

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Katedra fyziológie živočíchov

**Vplyv niklu na štruktúru a funkciu pohlavných buniek  
v podmienkach *in vitro***

Autoreferát dizertačnej práce  
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor  
v doktorandskom vednom odbore: 29-07-9 biotechnológia

Ing. Jiřina Kročková

Nitra, 2008

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre fyziológie živočíchov Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Jiřina Kročková  
Katedra fyziológie živočíchov  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: doc. MVDr. Peter Massányi, PhD.  
Katedra fyziológie živočíchov  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: prof. MVDr. Ján Danko, PhD.  
Katedra anatómie, histológie a fyziológie  
Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

doc. RNDr. Alena Vollmanová, PhD.  
Katedra chémie  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

h. doc. RNDr. Alexander Sirotkin, DrSc.  
Ústav genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat  
Výskumný ústav živočíšnej výroby  
Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Nitra

Autoreferát bol odoslaný dňa .....2008

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra fyziológie živočíchov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa .....2008 o ..... h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 29-07-9 biotechnológia na Fakulte biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, vymenovanou predsedom OK.

Miesto konania: Katedra fyziológie živočíchov  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: .....

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva.

Predseda komisie pre obhajoby vedného odboru 29-07-9 biotechnológia:

prof. Ing. Ivan Michalík, DrSc.  
FBP SPU Nitra

## ABSTRAKT

Nikel je prirodzene sa vyskytujúci prvok, ktorý môže existovať v rôznych minerálnych formách. Je používaný v širokom rade aplikácií, zahrňujúcich metalurgické procesy a elektrické súčasti, ako sú napríklad batérie. Je preukázané, že nikel môže nepriaznivo ovplyvňovať reprodukčný systém. **Cieľ:** Cieľom našich *in vitro* experimentov bolo študovať účinky niklu ( $\text{NiCl}_2$ ) na produkciu pohlavných hormónov (testosterón, progesterón), na životaschopnosť, ultraštruktúru a apoptózu Leydigových a folikulových buniek. **Metódy:** Leydigove bunky boli izolované mechanickou disociáciou bez použitia enzýmov zo semenníkov NMRI myši. Bunky boli kultivované 48 hodín a následne bolo médium nahradené novým médiom rovnakého zloženia s prídavkom  $\text{NiCl}_2$ , ktorý sme rozpustili v médiu na požadované koncentrácie (15, 31, 62, 125, 250, 500 a 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) alebo bez prídavku  $\text{NiCl}_2$  v kontrolnej skupine. Po 48-hodinovej kultivácii sme merali hladinu testosterónu v kultivačnom médiu enzýmoimunoanalýzou (ELISA). Životaschopnosť Leydigových buniek sme hodnotili pomocou mitochondriového toxického testu (MTT). Folikulové bunky sme získali z vaječníkov ošípaných plemena slovenská biela ušľachtilá. Bunky sme aspirovali zo stredne veľkých folikulov (3 – 5 mm) a separovali z folikulovej tekutiny centrifugáciou. Po 48 hodinách kultivácie sme nahradili kultivačné médium novým médiom rovnakého zloženia s prídavkom  $\text{NiCl}_2$  (62,5; 125; 250; 500 a 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Kontrolná skupina bola bez prídavku  $\text{NiCl}_2$ . Kvantifikáciu progesterónu sme previedli rádioimunoanalýzou (RIA). Vizualizáciu apoptózy Leydigových a folikulových buniek sme uskutočnili TUNEL metódou. Pre hodnotenie ultraštruktúry Leydigových a folikulových buniek sme po kultivácii s niklom alebo bez neho separovali, fixovali, dehydrovali bunky a zaliali do epoxidovej živice. Ultratenké rezy sme zafarbili a pozorovali pod mikroskopom. **Výsledky:** Životaschopnosť Leydigových buniek meraná farbením trypanovou modrou sa znižovala po prídavku 250 a viac  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Najnižšia životaschopnosť bola po pridaní najvyššej koncentrácie 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Metódou ELISA sme zistili pokles produkcie testosterónu priamoúmerne od koncentrácie  $\text{NiCl}_2$ . Meraním hladiny progesterónu sme pozorovali signifikantný pokles v závislosti od zvyšovania koncentrácií  $\text{NiCl}_2$ . TUNEL metódou sme zistili signifikantný nárast množstva apoptotických Leydigových a folikulových buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou. Hodnotením ultraštruktúry Leydigových a folikulových buniek sme zistili znižovanie zastúpenia hladkého endoplazmatického retikula a mitochondrií po pridaní najvyšších koncentrácií  $\text{NiCl}_2$ . Taktiež došlo k znižovaniu až vymiznutiu heterochromatínu jadra v závislosti od zvyšovania koncentrácie  $\text{NiCl}_2$  v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naopak, pozorovali sme zvýšené zastúpenie euchromatínu. Ďalej došlo k vytváraniu tzv. prázdnych miest v bunkách v podobe tukových kvapôčok a vakuol v závislosti od zvyšovania koncentrácie  $\text{NiCl}_2$ . U folikulových buniek sme sledovali aj zvýšenie výskytu mikrofilamentov v cytoplazme. **Záver:** Naše výsledky jednoznačne dokazujú negatívny účinok  $\text{NiCl}_2$  na steroidogézu ako aj životaschopnosť, ultraštruktúru a apoptózu Leydigových a folikulových buniek v podmienkach kultivácie *in vitro* ako možnosti využitia kultivačných metód pre

sledovanie fyziologických procesov prebiehajúcich v bunkách separovaných zo živých organizmov.

## ABSTRACT

Nickel is a naturally occurring element that may exist in various mineral forms. It is used in a variety of applications including metallurgic process and electrical components, such as batteries. It is known, that nickel may affect adversely on the reproductive system. **Aim:** The aim of our *in vitro* experiments was to study the effects of nickel ( $\text{NiCl}_2$ ) on production of sexual hormones (testosterone, progesterone), cell viability, ultrastructure and the occurrence of apoptosis in Leydig and follicular (granulosa) cells. **Methods:** Leydig cells were isolated by mechanical dissociation without enzyme treatment from testes of NMRI mice. The cells were cultured for 48 hours and subsequently the medium was replaced with new medium of the same composition containing, in addition,  $\text{NiCl}_2$ . Immediately before experiment,  $\text{NiCl}_2$  was dissolved in incubation medium to required concentrations (15, 31, 62, 125, 250, 500 or 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) or without  $\text{NiCl}_2$  for the control group. After 48 h culture, the testosterone production was analyzed using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) directly from aliquots of the medium. Cell viability after nickel administration was assessed by a metabolic activity (MTT) assay. Granulosa cells were collected from the ovaries of non-cycling Slovakian white gilts, aspirated and separated from the follicular fluid by centrifugation. After 2 days of preculture the medium was replaced with new medium of the same composition containing with addition of  $\text{NiCl}_2$  (62.5; 125; 250; 500 and 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Control group medium contained any  $\text{NiCl}_2$ . Quantification of progesterone was performed directly from aliquots of the media from control and treated porcine granulosa cells by RIA. For visualisation of Leydig and granulosa cells apoptosis the TUNEL method using Mebstain apoptosis kit Direct was used. Ultrastructure of Leydig and granulosa cells was studied after culture with  $\text{NiCl}_2$  or without nickel using transmission electron microscopy. **Results:** The viability of Leydig cells measured using Trypan blue staining test decreased after addition of  $\geq 250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{NiCl}_2$ . The lowest viability was detected after addition of 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{NiCl}_2$ . In the 48-h Leydig cell cultures concentration dependent depression of testosterone production was detected. The lowest level of testosterone was detected after administration of 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{NiCl}_2$ . The highest production of progesterone was found in the control group and after  $\text{NiCl}_2$  administration a dose-dependent significant decrease of progesterone production was detected. The lowest progesterone production was after addition of 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{NiCl}_2$ . TUNEL analysis demonstrated that significant proportion of both, granulosa and Leydig cells at the end of culture had visible signs of apoptosis in comparison with the control group. Also the ultrastructure of Leydig and granulosa cells was altered after  $\text{NiCl}_2$  administration. We observed higher incidence of euchromatin in nuclei, lipid drops, microfilaments and vacuoles in cytoplasm after  $\text{NiCl}_2$  treatment. There was also relatively lower presence of mitochondria and smooth endoplasmic reticulum. **Conclusion:** Our findings clearly suggest a negative effect of  $\text{NiCl}_2$  on steroidogenesis as well as on the viability,

ultrastructure and apoptosis of Leydig and granulosa cells.

