

THE EFFECT OF TOXIC CONCENTRATIONS OF COPPER ON THE CELL VIABILITY IN VITRO

Kňažická Z., Tvrdá E., Lukáč N., Forgacs Z., Kerti A.

Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia

E-mail: zuzanaknazicka25@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of copper on the bovine sperm motility and viability of the cells isolated from the cell line H295R. In a more detailed analysis we examined how the concentration or toxic doses of copper (62.5; 125; 250; 500; 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$) chosen by us affects the parameters during different time periods of in vitro cultivation. We compared the control group (physiological solution without copper) with the experimental groups (exposed to different concentrations of $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$). The motility was determined using the Sperm VisionTM CASA system. At time 0hrs, the highest motility $90.30 \pm 4.22\%$ was detected in the control group. In the experimental groups the bovine sperm motility decreased significantly ($P < 0.001$) in comparison with the control. All chosen concentrations of copper inhibited the monitored indicator during all time periods. The second analysed parameter was the cell viability, which was determined by MTT Cell Proliferation Assay. After a 48-hour-cultivation with $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ we proved that the cell viability decreased proportionally to the increasing concentration of this essential trace element. All concentrations reduced significantly ($P < 0.001$) the survival of these cells. The decrease in the viability was already found at the minimal copper concentration of $62.5 \mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$ and it was $73.96 \pm 10.39\%$. The lowest cell viability was detected at the highest concentrations of copper ($500 \mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$ and $1000 \mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$), which was probably caused by the high toxicity of these concentrations and the cell was no longer able to resist them. These concentrations may lead to reproductive toxicity, which can be strongly reflected in the process of spermatogenesis.

Key words: copper, bovine sperm, cell line H295R, motility, viability, CASA, MTT assay, toxicity

Acknowledgments: This study was supported by the KEGA grant No. 101-001SPU-4/2010 and the APVV project No. SK-HU-0005-08.

ÚVOD

Ťažké kovy resp. stopové rizikové prvky sú veľmi diskutovanou témou, nakoľko svojimi účinkami pôsobia na živočíšne systémy resp. na reprodukciu. Mnohé z nich v tomto extrémne citlivom procese vyvolávajú subfertilné a infertilné stavy.

V súčasnej dobe sa do popredia záujmu výskumu zaraďuje aj esenciálny stopový prvok ako meď, ktorá má mimoriadny význam pre organizmus v rade enzymatických, aktivačných a regulačných procesoch. V organizme je rozhodujúca pre správnu funkčnosť aktívneho centra mnohých enzýmových systémov (cytochromoxidáza, diamínoxidáza, spermínooxidáza) (Gaetke a Chow, 2003) a vyznačuje sa vysokou antioxidačnou aktivitou (Cu/Zn superoxidázou) (Agarwal et al., 1990). Redukuje oxidačné procesy a spotrebu glukózy, čím znižuje alebo zastavuje pohyblivosť spermíí (Skandhan, 1992). Práve motilita spermíí je jednou zo základných selekčných kritérií na hodnotenie kvality ejakulátu. Energia potrebná pre tento pohyb sa akumuluje v mitochondriálnej pošve bičička, ktorá sa získava štiepením ATP. Ak sa spotrebuje exogénny zdroj energie, a rýchlo sa zmetabolizujú vlastné energetické zásoby, spermia po krátkom čase odumiera (Breuer a Wells, 1977). Tento významný biogénny prvok zohráva podstatnú úlohu aj v spermatogenéze, ktorá predstavuje extrémne komplikovaný proces vývoja vysokošpecializovanej samčej pohlavnej bunky. Podlieha svojim zákonitostiam, a je mimoriadne senzitívna na rôzne vplyvy, ktoré ju ľahko narušia. Oster a Salgo (1979) naznačili, že na potlačenie spermatogenézy majú výrazný vplyv chelátové komplexy medi.

