekované v embryách po podaní na, alebo 9. (chrček) a 11. (myš) dni. Toto zistenie vysvetľuje schopnosť kadmia prejsť z dutiny žltkového vaku do primitívneho čreva, kde je absorbované len pred uzatvorením žltkového spojenia, ale nie skôr. Tento embryonálny príjem môže vysvetľovať rozličné malformácie spôsobené kadmium na 8 deň v porovnaní s 9 dňom (u chrčkov).

Olovo a kadmium sú toxické kovy, ktoré pôsobia toxicky aj pri nízkych expozíciách (Papanikolaou et al., 2005; Soylak et al., 2006). Kobalt a nikel sa na rozdiel od olova, považujú za kovy potrebné v nepatrných množstvách pre organizmus (Kacmar et al., 1999). Kobalt však pri vyšších dávkach pôsobí embryotoxicky a teratogénne a poškodzuje plodnosť (Pedigo et al., 1988; Szakmary et al., 2001; Grasselli et al., 2005).

Okrem kobaltu, významný nárast embryotoxicity sa zaznamenal aj pri 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vyššie koncentrácie ( $>60 \mu\text{M}$ ) boli embryotoxické (Choi et al., 2005).

Vo vzťahu k negatívnemu pôsobeniu kadmia sa pripisuje ochranný účinok aj zinku (Christhi a Rotkiewitz, 1993).

Zvýšenie aktivity intracelulárnych antioxidantných enzýmov nastáva najmä pri vyšších dávkach ťažkých kovov. Zvýšenie aktivity SOD, GPX, KAT a enzýmu glutatiónereduktázy sledovali aj ďalší autori (Kostice et al., 1993; Mahboob et al., 2001). Kostice et al. (1993) sa domnievajú, že tieto zmeny sú pravdepodobne odpoveďou buniek na zvýšenú tvorbu bioreaktívnych foriem kyslíka, vyvolanú dlhodobou intoxikáciou ťažkými kovmi. Viaceré práce naopak ukázali, že aktivita extracelulárnych antioxidantov po intoxikácii ťažkými kovmi sa znižuje (Hijová et al., 2003; Lovasová et al., 2003).

Rovnako aj z výsledkov našich experimentov vyplýva, že priemerné hodnoty antioxidantnej schopnosti plazmy/média sa postupne znižovali vo vzorkách olova, oproti kontrole. Výnimkou bolo stanovenie FRAP, kde sa najvyššia priemerná hodnota feroredukčnej schopnosti plazmy/média dosiahla pri koncentrácii olova  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , kde bola zistená priemerná hodnota  $324,56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Zvýšenie bolo pravdepodobne spôsobené uvoľnením intracelulárnych antioxidantov z poškodených buniek do extracelulárneho priestoru.

Podľa Millera et al. (1993) sa na hodnote TAS podieľa najmä albumín (43%) a kyselina močová (33%), v menšej miere vitamín C (9%), vitamín E (3%) a ostatné antioxidanty. Keďže kadmium aj ortuť sú známe svojou vysokou afinitou k SH skupinám (Zalups a Lash, 1996, Patra et al., 1999) zníženie TAS bolo najmä dôsledkom vyčerpania voľných SH skupín extracelulárnych antioxidantov (albumín, glutatión).

Pri našom stanovení TAS sme taktiež pozorovali pokles aktivity pri vzorkách olova, pričom sme zistili, že priemerná hodnota pri vzorke Pb1 (OLOVO s koncentráciou  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) bola  $0,057 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  a pri vzorke olova Pb5 (OLOVO s koncentráciou  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) bola zistená priemerná hodnota  $0,046 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , v porovnaní s kontrolou, kde bola zistená najvyššia hodnota aktivity  $0,086 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Na základe porovnania týchto výsledkov môžeme predpokladať, že pokles aktivity môže byť spôsobený vyčerpaním antioxidantov

z extracelulárneho priestoru ako súčasť obrany organizmu pred oxidačným poškodením (Lovásová et al., 2006).