## **POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY**

**Agn** – antigén

**BSA** – bovine serum albumin (hovädzí sérový albumín)

**CO<sub>2</sub>** – oxid uhličitý

**DHA** – dehydroizoandrosterón

**ELISA** – enzýmoimunoanalýza

**EMEM** – eagle's minimal essential medium (vaječné médium poskytujúce základné živiny)

**FBS** – fetálne bovinné sérum

**FCS** – fetal calves serum (fetálne teľacie sérum)

**HCl** – kyselina chlorovodíková

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peroxid vodíka

**IU** – international unit

**LB** – Leydigove bunky

**MTT** – mitochondriový toxický test

**NAD** – nicotinamide adenine dinucleotid (nikotínamid adenín dinukleotid)

**NaNO<sub>3</sub>** – dusičnan sodný

**NBT** – nitro blue tetrazolium

**Ni** – nikel

**NiCl<sub>2</sub>** – chlorid nikelnatý

**PBS** – phosphate buffer saline (fosfátový tlmivý roztok)

**PFA** – paraformaldehyd

**RIA** – rádioimunoanalýza

**TdT** – terminal deoxynucleotidyl transferase

**TMB** – tetramethyl benzidine

**TUNEL** – TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method

**3-β-HSD** – 3-β-hydroxysteroid dehydrogenáza

# OBSAH

ÚVOD.....	
1 CIEĽ PRÁCE.....	
2 MATERIÁL A METÓDY.....	
2.1 Pôvod, izolácia a inkubácia (kultivácia) buniek.....	
2.1.1 Zvieratá.....	
2.2 Stanovenie cytotoxicity.....	
2.3 Stanovenie testosterónu a progesterónu.....	
2.3.1 Kvantifikácia testosterónu.....	
2.3.2 Kvantifikácia progesterónu.....	
2.4 Stanovenie apoptotických zmien.....	
2.5 Elektronová mikroskopia.....	
2.6 Štatistické vyhodnotenie výsledkov.....	
3 VÝSLEDKY A ZÁVERY.....	
3.1 Leydigove bunky.....	
3.1.1 Prejavy cytotoxicity.....	
3.1.2 Koncentrácia testosterónu.....	
3.1.3 Vyhodnotenie apoptotických zmien.....	
3.1.4 Ultraštruktúra Leydigových buniek.....	
3.2 Folikulové bunky.....	
3.2.1 Koncentrácia progesterónu.....	
3.2.2 Vyhodnotenie apoptotických zmien.....	
3.2.3 Ultraštruktúra folikulových buniek.....	
4 POUŽITÁ LITERATÚRA.....	
5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU.....	

## ÚVOD

Jedným zo základných prejavov živej hmoty je rozmnožovanie. Hoci orgány, ktoré zabezpečujú túto funkciu nie sú nevyhnutne potrebné pre existenciu organizmu, sú nepostrádateľné pre zachovanie druhu. Toto poslanie je hlavným životným cieľom každého organizmu na Zemi. V cieľavedomej práci človeka však rozmnožovanie zvierat má významnú úlohu z dôvodu zabezpečenia dostatku potravy živočíšneho pôvodu pre ľudskú populáciu. Je preto dôležité poznať vzájomné vzťahy jednak v rámci funkcie pohlavných orgánov, ale tiež vzťahy s vonkajším prostredím a jeho faktormi, ktoré by prípadne mohli negatívne ovplyvniť ich správnu činnosť. Tieto faktory môžu ohroziť zabezpečovanie kvalitného potomstva pre ďalšie využitie.

Dôležitým ekologickým fenoménom najmä druhej polovice 20. storočia je skutočnosť, že človek musí koexistovať s nadmerným množstvom chemických látok od začiatku embryonálneho vývoja až po smrť. S rastúcim stupňom znečistenia životného prostredia sa záujem o dôsledky pôsobenia toxických látok na živé systémy zvyšuje. Keď sa ióny kovu dostanú do organizmu, vstupujú do interferencie s metabolickými dráhami, prípadne sa ukladajú v rôznych tkanivách a orgánoch. Problém je v tom, že ťažké kovy zvieratá a človek svojimi zmyslami v potrave nie sú schopní priamo rozpoznať a preto sa prijímaniu takýchto látok nevedia priamo a bezprostredne brániť. Človek sa musí spoliehať na celospoločenskú ochranu, ktorá okrem iného spočíva v monitorovaní výskytu týchto látok v životnom prostredí všeobecne a špeciálne v potravovom reťazci.

Reprodukčný proces závisí na komplexnom rade biologických vzťahov zahrňujúcich mnoho orgánov, typov buniek, typov molekúl ako aj presnú časovú a priestorovú koordináciu procesov. Nie je preto prekvapujúce, že tento zložitý biologický systém je zraniteľný rozličnými environmentálnymi faktormi, fyzikálnymi ako aj chemickými. Tieto môžu ohroziť zabezpečovanie kvalitného potomstva pre ďalšie využitie. Medzi faktory, ktorých je veľké množstvo, patria aj ťažké kovy. Ťažké kovy sú definované ako kovy, ktorých špecifická hmotnosť je väčšia ako  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Väčšina z nich je pre organizmus škodlivá. Mnohé sú toxické pre človeka, zvieratá ale aj rastliny. Sú schopné sa v organizme ukladať a akumulovať, čo zvyšuje ich toxický účinok.

Kovy, pokiaľ sa nachádzajú vo vodách v stopových množstvách, sú prirodzeného pôvodu. Hlavným zdrojom znečistenia recipientov kovmi sú odpadové vody z ťažby a spracovania rúd, hüt, z povrchovej úpravy kovov, fotografického, textilného priemyslu a iných odvetví. Ďalším zdrojom môžu byť atmosférické zrážky znečistené exhaláciami vznikajúcimi pri spaľovaní fosílnych palív a výfukovými plynmi motorových vozidiel.

Monitoring cudzorodých látok spôsobujúcich reprodukčné poruchy je dnes jedným z najdynamickejších sa rozvíjajúcim vedeckým odvetvím. Medzi ťažké kovy ktoré negatívne ovplyvňujú

reprodukcii patrí aj nikel. V organizme sa podieľa na zabezpečení stability bunkových membrán a ovplyvňuje produkciu niektorých hormónov. Je tiež kofaktorom rôznych mikrobiálnych enzýmov.

Regulačný mechanizmus interakcie zložiek je extrémne citlivý na environmentálne zmeny, nakoľko mnohé látky dokážu meniť rovnováhu. Všeobecne sa pohlavné orgány považujú za veľmi citlivý barometer zmien v organizme i človeka, keďže tieto orgány sú poškodzované skôr ako iné najmä životne dôležité orgány. Znalosť fyziológie regulačných mechanizmov nám umožňuje pochopiť možný mechanizmus toxicity rozličných látok a týmto smerom je možný aj vývoj odpovedajúcej liečby. V semenníkoch dochádza najčastejšie k degenerácii semenotvorného epitelu, k strate kontaktu s bazálnou membránou ako aj k poruchám vývoja spermií. U samíc sa účinky ťažkých kovov najčastejšie prejavujú vo zvýšenej atrézii folikulov vo vaječníkoch ako aj zmenami stavby endometria matrice. Mnohé ťažké kovy výrazne negatívne ovplyvňujú steroidogézu.

Riešená dizertačná práca je súčasťou projektu vedeckej grantovej agentúry (VEGA) Ministerstva školstva SR 1/2417/06 „Rizikové faktory potravinového reťazca ovplyvňujúce zdravie zvierat a človeka“; 1/0696/08 „Rizikové faktory potravinového reťazca živočíchov – kontaminácia a prejavy toxicity in vitro“ a projektu APVV–0299–06 „Environmentálne faktory ovplyvňujúce zdravie živočíchov“.