Môžeme poznamenať, že meď na jednej strane pôsobí ako esenciálny prvok pre organizmus, pričom na opačnej strane je jej pôsobenie vo vysokých koncentráciách až toxické (Lukáč et al., 2007). Toto poznanie predurčuje výskum v danej oblasti a umožňuje odhaliť jej negatívne pôsobenie na subcelulárnej a celulárnej úrovni. Prejavy jej toxického účinku sú závislé od dávky expozície ako aj od typu buniek, ktoré poškodzujú (Kováč et al., 1997). Na špecifikáciu toxického účinku medi sme v experimente použili bunky z veľmi stabilnej bunkovej línie H295R, ktorá je derivovaná z ľudského karcinómu kôry nadobličiek (Gazdar et al., 1990; Staels et al., 1993; Harvey a Everett, 2003). Línia disponuje kompletnou sadou kľúčových enzýmov potrebných k steroidogenéze, vďaka čomu je veľmi dobre sledovaná interferencia xenobiotík v podmienkach *in vitro* (Sanderson, 2006; Hecker et al., 2007). Cytotoxický účinok tohto stopového prvku sme sledovali práve v týchto bunkách, nakoľko sa vyznačujú menšou senzibilitou k cytotoxicite v porovnaní s ostatnými bunkovými líniami (Gazdar et al., 1990; Sanderson et al., 2002).

V súvislosti s týmito spomínanými skutočnosťami sme v našej predkladanej práci zisťovali vplyv medi na motilitu boviných spermíí a životaschopnosť buniek vyizolovaných z bunkovej línie

H295R. V detailnejšej analýze sme skúmali, ako vplyvajú nami stanovené koncentrácie resp. toxické dávky medi na sledované parametre počas rôznej doby *in vitro* kultivácie.

MATERIÁL A METODIKA

1 Biologické materiály

1.1 Bovinné spermie

Na analýzu motility sme použili ejakuláty pohlavne dospelých plemenných býkov ($n=10$), ktoré boli získané rutinnými metódami z insemináčnej stanice býkov. Hodnotené vzorky museli spĺňať základné kritéria kladené pre daný druh hospodárskeho zvieratá. Čerstvý ejakulát sa získaval odberom do umelej vagíny valcovitého tvaru. Následne bol spracovaný v laboratóriu, kde bolo vykonané základné vyšetrenie a štandardne posúdený objem (ml), koncentrácia ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$) a pH podľa Gamčíka et al., (1992). Po spracovaní sa ejakuláty riedili fyziologickým roztokom (sodium chloride 0,9 % w/v, Bieffe Medital, Italia) v pomere 1:40 resp. v závislosti od hustoty ejakulátu. Ako kultivačné médium sme použili fyziologický roztok, do ktorého sa s rôznymi koncentraciami (62,5; 125; 250; 500; 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$) aplikovala meď vo forme $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Kontrolná skupina predstavovala čistý fyziologický roztok bez použitej medi. Následne sa spermie spolu so semennou plazmou (ako súčasť ejakulátu) a meďou kultivovali pri laboratórnej teplote (22 °C).

1.2 Adrenokarcinómové bunky

Na stanovenie životaschopnosti buniek bola použitá ľudská bunková línia adrenokarcinómových buniek H295R získaná od ATCC (American Type Culture Collections, Manassas, VA, USA), ktorá bola zmrazená a uskladnená v tekutom dusíku (-196 °C) do vykonania analýz. Pred samotným experimentom boli bunky z tejto línie rozmrazené, vyizolované, kultivované podľa protokolu Hilscherová et al. (2004) a pasážované podľa Heckera et al. (2006). Akonáhle sme dosiahli požadovaný počet bunkových suspenzií, tak sme nariedili výslednú koncentráciu t.j. 200 000-300 000 buniek/ml. Takto pripravené bunky sa nechali kultivovať v CO_2 inkubátore (37 °C, vlhkej atmosfére 95 %, 5 % CO_2) po dobu 24 hodín, aby došlo k ich opätovnému prisadnutiu na dno kultivačných platničiek. Po tejto inkubácii sme kultivačné médium vymenili za nové, obsahujúce už meď vo forme $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), ktorú sme rozpustili v kultivačnom médiu a zriedili na požadované koncentrácie (62,5; 125; 250; 500; 1000 $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$). Takto pripravené nariedené roztoky sa následne pridali k bunkám, ktoré prešli 48-hodinovou kultiváciou v CO_2 inkubátore (37 °C, vlhkej atmosfére 95 % vzduchu a 5 % CO_2).