Okrem toho, že ťažké kovy vyvolávajú mnoho poškodení, môžu spôsobovať aj apoptózu, čiže programovanú smrť buniek. Z našich výsledkov je zaujímavé, že u králičích embryí vystavených olovu sa apoptóza na základe využitia TUNEL analýzy neprejavila, hoci u embryí, ktoré boli vystavené pôsobeniu olova došlo k porušeniu *zona pellucidy* a k zmenám v štruktúre blastomér. Na základe stanovenia Tunel – indexu (%) vyplýva, že hoci nedošlo k apoptóze, každá vzorka obsahovala aspoň jednu embryonálnu bunku pozitívnu na apoptózu, pričom pri oboch vzorkách olova boli zistené nižšie hodnoty TN, oproti kontrole, kde sa dosiahla najvyššia priemerná hodnota 1,533.

Rovnako zanedbateľnú pozitívitu pozorovali Antezak a Van Blerkom (1999) u nepozastavených fragmentovaných ľudských embryí medzi 2- až 8- bunkovým štádiom. Pozorovali sa i jadrá označené TUNEL-om v 16 z 21 fragmentovaných embryí pre 8- bunkovým štádiom.

Okrem ľudských embryí znaky apoptózy boli pozorované na embryách hovädzieho dobytku kultivovaných *in vitro* (Byrne et al., 1999; Makarevich a Markkula, 2002). Byrne et al. (1999) analyzovali výskyt apoptóz pri embryách hovädzieho dobytku v štádiu blastocysty a v štádiách predchádzajúcich blastocyste. Znaky apoptózy boli pozorované v 9 až 16- bunkovom štádiu vývoja, výskyt sa znižoval v štádiu moruly a opäť vzrástol v štádiu blastocysty. Index bunkovej smrti pri blastocystách 7. dňa bol v negatívnej korelácii s celkovým počtom buniek, percentuálne sa pohyboval v rozmedzí 1 až 10%. V práci Fabian et al. (2008) sa uvádza, že aktinomycín D spomalil embryonálny rast a vyvolal skorší výskyt niektorých apoptotických znakov (od 6-bunkového štádia králikov), no vo všeobecnosti len minimálne zvýšil incidenciu apoptotických embryí alebo buniek. Najnižšiu citlivosť na prítomnosť chemických induktorov vykazovali embryá v 2- bunkovom štádiu.

Na základe týchto výsledkov, ale i výsledkov, ktoré sa uvádzajú v našej práci možno predpokladať, že embryá, ktoré mali vyššiu vývojovú rýchlosť, preukazovali výrazne nižší počet apoptotických buniek v porovnaní s pomalšie sa deliacimi embryami (Makarevich a Markkula, 2002).



## 6 Záver

V predkladanej diplomovej práci sme sledovali vplyv olova na jednotlivé ukazovatele *in vitro* kultivovaných králičích embryí. Na základe dosiahnutých výsledkov sme zistili, že:

- najvyššie priemerné hodnoty FRAP sa zistili vo vzorke média Pb1 (olovo s koncentráciou  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde sa stanovila hodnota  $324,56 \pm 272,29 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , mierny pokles priemernej hodnoty bol zistený v kontrolnej skupine, ktorej hodnota bola  $301,75 \pm 164,95 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ , najnižšia hodnota sa zistila vo vzorke média Pb5 (olovo s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde bola zaznamenaná hodnota  $124,44 \pm 122,11 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$
- celková antioxidačná kapacita médií dosahovala veľmi nízke hodnoty vo všetkých sledovaných vzorkách
- najnižšia priemerná hodnota TAS bola zistená v mediách, kde bolo olovo s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , priemerná hodnota TAS  $0,046 \pm 0,006 \text{ mmol.L}^{-1}$ , mierny nárast antioxidačnej kapacity bol zistený v mediách, kde bolo olovo s koncentráciou  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  a najvyššia priemerná hodnota TAS sa zistila v kontrolnej skupine, bez prídania olova, kde hodnota predstavovala  $0,086 \pm 0,009 \text{ mmol.L}^{-1}$
- koncentrácie albumínu boli na úrovni detegovania
- hodnoty vzoriek koncentrácie albumínu klesali od kontrolnej skupiny smerom k médiám s prídavkom olova, z čoho vyplýva, že najnižšia hodnota sa stanovila vo vzorke média Pb5 (olovo s koncentráciou  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), kde sa zistila priemerná hodnota  $1,350 \pm 0,166 \text{ g.L}^{-1}$
- olovo v sledovaných koncentráciách nespôsobovalo (nevyvolalo) apoptózu detegovanú TUNEL metódou
- celkový počet embryonálnych buniek experimentálnych skupín (Pb1, Pb5) bol vyšší ako v kontrolnej skupine, kde sa zistila najnižšia priemerná hodnota  $78,6 \pm 35,57$