## 1 CIEĽ PRÁCE

V posledných rokoch na Slovensku ale aj v iných krajinách došlo k prudkému poklesu pôrodnosti a plodnosti mužov a žien. Zároveň vystúpila do popredia aj otázka toxicity ťažkých kovov, medzi ktoré patrí aj nikel. V súvislosti s týmito skutočnosťami, sme nikel ako jeden z množstva faktorov vplývajúcich na reprodukciu v tejto práci aplikovali a objasňovali jeho účinky na reprodukčné orgány. Pre štúdiu *in vitro* sme sa u samcov zamerali na semenníky, konkrétne na Leydigove (intersticiálne) bunky semenníkov myši. U samíc sme sledovali účinky niklu na folikulové bunky získané z folikulov vaječníkov ošípaných.

Cieľom dizertačnej práce je zistiť vplyv niklu na vybrané parametre ako sú životaschopnosť, steroidogéza, apoptóza a štruktúra týchto buniek po podaní niklu vo forme  $\text{NiCl}_2$ . V súvislosti s dosiahnutím vytýčeného cieľa sme sledovali:

### a) Leydigove bunky

1. Vplyv rôznych koncentrácií  $\text{NiCl}_2$  na životaschopnosť Leydigových buniek semenníka.
2. Pôsobenie  $\text{NiCl}_2$  na výskyt indukovanej apoptózy v Leydigových bunkách.
3. Účinok  $\text{NiCl}_2$  na steroidogézu Leydigových buniek (testosterón).
4. Vplyv rôznych koncentrácií  $\text{NiCl}_2$  na ultraštruktúru Leydigových buniek.

### b) folikulové bunky

1. Vplyv  $\text{NiCl}_2$  na výskyt indukovanej apoptózy folikulových buniek.
2. Účinok  $\text{NiCl}_2$  na steroidogézu folikulových buniek (progesterón).



3. Pôsobenie NiCl<sub>2</sub> na ultraštruktúru folikulových buniek.

## 2 MATERIÁL A METÓDY

### 2.1 Pôvod, izolácia a inkubácia (kultivácia) buniek

#### 2.1.1 Zvieratá

Samce NMRI myši (Toxi-Coop, Hungary, n = 30), s telesnou hmotnosťou 32 – 39 g vo veku 8 – 9 týždňov sme umiestnili do miestnosti s fotoperiódou svetlo/tma 12:12, teplotou 20 – 23°C, a relatívnou vlhkosťou 50 – 60%. Zvieratá sme vložili do ôsmich kliebok po osem zvierat s voľným prístupom k štandardným laboratórnym peletám (Altromin, LATI) a kvapkovej napájačke. Na anestézu zvierat sme použili 60 mg.kg<sup>-1</sup> pentobarbitalu (Rhone-Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, France), ktorý sme podali intraperitoneálne.

Vaječníky sme získali od pubertálnych samíc ošípanej plemena Slovenská biela ušľachtilá vo veku 7 mesiacov, tesne na začiatku estrálneho cyklu (vizuálne vyšetrenie stavu vaječníkov). Na jeden pokus sme použili vaječníky od 20 zvierat. Vaječníky sme uložili do sklenenej nádoby obsahujúcej studený fyziologický roztok, následne sme ich transportovali do laboratória v termotaške na ľadových vankúšikoch. Ihneď sme ich opláchli (1 min.) v 70% roztoku liehu a potom dvakrát v sterilnom fyziologickom roztoku.

#### 2.1.2 Izolácia a inkubácia buniek

Leydigove bunky sme izolovali mechanickou disociáciou bez použitia enzýmov ako popisuje v predošlej štúdii STOKLOSOWA (1982), s menšou modifikáciou. Ihneď sme semenníky dekapsulovali a umiestnili na nylónové sitko (otvory o veľkosti 300 μm) nad kadičku. Následne s použitím 10 cm<sup>3</sup> striekačky a ihly (Luer 23 G<sup>1/4</sup>) sme intersticiálne bunky vyplavili silným prúdom EMEM média (EMEM; Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, UK) bez séra a zachytili v kadičke umiestnenej pod sitkom. Po centrifugácii (300 g, 4°C, 10 min.) sme bunky 2 krát premyli, resuspendovali a zriedili na 10<sup>6</sup> buniek v 1 cm<sup>3</sup> kultivačného média (EMEM) doplnenom s 10% fetálnym bovinným sérom (FBS; Gibco, BRL), 100 IU.cm<sup>-3</sup> penicilínom a 100 μg.cm<sup>-3</sup> streptomycínom (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Suspenziu buniek sme vložili (s konečným objemom 500 μl na kultivačnú jamku) do sterilnej 24-jamkovej kultivačnej platničky (Corning Glassworks, Corning, NY).

Leydigove bunky sme identifikovali histochemickou reakciou enzýmom 3-β-hydroxysteroid dehydrogenáza (3-β-HSD). Ihneď po identifikácii sme bunky inkubovali 3,5 hodiny pri 34°C v kultivačnom médiu s 0,6 mmol.dm<sup>-3</sup> dehydroizoandrosterónu (DHA) (Sigma, St. Louis, USA), 0,6 mmol.dm<sup>-3</sup> NAD (Sigma, St. Louis, USA), 0,2 mmol.dm<sup>-3</sup> NBT a 7% glykol propylénu (Sigma, St. Louis, USA).

### Životaschopnosť Leydigových buniek:

Metódu sme prevádzali podľa metodiky FRESHNEYA (1987). Na stanovenie životaschopnosti buniek sme pridali FBS do kultivačného média a vzorky sme zafarbili s roztokom trypanovej modrej (Sigma, St. Louis, USA). Reaktívnosť trypanovej modrej je založená na tom, že chromofór je negatívne nabitý a nepôsobí na bunku, s výnimkou prípadu keď je poškodená bunková membrána. Preto všetky bunky, ktoré nie sú zafarbené sú životaschopné.

Postup metódy:

1. Požadovanú suspenziu buniek (bunky zriedené v konečnom médiu bez séra do požadovanej koncentrácie  $1 \times 10^5$  až  $2 \times 10^5$  buniek na  $1 \text{ cm}^3$ ) v množstve  $0,5 \text{ cm}^3$  dáme do tuby so závitovým uzáverom.
2. Pridáme  $0,1 \text{ cm}^3$  0,4% trypanovej modrej a premiešame.
3. Necháme stáť 5 min pri  $15 - 30^\circ\text{C}$  (izbová teplota).
4. Naplníme hemocytometer pre počítanie buniek.
5. Pod mikroskopom pozorujeme, či sú bunky životaschopné – životaschopné bunky sú nezafarbené.

Folikulové bunky sme izolovali z dobre prekrvených folikulov stredných rozmerov (3 – 5 mm v diametre) pomocou aspirácie folikulovej tekutiny so striekačkou a tenkou ihlou pod laminárnym boxom. Zhromaždenú folikulovú tekutinu v sterilnej skúmavke sme centrifugovali (500 g, 2000 rpm 10 min pri  $4^\circ\text{C}$ ). Odstredené folikulové bunky sme premyli médiom HEPES-buffered DMEM/F-12 (Sigma, St. Louis, USA). Centrifugácia, obnovenie média a pipetovanie boli opakované trikrát. Počet buniek sme stanovili pomocou hemocytometra a koncentráciu buniek sme upravili na  $10^6 \cdot \text{cm}^{-3}$  kultivačného média TCM-199, ktoré bolo doplnené s 10% bovinného fetálneho séra (Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic) a 50 mg antibiotika gentamicin (Sigma, St. Louis, USA) na liter média. Takto upravenú bunkovú suspenziu sme rozpipetovali (po  $2 \text{ cm}^3$ ) do 24 – jamkových kultivačných platničiek (Becton Dickinson, Lincoln Park, USA), kým bunky pre určenú imunocytochemickú analýzu sme inkubovali v  $300 \mu\text{l}$  média v kultivačných platničkách typu Lab-Tek chamber-slides (Nunc Inc., Naperville, USA). Následne sme všetky bunky kultivovali v  $\text{CO}_2$  inkubátore pri  $37^\circ\text{C}$ , v 5%  $\text{CO}_2$  vo zvlhčenom vzduchu počas 3 – 4 dní, kým sa vytvorila súvislá monovrstva buniek.