2 Analytické metódy

2.1 Motilita spermíí

Po *in vitro* inkubácií sme základné parametre pre pohybovú aktivitu boviných spermíí sledovali pomocou systému CASA (Computer assisted/automated semen analysis) s využitím SpermVision™ (MiniTüb, Germany) programu s optickým mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japan). Jedná sa o systém pozostávajúci z mikroskopu a počítačovej zostavy, kde sa pomocou vysokofrekvenčnej kamery a softwaru vykoná analýza. Prímárne sa hodnotia ukazovatele identifikácie rýchlosti pohybu analyzovaných spermíí a sekundárne overovanie kvality parametrov spracovaných ejakulátov. Kvalitatívne parametre resp. fyziologické prejavy spermíí sa posudzovali ihneď po pridaní medi (0h), ale i v ďalších časových intervaloch (1h, 2h, 24h). V každej analýze sa zhodnotilo 1000–1500 spermíí.

2.2 Cytotoxicita

Cytotoxicitu buniek vystavených rôznym koncentráciám medi *in vitro* sme stanovovali mitochondriálnym toxickým testom (MTT) podľa Mosmanna (1983). Princíp tejto kolorimetrickej metódy spočíva v meraní konverzie rozpustnej žltej tetrazoliovej soli (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyln tetrazoliumbromid) na modrofialový, vo vode nerozpustný formazán. Reakcia prebieha za prítomnosti mitochondriálnej dehydrogenázy vitálnych buniek. Množstvo zreagovaného MTT je úmerné počtu buniek, ktoré nám prežili (Mosmann, 1983).

MTT test sme najprv rozpustili v sterilnom PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma, St.Louis, USA) s výslednou koncentráciou 1,5 mg.ml⁻¹. Odmerná banka bola obalená alobalom, aby sa zabránilo k prístupu svetla a uchovaná pri teplote 4 °C. Následne sa bunky v množstve 2x10⁵ inkubovali v 96-jamkových platničkách (Grainer, Germany) s testovanými koncentráciami medi v celkovom objeme 100 µl/jamku. Po ukončení kultivácie sme pipetou dané množstvo odstránili. Následne sa do každej titračnej jamky pridalo 10 µl žltej tetrazoliovej soli MTT (Sigma, St. Louis, USA). Po 3-hodinovej kultivácii v CO₂ inkubátore (37 °C, 95 % atmosfére a 5 % CO₂) sa bunky a formazánové kryštáliky rozpustili pridaním silného detergentu t.j. 180 µl/jamku oksyleného (0,08 N HCl) izopropanolu, čím sa reakcia zastavila. Absorbancia sa determinovala spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 570 nm oproti 630 nm podľa referencie na mikroplatničkovom snímači ELISA Readeru (Anthos MultiRead 400, Austria).

3 Štatistická analýza

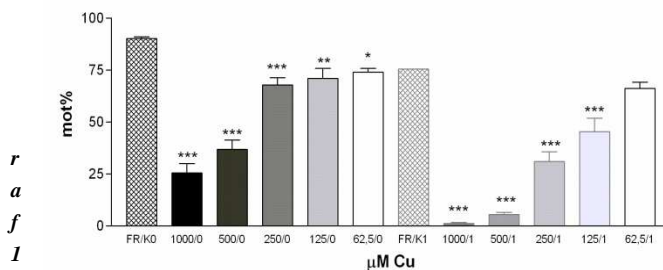
Dosiahnuté výsledky boli spracované počítačovým štatistickým programom GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego California USA) a pomocou MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) sme vypočítali základné štatistické ukazovatele (aritmetický priemer, minimálnu a maximálnu hodnotu, smerodajnú odchýlku a variačný koeficient). Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolou a pokusnými skupinami bola zistená t-testom na hladine štatistickej významnosti alfa = 99,99.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Experiment 1: Motilita spermíí inkubovaných s meďou