## 7 Použitá literatura

- ACKER, Steven A. van et al. 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. In *Biochem. Pharmacol.*, roč. 56, 1998, č. 8, s. 935-943.
- 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 – 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. 1-27. ISSN 1477-7827.
- 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.
- AHERNE, Aisling S. - O'BRIEN, Nora M. 2002. Dietary flavonols. In *Chemistry, food content and metabolism*, roč. 18, 2002, s. 75-81.
- ALVAREZ, Juan G. 2003. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. In *Minerva Ginecol*, roč. 55, 2003, s. 233-239.
- ANTEZAK, M. – VAN BLERKOM, J. 1999. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. In *Hum. Reprod.*, roč. 14, 1999, s. 429-447.
- ATTARAN, Marjan et al. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. In *Int J Fertil Womens Med*, roč. 45, 2000, s. 314-320.
- AYDIN, Sanli et al. 2004. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. In *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, roč. 113, 2004, s. 21-25.
- BARAN, V. et al. 1997. Nucleolar substructures of rabbit cleaving embryo: an immunocytochemical study. In *Molecular Reproduction and Development*, roč. 48, 1997, č. 1, s. 34-44.

- BARZILAI, Ari – YAMAMOTO, Ken-Ichi. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. In *DNA Repair (Amst)*, roč. 3, 2004, s. 1109-1115.
- BECKMAN, Joseph S. – KOPPENOL, Willem H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. In *Amer. J. Physiol.*, roč. 271, 1996, č. 5, s. 1424-1437. ISSN 0002-9513.
- BENZIE, Iris F. F. – STRAIN, John J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. In *Analytical Biochemistry*, roč. 239, 1996, s. 70-76.
- BURTON, GJ. et al. 2003. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. In *Reprod Biomed Online*, roč. 6, 2003, s. 84-96.
- BYRNE, A. T. et al. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. In *J. Reprod. Fert.*, roč. 117, 1999, s. 97-105.
- CARUSO, Alessandro et al. 1996. Chronic hypertension in pregnancy: color Doppler investigation of uterine arteries as a predictive test for superimposed preeclampsia and adverse perinatal outcome. In *J. Perinat. Med.*, roč. 24, 1996, s. 141-153.
- CATT, James W. – HENMAN, Michael. 2000. Toxic effect of oxygen on human embryo development. In *Hum Repris.*, roč. 15, 2000, s. 199-206.
- De LAMIRANDE, Eve – LECLERC, Pierre – GAGNON, Claude. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. In *Mol Hum Reprod.*, roč. 3, 1997, s. 175-194.
- DECKER, L. 1975. In *J. Reprod. Fert.*, roč. 44, 1975, s. 461-471.
- DLUGOŠOVÁ, Katarína – PŠENÁKOVÁ, Ivana. 2004. Antioxidačné účinky vybraných sekundárnych metabolitov. In *Nova Biotechnologica*, roč. 4, 2004, č. 1, s. 185-195. ISBN 80-89034-79-9.
- DONALDSON, W. E. – KNOWLES, S. O. 1993. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? In *Comp. Biochem. Physiol.*, roč. 104C, 1993, s. 377-379.
- DUMOULIN, Jean-Claude et al. 1999. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. In *Hum Reprod*, roč. 14, 1999, č. 2, s. 465-469.
- ĎURAČKOVÁ, Zdena et al. 1999. *Voľné radikály a antioxidanty v medicína (II)*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1999. 315 s. ISBN 80-88908-46-9.
- ĎURAČKOVÁ, Zdena. 1998. *Voľné radikály a antioxidanty v medicína (I)*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1998. 285 s. ISBN 80-88908-11-6.