Po kultivácii, pred analyzovaním buniek, počet a životaschopnosť folikulových buniek sme determinovali farbením trypanovou modrou a hemocytometrom. Postup stanovenia bol zhodný s postupom použitým pri Leydigových bunkách.

### Štúdia účinku koncentrácií $\text{NiCl}_2$ *in vitro*:

Po kultivácii Leydigových buniek sme pipetou odstránili kultivačné médium. Pre stanovenie účinku rôznych koncentrácií  $\text{NiCl}_2$  na 48-hodinovú kultúru Leydigových buniek sme  $\text{NiCl}_2$  (Sigma, St. Louis, USA) navážili a bezprostredne pred kultiváciou zmiešali s kultivačným médiom. Po nariadení

jednotlivých koncentrácií sme médium pridali k bunkám v potrebných koncentráciách NiCl<sub>2</sub> (Sigma): 15; 31; 62; 125; 250; 500 a 1000 μmol.dm<sup>-3</sup>. Bunky sme znovu kultivovali 48 hodín pri teplote 34°C a vlhkej atmosfére 95% vzduchu a 5% CO<sub>2</sub>. Následne sme tieto bunky spočítali pomocou hemocytometra. Po inkubácii alikvotnú časť kultivačného média sme centrifugovali a získaný supernatant sme zhromaždili a zmrazili pri -20°C až do determinácie testosterónu.

Po kultivácii folikulových buniek sme kultivačné médium nahradili novým médiom s rovnakým zložením a s prídavkom NiCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, USA) v požadovaných koncentráciách 62, 125, 250, 500 a 1000 μmol.dm<sup>-3</sup>. Kontrolné médium neobsahovalo NiCl<sub>2</sub>. NiCl<sub>2</sub> sme rozpustili a zriedili na potrebné koncentrácie v kultivačnom médiu bezprostredne pred jeho použitím.

## 2. 2 Stanovenie cytotoxicity

Cytotoxicitu Leydigových buniek vystavených NiCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, USA) *in vitro* sme stanovovali MTT cytotoxickou metódou podľa MOSMANNA (1983). Táto kolorimetrická metóda meria konverziu soli tetrazólia, 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), do modrých častíc formazánu enzýmom dehydrogenáza neporušených mitochondrií živých buniek. Formazán môže byť potom meraný spektrofotometricky.

Hneď potom sme bunky v množstve 2x10<sup>5</sup> (v 200 μl média) na jamku, kultivované v 96-jamkových platničkách (Greiner, Germany) ošetrili s MTT (Sigma, St. Louis, USA) vo finálnej koncentrácii 0,2 mg.cm<sup>-3</sup>. Po 2-hodinovej kultivácii (34°C, 95% vzduch, 5% CO<sub>2</sub>), sme bunky a formazánové kryštáliky rozpustili v 180 μl okysleného (0,08 mol.dm<sup>-3</sup> HCl) izopropanolu. Optickú hustotu sme determinovali pri meracej vlnovej dĺžke 570 nm oproti 620 nm podľa referencie na SLT 210 mikroplatňového snímača (SLT-Labinstruments, Austria). Výsledky sme vyjadrili v percentách kontroly (optická hustota formazánu z buniek nevystavených niklu).

## 2.3 Stanovenie testosterónu a progesterónu

### 2. 3. 1 Kvantifikácia testosterónu

Determináciu testosterónu priamo z alikvotného množstva kultivačného média sme vykonali pomocou metódy ELISA – enzýmoimunoanalýzy (Sigma, St. Louis, USA). ELISA – je kvalitatívno- kvantitatívna sérologická metóda, ktorá sa používa pre stanovenie antigénov s vyššou relatívnou molekulovou hmotnosťou (nad 20 000) alebo pre detekciu protilátok (DOLEŽALOVÁ et al., 1995). Testosterón (antigén) sme merali vo vzorke, ktorú sme doplnili enzýmom testosterón-peroxidáza (príslušný enzým pre antigén) pre jeho naviazanie na známe množstvo antitestosterónu (protilátka) na mikroplatniach. Po inkubácii sme urobili separáciu jednorázovým premytím. Pridali sme základný roztok (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + TMB). Po uplynutí požadovaného času pre maximálne zafarbenie, sme zastavili enzymatickú reakciu a determinovali sme absorbanciu. Koncentráciu testosteónu vo vzorke sme vypočítali pomocou skupiny štandardov. Intenzita zafarbenia je nepriamoúmerná koncentrácii testosterónu vo vzorke. Vzorky sme merali pri 450 nm pomocou Anthos 2010 mikroplatňového snímača (MICROLAN, WAALWIJK,

The Netherlands).

Kalibračná krivka a výpočet výsledkov: Vypočítali sme priemernú absorbanciu z každej vzorky a výsledky sme vyhodnotili pomocou WinRead 2.3 počítačového softvéru. Záznam absorbancie činidiel oproti zodpovedajúcim koncentráciám sme vyjadrili v grafe. Výsledky sme vyjadrovali v percentách kontroly.

### 2. 3. 2 Kvantifikácia progesterónu

Kvantifikáciu progesterónu sme prevádzkali priamo z alikvotného množstva média z kontroly a ošetrovaných buniek po 48 hodinách kultivácie. Médium sme z každej kultivačnej platničky jemne aspirovali pipetou a zmrazili pri teplote  $-18^{\circ}\text{C}$  až do hodnotenia steroidogenézy rádioimunometódou (RIA), použitím RIA súpravy od fy DSL Inc. (Webster, TX, USA), pričom sme postupovali podľa návodu výrobcu.

RIA – je kompetitívna (súťaživá) technika s heterogénnym usporiadaním, ktorá pracuje s tromi reaktantami. Nimi sú stanovené Agn, Agn<sup>x</sup> a PI pridané k limitovanému množstvu. Meria sa rádioaktivita imunokomplexu po odstránení voľného značeného antigénu (Agn<sup>x</sup>). Metóda je založená na súťažení dvoch foriem tej istej molekuly (Agn a Agn<sup>x</sup>) vo väzbe na limitované množstvo špecifickej protilátky. K analyzovanej vzorke sa pridá známe (limitované) množstvo antigénu značeného rádioizotopom a limitované množstvo špecifickej protilátky proti stanovenému antigénu a prevedie sa inkubácia. Vo väzbe na špecifickú protilátku súťaží antigén prítomný v analyzovanej vzorke (Agn) a v známom množstve pridaný antigén značený rádioaktívnym izotopom, napríklad jódom <sup>125</sup>I.

V priebehu inkubácie dôjde k vzniku imunokomplexov Agn–PI a Agn<sup>x</sup>–PI. Ich množstvo je závislé na koncentrácii stanovovaného antigénu Agn vo vzorke a pridaného, izotopom značeného antigénu Agn<sup>x</sup>. Nakoľko protilátka sa pridáva len v malom limitovanom množstve, zostanú v roztoku vždy tiež molekuly voľného nezreagovaného Agn a izotopom značeného Agn<sup>x</sup>. Po ukončenej imunoreakcii sú teda v roztoku prítomné dva rádioaktívne reaktanty –Agn<sup>x</sup>–PI aj voľný Agn<sup>x</sup> a môžeme merať rádioaktivitu jedného z nich. K meraniu rádioaktivity sa používa detektor  $\gamma$  – žiarenia. Z nameranej rádioaktivity imunokomplexu zistíme koncentráciu stanovovaného antigénu vo vzorke odčítaním z kalibračnej krivky (DOLEŽALOVÁ et al., 1995).