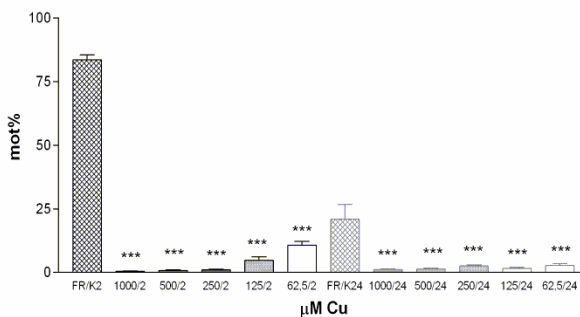
Problematika vplyvu stopových rizikových prvkov na prežívateľnosť spermíí je v súčasnosti veľmi diskutovanou témou. Patrí k nim aj meď, ktorá zohráva zásadnú úlohu v procese spermatogenézy a v infertilitě (Aydemir et al. 2006). Sledovaným ukazovateľom bola pohyblivosť býčích spermíí resp. percentuálna motilita spermíí priamočiaro za hlavičkou ($>5\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), ktorá sa merala po kultivácii s meďou. Výsledky tejto *in vitro* inkubácie prezentujeme v tabuľke 1. Porovnávali sme kontrolnú skupinu (fyziologický roztok bez aplikácie $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) s pokusnými skupinami (vystavené účinku $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ s rôznymi koncentraciami) v rôznych časových intervaloch (0h, 1h, 2h, 24h).

Na začiatku pokusu (0h) bola zistená v kontrolnej skupine (K) priemerná hodnota motility $90,30\pm 4,22\%$, čo zároveň predstavovala najvyššiu hodnotu zo všetkých sledovaných skupín. V tomto časovom intervale sme najvýraznejší pokles percentuálnej pohyblivosti v porovnaní s kontrolou, zaznamenali v pokusnej skupine A $25,64\pm 2,11\%$, kde sa aplikovala najvyššia koncentrácia meďi ($1000\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pri porovnaní K:A, K:B a K:C sa preukáže znížila motilita spermíí ($P<0,001$). Najvyššia hodnota sledovaného ukazovateľa bola detekovaná v skupine E $74,06\pm 9,30\%$ s použitím minimálnej koncentrácie meďi ($62,5\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zároveň bola skupina štatisticky preukazná ($P<0,05$) v porovnaní s kontrolou. Po uplynutí 60 minútovej kultivácie kontrolná skupina dosiahla pokles pohyblivosti spermíí na hodnotu $75,53\pm 16,26\%$. Pri porovnávaní výsledkov s 0h začala životaschopnosť spermíí v pokusných skupinách zreteľne klesať. Najnižšia pohyblivosť bovinných spermíí $1,26\pm 1,98\%$ bola zaznamenaná v skupine A s maximálnou koncentráciou meďi ($1000\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$). Znížená tendencia sledovaného ukazovateľa bola detekovaná aj v experimentálnych skupinách B $5,53\pm 5,16\%$ C $31,03\pm 22,96\%$ a D $45,35\pm 32,59$. Počas tejto krátkodobej kultivácie sa v skupine E s najnižšou koncentráciou meďi, dosiahla najvyššia vitalita bovinných spermíí, a to $66,20\pm 14,56\%$. Pri testovaní závislosti sme zistili vysokú signifikantnosť ($P<0,001$) sledovaného ukazovateľa medzi K:A, K:B, K:C a K:D. Skupina E nebola štatisticky preukazná ($P>0,05$) v porovnaní s kontrolou.



Vplyv meďi na motilitu spermíí v časovom intervale 0h a 1h

Po 120 minútach inkubácie so síranom meďnatým ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sme zistili stúpajúcu hodnotu motility v kontrolnej skupine $83,55 \pm 8,94\%$, čo mohlo byť spôsobené tým, že spermie na začiatku neadekvátne spotrebovali vlastné energetické zásoby. Táto energetická potreba resp. metabolická energia, ktorú deponujú vo forme ATP, vyžadujú pre široké spektrum svojich funkcií, ale predovšetkým na podporu motility (Breuer a Wells, 1977). V tomto časovom intervale bola zaznamenaná vo všetkých pokusných skupinách preukazne znížená motilita boviných spermií ($P < 0,001$). Najvýraznejší inhibičný účinok bol detekovaný pri najvyšších toxických koncentráciách meďi ($500 \mu\text{M} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{M} \cdot \text{ml}^{-1}$), ktorých hodnoty boli pomerne vyrovnané. Určitá životaschopnosť boviných spermií, tak ako aj predchádzajúcich časových intervaloch bola detekovaná v skupine E s minimálnou koncentráciou meďi, a to $10,72 \pm 7,52\%$.