- EDWARDS, Marilyn J. 1998. Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? In *Cell Stress Chaperones*, roč. 3, 1998, č. 4, s. 213-220.
- FABIAN, Dušan et al. 2008. Apoptóza ako mechanizmus adaptácie preimplantačného embrya a na nepriaznivé vplyvy prostredia. In *Smolenice 2008 : XIII Dni živočíšnej fyziológie*, 2008, s. 1.
- FERENČÍK, Miroslav et al. 1997. *Zápal, horúčka, bolesť*. Bratislava : SAP, 1997. 215 s. ISBN 80-85665-81-6.
- GARDINER, CS. – REED, DJ. 1994. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. In *Biol Reprod.*, roč. 51, 1994, s. 1307-1314.
- GEURIN, Patrice – EL MOUATASSIM, Sarah – MENEZO, Yves. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. In *Hum Reprod Update*, roč. 7, 2001, s. 175-189.
- GOYER, Richard A. 1990. Transplacental transport of lead. *Environ Health Persp.* B.m. : B.v., roč. 89, 1990, s. 101-105.
- GRASSELLI, Francesca et al. 2005. In *Reprod. Fertil. Develop.*, roč. 17, 2005, s. 715-720.
- GREGUŠKA, Ondrej. 1997. Kyslíkové radikály, oxid dusnatý a antioxidačný systém v kľboch postihnutých zápalom. In *Piešťany : VÚRCH*, roč. 11, 1997, č. 3, s. 161-166.
- GRUPEN, Christopher G. et al. 1995. Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. In *Biol Reprod.*, roč. 53, 1995, s. 173-178.
- GUPTA, Sajal et al. 2006. The Impact of Reactive Oxygen Species on Early Human Embryos. In *A Systematic Review of the Literature*.
- GUYADER-JOLY, Catherine et al. 1998. Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. In *Amino Acids.*, roč. 15, 1998, s. 27-42.
- HALLIWELL, Barry – WASIL, M. – GROOTVELD, M. 1987. Biologically-significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. In *FEBS Lett*, roč. 213, 1987, s. 15 -18.
- HALLIWELL, Barry. 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. In *Ann Rheum Dis*, roč. 54, 1995, s. 505 -510.
- HARMA, M. – EREL, O. 2005. Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. In *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, roč.

118, 2005, s. 47-51.

HARVEY, Alexandra J. – KIND, KL. – THOMPSON, JG. 2002. REDOX regulation of early embryo development. In *Reproduction*, roč. 123, 2002, s. 479-486.

HIJOVÁ, Emília et al. 2003. The effect of chronic cadmium exposure on antioxidant status in rast. In *IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, s. 453-456.

HOLLEY, A. E. – CHEESEMAN, K. H. 1993. Measuring free radical reactions in vivo. In *K.H. Cheeseman, T.F. Slater (eds.): Free radicals in medicine*, 1993, s. 494-505.

CHOI, W. – ZHANG, X. – SHARMA, R. K. et al. 2005. Effect of oxidative stress on mouse oocyte cytoskeleton and embryo development. In *Cleveland Clinic Foundation*, 2005, č. 342.

CHRENEK, Peter et al. 2006. *Produkcia a analýza transgénnych králikov*. Nitra : SCPV, 2006. s. 237. ISBN 80-88872-54-5.

CHRENEK, Peter. 2008. *Genetické manipulácie s embryami*. Prep. vyd. Nitra : SCPV, 2008. 98 s. ISBN 978-80-88872-79-5.

CHRISTI, M. A. – ROTKIEWITZ, T. 1993. In *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, roč. 12, 1993, s. 35-45.

JURISICOVA, Andrea – VARMUZA, Susannah - CASPER, Robert F. 1996. Programmed cell death and human embryo fragmentation. In *Mol Hum Reprod.*, roč. 2, s. 93-98.

KACMAR, P. – PISTL, J. – MIKULA, I. 1999. In *Acta Vet. Brno*, roč. 68, 1999, s. 57-79

KALOUSOVÁ, Marta et al. 2006. *Patobiochemie ve schématech*. Praha : Grada Publishing, 2006. 264 s. ISBN 80-247-1522-8.

KIMÁKOVÁ, Tatiana. 2002. *Histochemická detekcia radikálového poškodenia mozgu po jehi ischemickom a reperfúznom poškodení : projekt dizertačnej práce*. Košice : Univerzita veterinárskeho lekárstva, 2002. 35 s.

KITAGAWA, Y. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. In *Theriogenology*, roč. 62, 2004, s. 1186-1197.

KNOTT, L. et al. 2003. Homocysteine oxidation and apoptosis: a potential cause of cleft palate. In *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, roč. 39, 2003, s. 98-105.