Metódu sme zvolili pre jej vysokú citlivosť – dajú sa stanoviť i stopové množstvá v nanogramoch a pikogramoch v koncentráciách  $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  mol.dm<sup>-3</sup>, v ktorých sa hormóny vyskytujú v organizme. V pokuse sme urobili 10 opakovaných ošetrení. Steroidy sme merali v slepej kontrole (médium kultivované bez buniek), v kontrole (médium kultivované s bunkami bez NiCl<sub>2</sub>) a v experimentálnych skupinách (médium kultivované s bunkami a s NiCl<sub>2</sub>). Vypočítaním obsahov hormónov produkovaných bunkami, obsahy endogénnych hormónov (slepá kontrola) boli vždy odrátané z obsahov celkových steroidov meraných v médiu kultivovaných buniek k vylúčeniu vplyvu endogénnych steroidov na stanovenie sekrécie steroidov kultivovanými bunkami.

## 2. 4 Stanovenie apoptotických zmien

Stanovenie apoptózy Leydigových a folikulových buniek sme previedli TUNEL metódou použitím Mebstain Apoptosis kit Direct (Immunotech, France).

#### Príprava činidiel:

- a) TdT roztok – sme pripravili bezprostredne pred použitím: 1. Zmes TdT tlmivého roztoku, FITC–dUTP a TdT v pomere 18:1:1 (45  $\mu$ l: 2,5  $\mu$ l: 2,5  $\mu$ l). Pripravili sme spolu 50  $\mu$ l TdT–roztoku a uskladnili pri 4°C. 2. Ako negatívnu kontrolu, sme zmiešali a pripravili TdT tlmivý roztok a FITC–dUTP v pomere 19:1 (47,5  $\mu$ l : 2,5  $\mu$ l).
- b) Roztok paraformaldehydu (fixačné činidlo) – sme pripravili zmiešaním 4% paraformaldehydu (bez metanolu) a 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (4% PFA).

#### Príprava buniek:

Pre stanovenie apoptózy na kultiváciu sme použili kultivačné komôrky typu chamber slide (Nunc Inc., Naperville, USA). Po kultivácii buniek s jednotlivými koncentráciami NiCl<sub>2</sub> sme odstránili pipetou kultivačné médium z kultivačných jamiek. Bunky sme premyli s PBS (2% FCS, 0,1% NaNO<sub>3</sub>) niekoľkokrát za sebou.

Počet buniek: 50 – 100  $\mu$ l na koncentráciu 10<sup>5</sup> buniek.cm<sup>-3</sup> na 1 chamber slide.

Otáčky: 300 – 500 x g

Čas: 5 – 10 min

Fixácia buniek: Bunky sme osušili na sklíčku po dobu asi 1 hodiny použitím ventilátora. Následne sme bunky fixovali pri 4°C po dobu 15 min s 4% PFA.

Permeabilizácia: 4% PFA sme striasli zo sklíčka a pridali 0,5% emulgátor 20 (0,2% BSA) k bunkám. Nechali sme pôsobiť 15 min pri izbovej teplote. Medzitým sme pripravili TdT roztok a negatívnu kontrolu.

DNA označovanie: Bunky sme premyli 3 krát destilovanou vodou, potom sme pridali 50  $\mu$ l TdT roztoku k bunkám. Inkubovali sme 1 hodinu pri 37°C. Následne sme bunky premyli 3 krát s PBS.

Kontrastné farbenie: a) Pipetovali sme 50  $\mu$ l 0,5  $\mu$ g.cm<sup>-3</sup> propidium jodidu k bunkám a inkubovali 15 – 20 min pri 4°C. b) Oplachovali sme sklíčko s PBS 3 minúty.

Vizualizácia: Pridali sme médium (90% glycerín, 10% PBS) pod krycie sklíčko. Pozorovali sme pod fluorescenčným mikroskopom.

## **2. 5 Elektrónová mikroskopia**

Pre hodnotenie ultraštruktúry buniek sme po 48–hodinovej kultivácii s niklom alebo bez neho separovali bunky, fixovali v 2% paraformaldehyde (Merck, Nemecko), 2,5% glutaraldehyde (Merck, Nemecko) a v 0,2 mol.dm<sup>-3</sup> fosfátovom tlmivom roztoku pri 4°C 2 hodiny, dehydrovali v zostupnom rade roztoku etanolu a zaliali do epoxydovej živice – Durcupan ACM (Fluka, Švajčiarsko). Ultratenké rezy sme zafarbili s acetát uranylom (Fluka, Švajčiarsko) a citrátom olovnatým, ktorý sme zarobili podľa metodiky REYNOLDSA (1963) a pozorovali použitím JEM – 100 CX–II (JOEL, Japan). Z každého pokusu sme pozorovali 20 elektrónových mikroskopických rezov z minimálne troch rozdielnych opakovaní. Fotografie ultraštruktúry Leydigových a folikulových buniek sme robili podľa morfológických kritérií (WEIBEL et al., 1966; MASSÁNYI a UHRÍN, 1996; ŽITNÝ et al., 2004).

## 2. 6 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Na výpočet základných štatistických charakteristík (priemer, min, max, medián, variačný koeficient, smerodajná odchýlka) sme použili program Excel. Testovanie zhody dvoch stredných hodnôt nezávislých súborov sme realizovali v Exceli pomocou analytických nástrojov (Data Analysis: t-test, muselo mu predchádzať testovanie zhody dvoch rozptylov). Hladinu významnosti sme hodnotili na úrovni  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ .

## 3 VÝSLEDKY A ZÁVERY

### 3. 1 Leydigove bunky

Stanovením životaschopnosti Leydigových buniek po 48-hodinovej kultivácii trypanovou modrou sme zistili 75% životaschopných buniek. Následne sme previedli identifikáciu Leydigových buniek, ktorou sme zistili, že percento 3- $\beta$ -HSD pozitívnych, teda Leydigových buniek bolo 70%.

#### 3. 1. 1 Prejavy cytotoxicity

Po kultivácii s  $\text{NiCl}_2$  sme metódou MTT preukázali, že životaschopnosť Leydigových buniek začala klesať pri prídavku  $250 \mu\text{mol.dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$  a viac, pričom najvyšší nárast životaschopnosti týchto buniek bol pri koncentrácii  $125 \mu\text{mol.dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$  ( $P < 0,01$ ) čo bolo 160,78% ( $\pm 31,85$ ). Najnižšia životaschopnosť buniek bola pri najvyššej koncentrácii  $\text{NiCl}_2$   $1000 \mu\text{mol.dm}^{-3}$  a predstavovala 50,02% ( $\pm 8,3$ ), čo bol významný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou ( $P < 0,01$ ). Výsledky sme vyjadrili v percentách kontroly.

#### 3. 1. 2 Koncentrácia testosterónu

Produkcia testosterónu poklesla už pri najnižšej koncentrácii  $15 \mu\text{mol.dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$  a klesala priamoúmerne so zvyšovaním koncentrácie niklu. Najvyššia hladina testosterónu bola teda v kontrolnej skupine bez prídavku niklu, čo bolo 100,00% ( $\pm 9,65$ ). Najnižšia hladina testosterónu bola pri koncentrácii  $1000 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ , teda pri najvyššej koncentrácii a predstavovala 50,74% ( $\pm 11,77$ ), čo bol významný rozdiel v porovnaní s kontrolou ( $P < 0,01$ ). Citlivosť tejto metódy bola  $0,2 \text{ ng.cm}^{-3}$  a koeficienty variácie inter- a intra- metódy boli 3,9% a 6,2%. Interaktivita s 5 $\alpha$ -dihydroxytestosterónom bola 10%. Hladiny testosterónu sme vyjadrili v percentách kontroly. Túto štúdiu sme vykonali 7 krát ( $n=7$ ) s 4 – 15 opakovaniami vzoriek v každej koncentrácii.

#### 3. 1. 3 Vyhodnotenie apoptotických zmien

Vizualizovaním množstva apoptotických buniek TUNEL metódou sme zistili, že percento apoptotických buniek (s naviazaným TdT na fragmenty DNA) zo všetkých buniek stúpalo po podaní  $\text{NiCl}_2$  okrem koncentrácie  $62 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ , kde klesla v porovnaní s kontrolou asi o 6% ( $40,71\% \pm 17,56$ ).