Graf 2 Vplyv meďi na motilitu spermií v časovom intervale 2h a 24h

Počas dlhodobej kultivácie (24h) bola priemerná motilita kontrolnej vzorky $20,87 \pm 28,50\%$. Zreteľný bol časovo závislý pokles tohto ukazovateľa v kontrolnej skupine pri porovnaní s ostatnými časovými intervalmi. Pohyblivosť spermií v pokusných skupinách bola v porovnaní s kontrolou veľmi znížená. Najnižšiu hodnotu motility sme zaznamenali v skupine A, a to $1,13 \pm 1,72\%$. Zároveň sa dokázala vysoká signifikantnosť ($P < 0,001$) percentuálnej motility medzi kontrolou a všetkými pokusnými skupinami. Podobnou experimentálnou prácou sa zaoberali Roychoudhury a Massanyi (2008), ktorý sledovali v tých istých časových intervaloch (0h, 1h, 2h) pohybové parametre králičích spermií. Boli kultivované s $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ktorá sa pridala k ejakulátu v 5% roztoku a zriedovala v pomere 1:1-10. V 0h bola v kontrolnej skupine zaznamenaná najvyššia motilita. V pokusných skupinách dochádzalo k významnému ($P < 0,05$) poklesu pohyblivosti spermií. Najnižšiu hodnotu posudzovaného ukazovateľa zaznamenali v skupine s najvyššou koncentráciou meďi. Zistenými údajmi dokázali, že vysoké koncentrácie mali negatívny efekt na motilitu spermií, čo potvrdzujú aj výsledky našej práce. Roychoudhury et al. (2010) svojou ďalšou experimentálnou prácou zistili, že už pri koncentrácii $4,85 \mu\text{g CuSO}_4 \cdot \text{ml}^{-1}$, dochádza k negatívemu

MENDELNET 2010

efektu vo vzťahu k motilite, morfológií a membránovej integrite. Množstvo medi v ejakulátoch je u jednotlivých druhov zvierat rozdielne. Pri porovnaní hladín tohto stopového rizikového prvku u rôznych druhoch zvierat boli zaznamenané experimentálnych prácach Lukáča et al. (2007) významné medzidruhové rozdiely. Najvyššie množstvo bolo zistené v insemináčnych dávkach králikov ($20,10 \pm 4,09 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Mnohé odborné práce poukazujú na negatívne účinky medi na spermiiach aj v podmienkach *in vitro*. Rozsah poškodenosti však závisí od toho, či ejakulát resp. spermie sú zbavené semennej plazmy, ktorá plní ochrannú funkciu proti nepriaznivým exogénnym vplyvom prostredia. Scielli a Zinaman (1993) poukázali na fakt, že spermie bez semennej plazmy sú senzibilnejšie na tento stopový prvok. Katayose et al. (2004) potvrdili svojou experimentálnou prácou, že vyššie koncentrácie medi v semennej plazme mali nepriaznivé vplyvy na pohyblivosť spermií, pričom poznamenali, že metabolické pochody práve závisia od energetických zdrojov nachádzajúcich sa v spojovacom oddieli bičička spermie a v semennej plazme.