KOPECKÝ, Š. – ČERNÝ, J. – KOPECKÁ, I. 2003. *Základy anatómie človeka*. Tranava : SAP, 2003. ISBN 80-85665-61-1.

- KOSTICE, 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 – VALENT, M. – KOLLÁROVÁ, E. 1996. *Fyziológia zvierat*. 2. upr. vyd. Nitra : VŠP, 1996. 274 s.
- KOVÁČIK, Jaroslav et al. 2000. *Rizikové faktory potravinového reťazca človeka*. Nitra : SPU, 2000. 143 s. ISBN 80-7137-796-1.
- LAURINČÍK, Ján et al. 2000. Nucleolar proteins and nuclear ultrastructure in preimplantation bovine embryos produced in vitro. In *Biology of Reproduction*, roč. 62, 2000, č. 4, s. 1024-1032.
- LEVIN, A. A. – MILLER, R. K. 1981. In *Toxicol. Environ. Health*, roč. 34, 1981, s. 297-306.
- LOCKITCH, G. 1993. Perspectives on lead toxicity. In *Clin. Biochem.*, roč. 26, 1993, s. 371-381.
- LOVÁSOVÁ, E. – ŠIPULOVÁ, A. – RÁCZ, O. 2003. Vplyv intoxikácie kadmiumom a ortuťou na celkovú antioxidantnú 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. et al. 2006. Vplyv gama žiarenia na celkovú antioxidantnú kapacitu plazmy u kurčiat. In *Rizikové faktory potravinového reťazca : zborník vedeckých prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 214-216. ISBN 80-8069-760-4.
- LUKÁČ, Norbert et al. 2009. Vplyv toxických kovov na imunitný systém. In *Potravinárstvo*, roč. 3, 2009, č. 3, s. 35-38. ISSN 1338-0230.
- MAHBOOB, M. et al. 2001. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. In *J Environ Sci Health B*, roč. 36, 2001, s. 687-697.
- MAKAREVICH, Alexander V. – MARKKULA, M. 2002. Apoptosis and proliferation potential maturation and culture. In *Biol. Reprod.*, roč. 66, 2002, s. 386-392.
- MAKAREVICH, Alexander V. et al. 2008. Apoptosis detection as a tool for the determination of animal embryo quality. In *Slovak J. Anim. Sci.*, roč. 41, 2008, č. 4, s. 153-159. ISBN 1335-3683.
- MAKHAIL, MS. et al. 1994. Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma

levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. In *Am J Obstet Gynecol*, roč. 171, 1994, s. 150-157.

MARIASSY, Antonia. 2006. *Voľné radikály a oxidačný stres*. [online]. B. m. : b. v., [cit. 2007-04-07]. Dostupné na:

<http://eastlabs.biz/article/451/SID=tf9fsa4ujqmerc6hcul5v020u2>.

MASARYKOVÁ, Jarmila. 2008. *Voľné radikály a intrauterinný vývoj jedinca : bakalárska práca*. Nitra : SPU, 2008. 43 s.

MASSÁNYI, Peter et al. 2004. *Fyziológia bunky*. Nitra : SPU, 2004. 147 s. ISBN 80-8069-443-5.

MEIER, P. – FINCH, A. – EVAN, G. 2000. Apoptosis in development. In *Nature*, roč. 407, 2000, s. 796-801.

MENCK, M. C. et al. 1997. Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs *in vitro* two different coculture systems. In *Reprod. Nutr. Dev.*, roč. 37, 1997, s. 141-150.

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.

MOJŽIŠ, J. – MOJŽIŠOVÁ, G. 2001. *Flavonoidy a ich biologické účinky*, Košice : Viena, 2001. 134 s.

MUCHOVÁ, J. et al. 2004. *Lekárska chémia a toxikológia*. Bratislava : UK, 2004. 152 s. ISBN 80-223-1934-1.

NEGOESCU, Andreea et al. 1996. In situ apoptotic labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. In *J. Histochem. Cytochem.*, 1996, roč. 44, s. 959-968.

NEGOESCU, Andreea et al. 1998. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. In *Biomed. Pharmacother.*, 1998, roč. 52, s. 252-258.

NORDBERG, Gunnar F. et al. 2007. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press/Elsevier, 2007. 975 s.