Najvyššie percento apoptózy sme zaznamenali pri koncentrácii  $125 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ , predstavovalo 80,29% apoptotických buniek zo všetkých buniek ( $\pm 13,90$ ), čo bol signifikantný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou ( $P < 0,01$ ).

### *3. 1. 4 Ultraštruktúra Leydigových buniek*

Pri hodnotení ultraštruktúry Leydigových buniek zo získaných fotografií sme sa zamerali na sledovanie nasledovných parametrov: zastúpenie hladkého a granulárneho endoplazmového retikula, mitochondrií, euchromatínu a heterochromatínu jadier, tukových kvapôčok a vakuol. Zastúpenie týchto organel v kontrolnej skupine sme porovnávali s ich zastúpením v experimentálnych skupinách po inkubácii buniek s jednotlivými koncentráciami  $\text{NiCl}_2$ .

Sledovaním ultraštruktúry Leydigových buniek sme pozorovali znižovanie zastúpenia hladkého endoplazmového retikula pri najvyšších koncentráciách  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Granulárne endoplazmové retikulum bolo veľmi málo zastúpené a to len u kontrolnej skupiny. Ďalej sme pozorovali zníženie výskytu tubulárneho typu mitochondrií po prídavku najvyšších koncentrácií  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Kristový typ mitochondrií nebol prítomný v žiadnej skupine Leydigových buniek. Taktiež došlo k znižovaniu až vymiznutiu heterochromatínu jadra v závislosti od zvyšovania koncentrácie  $\text{NiCl}_2$  v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naopak zistili sme zvýšenie zastúpenia euchromatínu priamoúmerne so zvyšovaním koncentrácie niklu. Tak isto došlo k vytváraniu tzv. prázdnych miest v bunkách v podobe tukových kvapôčok a vakuol v závislosti od zvyšovania koncentrácie  $\text{NiCl}_2$ . Najvyššie zastúpenie týchto prázdnych miest bolo u najvyššej koncentrácie  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ .

## **3. 2 Folikulové bunky**

Po kultivácii folikulových buniek sme farbením trypanovou modrou stanovili životaschopnosť buniek, ktorá bola 75 – 78%.

### *3. 2. 1 Koncentrácia progesterónu*

Meraním hladiny progesterónu v kultivačnom médiu metódou RIA sme zistili pokles produkcie tohto hormónu u všetkých pokusných skupín s prídavkom  $\text{NiCl}_2$ . Najnižšia hladina progesterónu bola zaznamenaná pri najvyššej koncentrácii  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ , čo predstavovalo 69,47% ( $\pm 9,04$ ), kde boli preukazné rozdiely v porovnaní s hodnotou nameranou v kontrolnej skupine ( $P < 0,05$ ). Najvyššia hladina progesterónu bola u kontroly, ktorá predstavovala 100% ( $\pm 26,79$ ).

### *3. 2. 2 Vyhodnotenie apoptotických zmien*

TUNEL metódou sme zistili nárast apoptózy po pridaní  $\text{NiCl}_2$  k folikulovým bunkám. Najvyššie percento apoptotických buniek sme zaznamenali pri najvyššej koncentrácii  $\text{NiCl}_2$   $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Bolo

to 79,17% apoptotických buniek zo všetkých buniek, ( $\pm 36,08$ ). V porovnaní s kontrolnou skupinou, kde sme zaznamenali 44,86% ( $\pm 22,97$ ) apoptotických buniek to bol preukazný rozdiel ( $P < 0,05$ ).

### 3. 2. 3 Ultraštruktúra folikulových buniek

Pri hodnotení ultraštruktúry folikulových buniek zo získaných fotografií sme sa zamerali na sledovanie nasledovných parametrov: zastúpenie hladkého a granulárneho endoplazmového retikula, mitochondrií, euchromatínu a heterochromatínu jadier, tukových kvapôčok, vakuol a mikrofilamentov.

Zistili sme zníženie zastúpenia hladkého endoplazmového retikula pri najvyššej koncentrácii  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Granulárne endoplazmové retikulum nebolo zastúpené v žiadnej skupine buniek. Ďalej sme pozorovali zníženie výskytu tubulárnych mitochondrií znova po prídavku najvyššej koncentracie  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ . Prepážkové mitochondrie neboli prítomné v žiadnej skupine Leydigových buniek. Naopak došlo k zvýšeniu výskytu euchromatínu jadra vo všetkých pokusných skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. Celkové vymiznutie sme pozorovali u heterochromatínu jadra, vo všetkých pokusných skupinách v porovnaní s kontrolou. Taktiež došlo k zvýšeniu zastúpenia tukových kvapôčok, vakuol a mikrofilamentov v závislosti od zvyšovania koncentracie  $\text{NiCl}_2$ . Najvyššie zastúpenie týchto troch organel bolo u najvyššej koncentracie  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2$ .

## Z výsledkov dosiahnutých v práci vyplývajú nasledovné prínosy pre vedu:

K pochopeniu dlho trvajúcich účinkov expozície reprodukčne toxických látok je dôležité poznať mechanizmus činnosti reprodukčných orgánov. K dosiahnutiu tohto cieľa sú potrebné špecifické postupy k hodnoteniu miesta účinku a spôsobu účinku na zvieratách alebo bunkách. Použitie takýchto informácií umožní vývoj kvantitatívnych možností sledovania zmien reprodukčného systému človeka vystaveného potenciálnym toxickým látkam v životnom prostredí.

Ťažké kovy, ako napríklad kadmium sú doteraz veľmi dobre preštudované. Iné kovy, medzi ktoré patrí aj nikel sú v štádiu výskumu v rôznych oblastiach jeho pôsobenia ako toxického aj ako esenciálneho prvku v organizme. Nikel je kontaminant životného prostredia, potravin a je toxický prvok. Toto poznanie predurčuje výskum v danej oblasti a odhalenie prejavov negatívneho účinku na celulárnej úrovni.

Dosiahnuté výsledky môžu objasniť viaceré negatívne zdravotné problémy objavujúce sa u zvierat a ľudí a upozorniť na jemné celulárne zmeny bez preukázateľných makroskopických zmien (aplikovaný výskum, aplikácia v praxi). Taktiež tieto výsledky je možné využiť pri ďalšom skúmaní toxických prejavov niklu – vychádzať z dosiahnutých záverov (základný výskum).

Poznatky, ktoré sme dosiahli je následne možné využiť v pedagogickom procese v štúdiu predmetov potravinárskeho zamerania ako aj fyziológie a patofyziológie živočíchov.

Množstvo procesov, ktoré súvisia s niklom zatiaľ nie je objasnených. Preto by sme navrhovali do budúcnosti ďalej skúmať účinky niklu v organizme na rôznych úrovniach pre pochopenie celého radu reakcií ku ktorým dochádza po jeho absorpcii do organizmu.



## Závery:

Predložená práca popisuje vplyv niklu na ultraštruktúru, steroidogézu a životaschopnosť buniek reprodukčného systému. U samcov sme sledovali jeho účinky na Leydigove (intersticiálne) bunky semenníkov myši a u samíc na folikulové (ovariálne) bunky vaječníkov ošípaných po *in vitro* kultivácii s týmto kovom. Nikel sme použili vo forme  $\text{NiCl}_2$ , ktorý sme rozpustili v kultivačnom médiu a pridávali k bunkám v rôznych koncentráciách.

Zistili sme, že  $\text{NiCl}_2$  pri nižších koncentráciách ( $<250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) stimuluje a pri vyšších koncentráciách ( $>250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) inhibuje životaschopnosť Leydigových buniek. Životaschopnosť sme zisťovali použitím metódy MTT (mitochondriový toxický test), ktorá sleduje prejavy toxicity na úrovni činnosti mitochondrií. Zvyšovanie životaschopnosti pri nižších koncentráciách bolo pravdepodobne spôsobené obrannými procesmi buniek, ktoré zvyšovali energetický metabolizmus na udržanie životných procesov v bunkách ohrozených pôsobením niklu. Pri vyšších koncentráciách sa životaschopnosť Leydigových buniek znižovala, čo bolo pravdepodobne spôsobené pôsobením vysokej toxicity niklu, ktorej sa bunka už nedokázala brániť.