Tabuľka 1 Základné štatistické ukazovatele motility boviných spermií pri rôznych koncentráciách medi v rôznych časových intervaloch

Skupina	K	62,5	125	250	500	1000
μM Cu.ml ⁻¹						
0 h						
x	90,30	74,06 ^C	71,11 ^B	67,86 ^A	36,98 ^A	25,64 ^A
minimum	81,94	50,00	21,42	30,43	5,55	0,00
maximum	96,55	87,12	92,68	89,51	75,71	68,42
S.D.	4,22	9,30	23,43	17,02	21,48	22,11
CV (%)	4,68	12,56	32,95	25,08	58,09	86,27
1 h						
x	75,53	66,20	45,35 ^A	31,03 ^A	5,532 ^A	1,26 ^A
minimum	40,00	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00
maximum	96,51	88,23	84,21	61,90	19,44	7,50
S.D.	16,26	14,56	32,59	22,96	5,16	1,98
CV (%)	21,53	22,00	71,86	73,98	93,36	156,98
2 h						
x	83,55	10,72 ^A	4,83 ^A	1,06 ^A	0,78 ^A	0,43 ^A
minimum	57,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
maximum	96,66	30,30	19,23	4,76	4,25	2,89
S.D.	8,94	7,52	6,57	1,27	1,31	0,88
CV (%)	10,70	70,25	136,03	119,86	166,98	202,90
24 h						
x	20,87	2,78 ^A	1,58 ^A	2,49 ^A	1,28 ^A	1,13 ^A
minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
maximum	84,78	15,38	8,33	9,09	11,11	6,06
S.D.	28,50	3,69	2,05	2,50	2,35	1,72
CV (%)	136,59	132,67	129,35	100,40	183,04	153,07

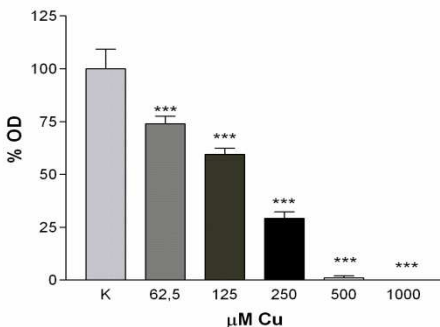
x – aritmetický priemer, S.D. – smerodajná odchýlka, CV (%) – variačný koeficient

^A P<0.001, ^B P<0.01, ^C P<0.05

Experiment 2: Životaschopnosť buniek inkubovaných s meďou

Druhým sledovaným parametrom bola viabilita buniek, ktorú sme hodnotili po 48-hodinovej kultivácii s meďou. Vychádzali sme z bunkovej línie H295R, ktorá je v poslednej dobe najúspešnejšou používanou líniou pre výskum (Heneweer et al. 2004; Hilscherová et al. 2004; Lee et al. 2005). Cytotoxický účinok sledovaného prvku sme stanovovali v podmienkach *in vitro* pomocou proliferačného MTT testu, ktorého základné štatistické ukazovatele prezentujeme v tabuľke 2. Výsledky sme vyjadrili v percentách kontroly (100%). Ako kontrolná skupina (K) nám slúžili bunky, ktoré boli inkubované bez prítomnosti medi (optická denzita formazánu z buniek nevystavená účinku testovaného prvku). Vo všetkých pokusných skupinách bola zistená vysoká preukaznosť rozdielov ($P < 0,001$) v sledovanom ukazovateli v porovnaní s kontrolnou skupinou. Prežiteľnosť buniek po inkubácii s meďou sme zaznamenali v grafe 3.

Stanovenie životaschopnosti buniek je veľmi dôležité pre *in vitro* podmienky. V súčasnosti sa používajú mnohé metódy, ktoré zaručujú, že bunky zostanú neporušené. V našej experimentálnej práci sme použili kolorimetrickú metódu, založenú na využití soli tetrazolia MTT, ktorá je redukovaná mitochondriovou dehydrogenázou do častíc formazánu (Mosmann, 1983). Neporušenosť a aktivita mitochondrií je interpretovaná ako stupeň životaschopnosti buniek, ktorá umožňuje bunkám redukovať tetrazoliové soli. Po 48-hodinovej kultivácii s $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sme MTT testom dokázali, že životaschopnosť buniek získaných z veľmi stabilnej bunkovej línie H295R, nadobúdala celkovo klesajúcu tendenciu v porovnaní s kontrolnou skupinou. Všetky nami sledované koncentrácie signifikantne ($P < 0,001$) znižovali prežívanie týchto buniek. Pokles viability bol už pri minimálnej koncentrácii medi ($62,5 \mu\text{M} \cdot \text{ml}^{-1}$), a to na $73,96 \pm 10,39\%$, pričom hodnota priamoúmerne klesala so zvyšovaním koncentrácie tohto prvku. Najnižšia životaschopnosť buniek bola detekovaná pri najvyšších koncentráciách medi ($500 \mu\text{M} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $1000 \mu\text{M} \cdot \text{ml}^{-1}$), čo bolo pravdepodobne spôsobené vysokou toxicitou týchto dávok, ktorým sa už bunka nedokázala ubrániť. Tým sa nám potvrdil predpoklad, že meď v týchto koncentráciách poškodzuje a znižuje aktivitu mitochondrií, ktoré už nedokážu zabezpečiť energiu potrebnú pre zachovanie životných procesov bunky.