OLXIKOVÁ, Lucia. 2009. *Vplyv hypertermie na vývoj preimplantačných embryí hospodárskych zvierat : dizertačná práca*. Nitra : SPU, 2009. 91 s.

PAPANIKOLAOU, N. C. – HATZIDAKI, E. G. – BELIVANIS, S. 2005. In *Med. Sci. Monit.*, roč. 11, 2005, s. 329-336.

- PATRA, R. C. – SWARUP, D. – SENAPATI, S. K. 1999. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue in rats. In *Vet. Hum. Toxicol.*, roč. 42, 1999, s. 65-67.
- PEDIGO, N. G. – GEORGE, W. J. – ANDERSON, M. B. 1988. In *Reprod. Toxicol.*, roč. 2, 1988, s. 45-53.
- PIVKO, J. – GRAFENAU, P. – SOKOL, J. 2000. *Prenos raných embryí zvířat*. Nitra : VÚŽV, 2000. 212 s. ISBN 80-7148-038-X.
- PIVKO, Juraj et al. 1988. *Transplantácia včasných embryí hospodárskych zvierat. Súčasnosť a perspektívy*. Nitra : VÚŽV, 1988. 108 s.
- PIVKO, Juraj. 1995. *Morfogenéza oocytov a raných embryí niektorých živočíchov*. Bratislava : Slovak Academic Press, 1995. 113 s. ISBN 80-85665-53-0.
- RACEK, Jaroslav – HOLEČEK, Václav. 1999. Enzýmy a volné radikály. In *Chemické listy*, roč. 93, 1999, č. 12, s. 774-780. ISSN 1213-7103.
- RACEK, Jaroslav. 2003. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Praha : Galén, 2003. 90 s. ISBN 80-7262-231-5.
- SHARMA, Rakesh K. – AGARWAL, Ashok. 2004. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. In *Reproductive Medicine and Biology*, roč. 3, 2004, s. 177-199.
- SCHUBERT, E. 1991. *Fyziológia živočíchov*. Osveta, 1991. 287 s. ISBN 80-217-0333-4.
- SKULACHEV, Vladimír P. 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. In *FEBS Lett.*, roč. 423, 1998, s. 275-280.
- SOVA, V. et al. 1981. *Fyziologie hospodárskych zvierat*. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1981. 512 s.
- SOYLAK, M. et al. 2006. In *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, roč. 76, 2006, s. 436-441.
- SQUADRITO, Giuseppe L. – PRYOR, William A. 1998. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. In *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 25, 1998, s. 392-403.
- STAUNTON, MJ. – GAFFNEY, EF. 1998. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. In *Arch. Pathol. Lab. Med.*, roč. 122, 1998, s. 310-319.
- SURAI, P.F. 2002. Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction. In *Nottingham University Press*. U.K.
- SZAKMARY, E. et al. 2001. In *J. Toxicol. Environ. Health.*, roč. A62, 2001, s. 367-86.
- ŠTÍPEK, Stanislav et al. 2000. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha : Grada Publishing, 2000. 326 s. ISBN 80-7169-704-4.
- TAKAGI, Yuichiro et al. 2004. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in



- the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. In *Virchows Arch*, roč. 444, 2004, s. 49-55.
- TARIN, Juan J. et al. 1998. Dithiotreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro. In *Hum. Repris.*, roč. 4, 1998, s. 281-288.
- THOMPSON, Edward M. 1996. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. In *Reproduction Nutrition and Development*, roč. 36, 1996, s. 619-635.
- TOMÁNEK, M. – KOPEČNÝ, V. – KANKA, J. 1989. Genome reactivation in developing early pig embryo: an ultrastructural and autoradiographic analysis. In *Anatomy and Embryology*, roč. 180, 1989, s. 309-316.
- YOUNGSON, R. 1995. *Antioxidanty cesta ke zdraví : jak odstranit vliv volných radikálů*. Brno : Jota, 1995. 143 s. ISBN 80-85617-56-0.
- ZACHAR, Dušan et al. 2004. *Humánna výživa II*. Zvolen : TU, 2004. 218 s. ISBN 80-228-1293-5.
- ZALUPS, R. K. – LASH, L. H. 1996. Interaction between glutathione and mercury in the kidney, liver and blood. In *Chang, L. W., Magos, L., Suzuki, T.: Toxicology of Metals*. CRC Press Inc., 1996, s. 145-163.