Tiež sme sledovali pokles produkcie testosterónu Leydigovými bunkami po podaní všetkých koncentrácií  $\text{NiCl}_2$  metódou ELISA priamo z kultivačného média. Testosterón sa tvorí v hladkom endoplazmovom retikule. Sledovaním ultraštruktúry Leydigových buniek sme zistili znižovanie výskytu týchto organel priamoúmerne so zvyšovaním koncentrácií niklu. Rozpad hladkého endoplazmového retikula pôsobením niklu viedol k sledovanému poklesu testosterónu v kultivačnom médiu. Pokles testosterónu – samčieho pohlavného hormónu spôsobuje znižovanie libida samcov a takisto poruchy spermatogenézy, čo vedie k zníženiu plodnosti.

Sledovaním steroidogézy folikulových buniek metódou RIA sme zistili zníženie hladín progesterónu po kultivácii s  $\text{NiCl}_2$ . Znižovanie progesterónu bolo spôsobené znížením zastúpenia hladkého endoplazmového retikula, čo dokazujú výsledky hodnotenia ultraštruktúry folikulových buniek a mechanizmus je veľmi podobný u samcov ako aj u samíc.

Ďalej sme v Leydigových a folikulových bunkách sledovali výskyt apoptózy použitím TUNEL metódy. Táto metóda je založená na princípe vizualizácie rozpadu DNA v jadre buniek, ku ktorému dochádza pri apoptóze buniek. Zistili sme zvýšenie počtu apoptotických Leydigových aj folikulových buniek v kultúre po podaní  $\text{NiCl}_2$ . Apoptóza sa zvyšovala priamoúmerne so zvyšovaním koncentrácií niklu. Tieto výsledky nasvedčujú tomu, že nikel pri vysokých dávkach pôsobí cytotoxicky na DNA a spôsobuje tak odumieranie buniek. To súvisí aj s výsledkami získanými sledovaním ultraštruktúry Leydigových a folikulových buniek, kde sme pozorovali rozpad heterochromatínu a zvyšovanie zastúpenia euchromatínu pri vysokých dávkach  $\text{NiCl}_2$  ( $>15 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ).

Sledovaním ultraštruktúry Leydigových a folikulových buniek sme pozorovali zvýšenie vakuolizácie a lipidizácie v cytoplazme buniek po kultivácii s  $\text{NiCl}_2$ . Tukové kvapôčky a vakuoly sa považujú za tzv. „prázdne miesta“ v bunke a vyskytujú sa vo zvýšenej miere pri degeneratívnych procesoch v bunke. Tiež sme pozorovali zvýšenie euchromatínu a zníženie zastúpenia heterochromatínu u folikulových aj Leydigových buniek po kultivácii s vysokými koncentraciami  $\text{NiCl}_2$ . Rozpad

heterochromatínu súvisí s výsledkami apoptózy, kde rozpad práve tejto časti jadra naznačuje odumieranie a smrť bunky. Takisto u oboch typov buniek sme sledovali zníženie výskytu hladkého endoplazmového retikula a mitochondrií. Hladké endoplazmové retikulum je miesto produkcie steroidných hormónov v týchto bunkách. To zodpovedá aj výsledkom hodnotenia steroidogenézy, kde sme pozorovali zníženie produkcie testosterónu a progesterónu po kultivácii s  $\text{NiCl}_2$ , priamoúmerne so zvyšovaním jeho koncentrácií. Sledovaním mitochondrií sme zistili zníženie ich výskytu u folikulových aj Leydigových buniek. To súvisí aj výsledkami MTT metódy u Leydigových buniek, kde mitochondrie zvyšovali svoju činnosť do koncentrácie  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a pri vyšších koncentráciách sa ich činnosť prudko znižovala. Tento jav by sa dal vysvetliť ako jedna z obranných reakcií bunky, kde zvyšovaním činnosti mitochondrií bunka zabezpečuje energiu pre zachovanie života bunky. Pri vyšších dávkach niklu sa znižuje výskyt mitochondrií, bunková obranyschopnosť zlyháva a začína sa prejavovať apoptóza. U folikulových buniek sme pozorovali aj zvýšenie výskytu mikrofilamentov.

Na záver musíme konštatovať, že vystavenie vyšším dávkam  $\text{NiCl}_2$  jednoznačne pôsobí cytotoxicky na ultraštruktúru, steroidogenézu a životaschopnosť buniek reprodukčného systému samcov a samíc a teda aj funkciu gonád a schopnosť reprodukcie živočíchov. Podobné cytotoxické účinky niklu sledovali aj niektorí autori na ľudských bunkách reprodukčného systému. Preto môžeme usudzovať, že problémy s plodnosťou ľudskej populácie, ktoré sú teraz aktuálnou témou v mnohých krajinách, môžu byť ovplyvnené okrem iných faktorov aj kontaktom s niklom v rôznych formách a to hlavne na pracoviskách, kde dochádza k najvyššiemu vystaveniu tomuto toxikantu.

Preveniou pre ľudí môže byť zvýšenie automatizácie a teda zníženie ľudského faktora na pracoviskách, kde pracovníci dochádzajú k styku s niklom. Ďalej používanie ochranných častí oblečenia pre zamedzenie vstupu niklu do organizmu jeho vdychovaním, prechodom cez kožu a jeho požitím v jedle a vo vode. Zamedziť aj jeho vstupu do potravinového reťazca, ktorý sa začína obsahom niklu v ovzduší, povrchových vodách a v pôde. Prevádzať pravidelný monitoring niklu a ťažkých kovov v životnom prostredí, vo vode a v potravinách. Obmedziť používanie niklu na výrobu bižutérie, mincí, endoprotéz, antikoročných náterov a podobne a nahradiť ho iným materiálom. Nakoľko je preukázané, že jednotlivé formy niklu majú rôznu toxicitu a schopnosť prestupovať do buniek organizmu, bolo by vhodné používať vo výrobe menej toxické zlúčeniny niklu.

## 4 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. DOLEŽALOVÁ, V., KOMÁREK, V., PARÁK, T., POSPÍŠILOVÁ, V., NOVOTNÁ, H., ŠTERN, P., TOVÁREK, J. 1995. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. 4. prep. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995, 286s. ISBN 80-7013-198-5.
2. FRESHNEY, R. 1987. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. In *Alan R. Liss, Inc.*, New York, 1987, 117p.
3. MASSÁNYI, P., UHRÍN, V. 1996. Histological changes in the ovaries of rabbits after an administration of cadmium. In *Reprod. Dom. Anim.*, 1996, p. 629-632.
4. MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to

- proliferation and cytotoxicity assays. In *J. Immunol. Methods*, 1983, p. 55-63.
5. REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. In *J. Cell Biol.*, vol. 17, 1963, 208p.
  6. STOKLOSOWA, S. 1982. Tissue culture of gonadal cells. In *Acta Biol. Hung.*, 1982, p. 367-379.
  7. WEIBEL, ER, KISTLER, GS, SCHERLE, WF. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. In *J. Cell Biol.*, 1966, p. 23-28.
  8. ŽITNÝ, J., MASSÁNYI, P., TRAKOVICKÁ, A., RAFAJ, J., TOMAN, R. 2004. Quantification of the ovarian follicular growth in rabbits. In *Bull. Vet. Instit. Pulawy*, vol. 48, 2004, no. 1, p. 37-40.