Graf 3 Vplyv medi na viabilitu buniek po 48-hodinovej kultivácii (MTT redukčný test)

Tabuľka 2 In vitro cytotoxicita medi na životaschopnosť buniek vyjadrenú v % kontroly

Skupina	K	62,5	125	250	500	1000
	µM Cu.ml ⁻¹					
48 h						
x	100,0	73,96 ^A	59,52 ^A	29,17 ^A	1,04 ^A	0,00 ^A
minimum	66,67	58,33	50,00	16,67	0,00	0,00
maximum	150,0	91,67	75,00	41,67	8,33	0,00
S.D.	29,40	10,39	7,49	8,90	2,94	0,00
CV (%)	29,40	14,04	12,59	30,54	282,72	0,00

x – aritmetický priemer, S.D. – smerodajná odchýlka, CV (%) – variačný koeficient

^A P<0.001, ^B P<0.01, ^C P<0.05

ZÁVĚR

Z vyplývajúcich výsledkov našej analýzy môžeme skonštatovať, že meď v týchto sledovaných koncentráciách negatívne ovplyvňovala sledované parametre t.j. motilitu spermií a viabilitu buniek.

Ako stopový rizikový prvok pôsobí inhibične na percentuálnu pohyblivosť spermií vo všetkých nami sledovaných časových periódach. Aj keď najnižšia koncentrácia medi (62,5 µM Cu.ml⁻¹) pôsobila z pokusných skupín najviac stimulačne, neovplyvňovala sledovaný ukazovateľ výrazne. Dosiahnuté hodnoty motility boli relatívne nízke. Najvýraznejšie inhibičné účinky na celkovú aktivitu boviných spermií sme zaznamenali pri aplikácii najvyšších koncentrácií medi (500 µM.ml⁻¹ a 1000 µM.ml⁻¹), čím sa nám potvrdil ich silný toxický účinok. Sledované koncentrácie vedú k reprodukčnej toxicite, čo je dokázané v spermatogéneze. Z našich výsledkov môžeme potvrdiť tento negatívny efekt na parametroch pohyblivosti spermií.

Pri druhom sledovanom ukazovateli, životaschopnosť buniek priamo úmerne klesala so zvyšovaním koncentrácie tohto prvku. Usudzujeme, že to bolo spôsobené vysokou toxicitou týchto dávok, ktoré pôsobili deštruktívne na mitochondrie resp. na enzymatický komplex, prostredníctvom ktorého dochádzalo k tvorbe energií. Bunky už nedokázali využiť túto energiu, ktorá je potrebná pre zachovanie ich činnosti. Zároveň sa nám potvrdilo, že tieto koncentrácie medi nemali proliferačný efekt na bunku.

Prejavy toxického účinku medzi sú relatívne závislé od koncentrácie, preto predmetom ďalších výskumných prác by mali byť aj nižšie dávky, ktoré by priniesli ďalšie pozoruhodné výsledky v tejto oblasti. Zároveň by sme tým získali ucelenejší pohľad o účinku medi v pohlavných bunkách, a tým aj v reprodukčnom systéme. Závěry z tejto experimentálnej práce by mohli byť využité ako podkladový materiál pre ďalší výskum pri prevencii alebo liečbe problémov spojených s infertilitou.

