

OBSAH



Zoznam skratiek a značiek	4
Úvod	5
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky	6
1.1 Ortuť	6
1.1.1 História	6
1.1.2 Hlavné zdroje a použitie ortuťí	7
1.1.3 Výskyt ortuťi v potravinách a surovinách	9
1.1.4 Vplyv ortuťi na živé organizmy	11
1.2 Reprodukčná sústava	20
1.2.1 Reprodukčný systém samcov	20
1.2.1.1 Štruktúra a funkcia reprodukčného systému samcov	20
1.2.1.2 Účinky ortuťi na reprodukčný systém samcov	28
1.2.2 Reprodukčný systém samíc	30
1.2.2.1 Štruktúra a funkcia reprodukčného systému samíc	30
1.2.2.2 Účinky ortuťi na reprodukčný systém samíc	33
2 Cieľ práce	36
3 Materiál a metódy	37
3.1 Experimentálna práca so spermiami	37
3.1.1 Detekcia pohyblivosti spermíí	37
3.1.2 Detekcia membránovej integrity spermíí	38
3.2 Experimentálna práca s granulóznymi bunkami	39
3.2.1 Príprava, spracovanie a kultivácia granulóznych buniek	39
3.2.2 Stanovenie produkcie progesterónu (P4) a IGF-I	40
3.2.3 Detekcia apoptózy v granulóznych bunkách	41
3.3 Matematicko – štatistické vyhodnotenie výsledkov	41
4 Výsledky	42
4.1 Pohyblivosť spermíí	42
4.2 Membránová integrita spermíí	53
4.3 Produkcia progesterónu (P4) a IGF-I	54
4.4 Apoptóza v granulóznych bunkách	57
5 Diskusia	59
5.1 Pohyblivosť spermíí	59
5.2 Membránová integrita spermíí	60
5.3 Produkcia progesterónu a IGF-I	61
5.4 Apoptóza v granulóznych bunkách	64
6 Závěry a prínosy práce	67
7 Zoznam použitej literatúry	69
Abstrakt	85
Abstract	87

ABSTRAKT

Úvod: Ortuť ako jeden z ťažkých kovov patrí k najstarším a najznámejším toxickým látkam a kontaminantom životného prostredia.

Cieľom našej *in vitro* štúdie bolo zhodnotiť účinok ortuti (HgCl_2) na pohyblivosť a membránovú integritu králičích spermií, rovnako ako aj vyhodnotiť sekrečnú činnosť granulóznych buniek vaječníkov ošípaných a zistiť výskyt apoptózy po aplikácii HgCl_2 .

Metódy: Vzorky králičích ejakulátov boli získané od 21 dospelých králikov (NPPC, Lužianky - Nitra) v troch opakovaníach. Chlorid ortuťnatý bol pridaný k ejakulátu ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), a následne zriedený v pomeroch 1:5 – 100 (skupina A – 1:5; skupina B – 1:7; C – 1:9; D – 1:20; E – 1:40; F – 1:60; G – 1:80; H – 1:100). Pohyblivosť spermií bola hodnotená CASA systémom SpermVision™ programom and Annexin-V-FLOUS bol použitý pre detekciu membránovej integrity spermií. Posledná skupina bola kontrolná, bez prídavku ortuti. Granulózne bunky vaječníkov ošípaných boli inkubované s chloridom ortuťnatým (18 hodín) - skupina A ($0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), skupina B (riedenie 1:1), skupina C (riedenie 1:4), skupina D (riedenie 1:7), skupina E (riedenie 1:10) a kontrolná skupina (K) bez prídavku HgCl_2 . Množstvo IGF-I a progesterónu uvoľneného granulóznymi bunkami do kultivačného média bolo hodnotené metódou RIA. Pre analýzu apoptózy sme použili MEBSTAIN Apoptosis kit Direct, na detekciu TdT-mediátorových dUTP označených (TUNEL) reakcií.

Výsledky: Pri hodnotení králičích ejakulátov sa koncentrácia ortuti v médiu pohybovala v rozpätí od $5,0$ do $100 \mu\text{g HgCl}_2.\text{ml}^{-1}$. V čase 0 bola zistená najvyššia pohyblivosť v kontrolnej skupine ($67,09 \pm 8,72 \%$). Pohyblivosť v skupinách s prídavkom ortuti bola nižšia v porovnaní s kontrolnou skupinou. Signifikantné rozdiely boli zistené v čase 0 v skupinách s $55,59 - 100 \mu\text{g HgCl}_2.\text{ml}^{-1}$ ($P < 0,001$). Po 60 a 120 minútach inkubácie s HgCl_2 bola pohyblivosť signifikantne znížená skoro vo všetkých experimentálnych skupinách. Detailnejšia analýza vzdialenosti spermií (DAP, DCL a DSL) a parametrov rýchlosti (VAP, VCL a VSL) rovnako ako aj priamosti pohybu (STR), priamočiarosti (LIN), kmitania (WOB), amplitúdy laterálneho premiestnenia hlavičky (ALH) a frekvencie krížových úderov odhalila pokles v skupinách s najvyššou koncentráciou ortuti v porovnaní s kontrolou vo všetkých časových obdobiach. Detekcia spermií s poškodenými membránami bola vykonaná v skupinách s vyššími koncentraciami ortuti a kontrolnej skupine s použitím Annexin-V-FLUOS. Výsledky analýzy preukázali vyšší výskyt pozitívnych spermií v skupinách s prídavkom ortuti, kde boli pozorované zmeny v anteriálnej časti hlavičky (akrozóm), spojovacej časti a na mitochondriálnom úseku bičička. V experimentoch s granulóznymi bunkami najvyššie uvoľnené množstvo IGF-I bolo zistené v skupine A ($50,31 \pm 5,99 \text{ ng.ml}^{-1}$) s prídavkom najvyššieho množstva HgCl_2 , ktoré bolo štatisticky preukazné ($P < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou ($32,14 \pm 3,79 \text{ ng.ml}^{-1}$). Signifikantný rozdiel ($P < 0,05$) bol zistený aj v skupine C ($23,13 \pm 3,12 \text{ ng.ml}^{-1}$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Granulózne bunky v ostatných pokusných skupinách produkovali nižšie koncentrácie IGF-I ako kontrola, ale bez preukazných zmien. Granulózne bunky v skupine A ($3,01 \pm 0,39 \text{ ng.ml}^{-1}$) uvoľnili podobné množstvo progesterónu v porovnaní s kontrolnou

skupinou ($4,04 \pm 1,35 \text{ ng.ml}^{-1}$). Ostatné pokusné skupiny (B, C, D, E) uvoľnili nižšie koncentrácie progesterónu, ktorý bol voči kontrolnej skupine štatisticky preukazný ($P < 0,01$; $P < 0,001$). Zistili sme i zvýšený výskyt apoptotických buniek vo všetkých pokusných skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. Preukazné rozdiely boli pozorované v skupine C ($P < 0,05$) a A ($P < 0,001$).

Záver: Zistené údaje potvrdzujú nepriaznivé účinky vysokých koncentrácií ortuti na parametre pohyblivosti králičích spermíí. V prípade granulóznych buniek sme zistili, že odlišné dávky ortuti zvýšili výskyt apoptotických buniek. Najvyššia koncentrácia ortuti použitá v našej štúdií mala za následok signifikantné zvýšenie koncentrácie IGF-I v médiu. Na druhej strane nižšie množstvá ortuti signifikantne znížili tvorbu progesterónu.

Kľúčové slová: ortuť, spermie, granulózne bunky, CASA, apoptóza, IGF-I, progesterón