## 5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

### Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch (Current Contents):

1. MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., ZEMANOVÁ, J., MAKAREVICH, A. V., CHRENEK, P., CIGÁNKOVÁ, V., FLEŠÁROVÁ, S., TOMAN, R., FORGÁCS, Z., SOMOSY, Z., LAZOR, P. 2007. Effect of nickel administration in vivo on the testicular structure in mice. In *Acta veterinaria*, Brno, 2007, vol. 76, 2007, no. 2, p. 223-229.
2. ZEMANOVÁ, J., LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., TRANDŽÍK, J., BUROCZIOVÁ, M., NAĎ, P., CAPCAROVÁ, M., STAWARZ, R., SKALICKÁ, M., TOMAN, R., KORÉNEKOVÁ, B., JAKABOVÁ, D. 2007. Nickel seminal concentration in various animals and correlation to spermatozoa quality. In *Journal of veterinary medicine*, Berlin : Blackwell Verlag, 2007. ISSN 0931-184X, 2007, vol. 54, no. 6, p. 281-286.

### Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách:

3. MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., TRANDŽÍK, J., NAĎ, P., SKALICKÁ, M., TOMAN, R., KROČKOVÁ, J., STAWARZ, R., KOLESÁROVÁ, A., FORMICKI, G. 2007. Environmental contaminants in animal semen and spermatozoa quality. In *Progress in Environmental Science and Technology : Proceedings of the 2007 International Symposium Beijing, China, November 13-16, 2007*. - Beijing : Science Press, 2007. ISBN 978-7-03-020403-5, p. 165-171.
4. LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., KOVÁČIK, J., TOMAN, R., KROČKOVÁ, J., CIGÁNKOVÁ, V., KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVÁ, M. 2007. Environmental contaminants in animals and testicular structure. In *Progress in Environmental Science and Technology : Proceedings of the 2007 International Symposium, Beijing, China, November 13-16, 2007*. - Beijing : Science Press, 2007. ISBN 978-7-03-

**Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách:**

5. ZEMANOVÁ, J., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., TRANDŽÍK, J., NAĎ, P., SKALICKÁ, M., TOMAN, R., KORÉNEKOVÁ, B., JAKABOVÁ, D. 2005. Seminal concentrations of nickel in various animals and correlation to spermatozoa quality. In *Rizikové faktory potravného reťazca V.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. ISBN 80-8069-549-6, p. 351-357. Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

Dostupné na internete: <[www.slpk.sk/eldo/2006/006\\_06/Zemanova.pdf](http://www.slpk.sk/eldo/2006/006_06/Zemanova.pdf)>.

6. ZEMANOVÁ, J., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., TRANDŽÍK, J. 2005. Evaluation of occurrence of pathological spermatozoa in bulls, rams and stallions. In *VI. Slovak Conference of Animal Physiology: zborník z medzinárodnej konferencie*, Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005, ISBN 80-8069-525-3, p. 345-348. Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

7. KALAFOVÁ, A., ZAUJEC, K., MOJTO, J., CHRENEK, P., KOVÁČIK, J., CAPCAROVÁ, M., ZEMANOVÁ, J. 2006. Analysis of rabbit meat quality after an nickel and zinc administration. In *Rizikové faktory potravného reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie, Nitra 12.10.2006.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-760-4, p. 164-167. Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

Dostupné na internete: <[http://www.slpk.sk/eldo/2007/016\\_07/Kalafova2.pdf](http://www.slpk.sk/eldo/2007/016_07/Kalafova2.pdf)>.

8. LUKÁČ, N., MASSÁNYI, P., CAPCAROVÁ, M., KOLESÁROVÁ, A., ZAJÍC, J., ZEMANOVÁ, J., KALAFOVÁ, A. 2006. Influence of trace elements to the immune system. In *Rizikové faktory potravného reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie, Nitra 12.10.2006.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-760-4, p. 217-222. Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

Dostupné na internete: <[http://www.slpk.sk/eldo/2007/016\\_07/Lukac.pdf](http://www.slpk.sk/eldo/2007/016_07/Lukac.pdf)>.

9. ZEMANOVÁ, J., SIROTKIN, A. V., CHRENEK, P., KALAFOVÁ, A., LUKÁČ, N., RAFAJ, J., CAPCAROVÁ, M., TOMAN, R., MASSÁNYI, P. 2006. Rabbit ovarian granulosa cell activity after an administration of nickel and zinc. In *Rizikové faktory potravného reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie, Nitra 12.10.2006.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-760-4, p. 322-324. Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

Dostupné na internete: <[http://www.slpk.sk/eldo/2007/016\\_07/Zemanova.pdf](http://www.slpk.sk/eldo/2007/016_07/Zemanova.pdf)>.

10. KROČKOVÁ, J., MASSÁNYI, P., SIROTKIN, A., PIVKO, J., BENČO, A. 2007. *In vitro* nickel toxicity on porcine granulosa cells. In *VII. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov : zborník z vedeckého seminára s medzinárodnou účasťou, 23.-24. mája 2007, Topolčianky, Slovenská republika.* -

Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007. ISBN 978-80-8069-886-7-0, p. 135-142.  
Požiadavky na systém: Windows 95 a vyššie; CD-ROM mechanika.

#### **Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií:**

11. ZEMANOVÁ, J., MASSÁNYI, P. 2006. Effect of nickel administration *in vivo* on the testicular structure in mice. In *Biotechnologia: Dziś w Akademii Techniczno-Rolniczej, jutro w regionie Kujawsko-Pomorskim : IV. konferencja, streszczenia, Bydgoszcz, 2 czerwca 2006.* - Bydgoszcz : Akademia Techniczno-Rolnicza, 2006, p. 55.

#### **Články publikované v odborných a vedeckých časopisoch na Slovensku:**

12. MASSÁNYI, P., ZEMANOVÁ, J., LUKÁČ, N., TRANDŽÍK, J. 2005. Patologické spermie u býkov, baranov a žrebcov. In *Infvet*, roč. 12 , 2005, č. 2, s. 88 - 92. ISSN 1335-1907.

#### **Abstrakty príspevkov z domácich konferencií:**

13. ZEMANOVÁ, J. 2004. Stanovenie výskytu patologických spermií u býkov, baranov a žrebcov. In *II. Vedecká konferencia študentov a doktorandov s medzinárodnou účasťou: zborník abstraktov, Nitra 22. apríl 2004.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2004. ISBN 80-8069-346-3, s. 50.

14. ZEMANOVÁ, J. 2005. The effect of nickel on testicular structure and function. In *III. Vedecká konferencia študentov a doktorandov: zborník abstraktov, Nitra, 14. apríl 2005.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. ISBN 80-8069-506-7, s. 72.

15. ZEMANOVÁ, J. 2006. In vitro cytotoxicita niklu. In *IV. Vedecká konferencia študentov a doktorandov s medzinárodnou účasťou na FBP: zborník abstraktov, Nitra, 26. apríl 2006.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-691-8, s. 77.

16. KROČKOVÁ, J. 2007. In vitro nickel toxicity of mice Leydig cells. In *V. Vedecká konferencia študentov a doktorandov s medzinárodnou účasťou na FBP : zborník abstraktov, Nitra, 26. apríl 2007.* - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007. ISBN 978-80-8069-874-4, s. 49.

#### **Ocenenia:**

Súťaž – IV. ročník mladých vedeckých pracovníkov (predsedníctvo SAPV) ; kategória – „Najlepšie práce s preukázaným realizačným prínosom (Nitra 13.5.2008): 3. miesto Ing. JIŘINA KROČKOVÁ –

ZEMANOVÁ, z Odboru živočíšnej výroby SAPV za prácu: Zemanová, J. a kol.: (2007) Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. Journal of Veterinary Medicine Series A 54 (6), 281-286.

ŠVOČ – 2007; 2. miesto v sekcii: Aplikovaná biológia – doktorandi: Ing. J. KROČKOVÁ: In vitro toxicita niklu na Leydigove bunky myší.

ŠVOČ – 2006; 3. miesto v sekcii: Biotechnológie – doktorandi: Ing. J. Zemanová: In vitro cytotoxicita niklu.

ŠVOČ – 2005; 2. miesto v sekcii: Aplikovaná biológia a biotechnológia – doktorandi: Ing. J. Zemanová: Účinok niklu na funkciu a štruktúru semenníkov.

ŠVOČ – 2004; 1. miesto v sekcii: Aplikovaná biológia a biotechnológia – študenti: J. Zemanová: Stanovenie výskytu patologických spermíí u býkov, baranov a žrebcov.