LITERATURA

- Agarwal, K., Sharma, A., Talukder, G. (1990): Clastogenic effects of cooper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo. In *Mutat. Res.*, vol. 243, 1990, pp. 1–6.
- Aydemir, B., Kiziler, A.R., Onaran, I., Alici, B., Ozkara, H., Akyolcu, M.C. (2006): Impact of Cu and Fe concentration on oxidative damage in male infertility. In *Biol Trace Elem Res*, vol. 112, 2006, pp. 193-203.
- Breuer, D.J., Wells, M.E. (1977): Effect of *in vitro* Incubation of Bovine Spermatozoa in Bovine Follicular Fluid. In *J. Anim. Sci.*, vol. 44, 1977, pp. 262–265.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. In *Toxicology*, vol. 189, 2003, pp. 147-163.
- Gamčík, P., Kozumolík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrín, M. (1992): *Andrológia a inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava : Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
- Gazdar, A.F., Oie, H.K., Shackleton, C.H. et al. (1990): Establishment and Characterization of a Human Adrenocortical Carcinoma Cell-Line That Expresses Multiple Pathways of Steroid-Biosynthesis. In *Cancer Research*, vol. 50, 1990, no.17, pp. 5488-5496.
- Harvey, P.W., Everett, D.J. (2003): The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health. In *Journal Appl. Toxicol.*, vol. 23, 2003, no. 2, pp.81-87.
- Hecker, M., Hollert, M., Cooper, R. et al. (2007): The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of *in vitro* inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production. Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. In *Env. Sci. Pollut. Res.*, vol. 14, 2007, pp. 23-30.
- Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B. et al. (2006): Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 217, 2006, pp. 114-124.
- Heneweer, M. et al. (2004): A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as *in vitro* screening tools for effects on aromatase. In *Toxicology Letters*, vol. 146, 2004, no. 2, pp. 183-194.
- Hilscherová, K., Jones, P.D., Gracia, T. et al. (2004): Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. In *Toxicological Science*, vol. 81, 2004, no.1, pp. 78-89.

Katayose, H., Shinohara, A., Chiba, M., Yamada, H., Tominaga, K., Sato, A. et al. (2004): Effects of various elements in seminal plasma on semen profiles. In *J Mam Ova Res*, vol. 21, 2004, pp. 141-148.

Kováč, G., Baldovič, R., Mudroň, P., Bartko, P. et al. (1997): Koncentrácia AI v krvnom sére hovädzieho dobytku v závislosti na veku, gravidite a sezóne. In *Aktuálne problémy šľachtění, zdraví, růstu a produkce skotu*. České Budějovice, 1997, s. 277-278.

Lee, S.K., Owens, G.A. et al. (2005): Exposure to low concentrations of di-n-butyl phthalate during embryogenesis reduces survivability and impairs development of *Xenopus laevis* frogs. In *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 68, 2005, no. 10, pp. 763-772.

Lukač, N. et al. (2007): *Stopové prvky a kvalita spermií*. 1. vyd. Nitra : SPU, 2007. 118 s. ISBN 978-80-8069-904-8.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In *Journal Immunol Methods*, vol. 65, 1983, pp. 55 – 63.

Oster, G., Salgo, M.P. (1979): Copper in mammalian reproduction. In *Adv Pharmacol Chemother*, vol. 14, 1979, pp. 327–409.

Roychoudhury, S., Massanyi, P. (2008): *In vitro* copper inhibition of the rabbit spermatozoa motility. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, vol. 43, 2008, pp.651-656.

Roychoudhury, S., Massanyi, P., Bulla, J., Choudhury, M.D. et al. (2010): In vitro copper toxicity on rabbit spermatozoa motility, morphology and cell membrane integrity. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, vol. 45, 2010, pp. 1482-1491.

Sanderson, J.T. (2006): The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. In *Toxicological Sciences*, vol. 94, 2006, no. 1, pp. 3-21.

Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G. et al. (2002): Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 182, 2002, no. 1, pp. 44-54.

Scialli, R.A., Zinaman, J.M. (1993): *Reproductive toxikology and infertility*. McGraw-Hill, New York, 1993, p. 338.

Skandhan, K.P. (1992): Review on copper in male reproduction and contraception. In *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, vol. 87, 1992, no. 12, pp. 594-608.

Staels, B., Hum, D.W., Miller, W.L. et al. (1993): Regulation of Steroidogenesis in Ncl-H295 Cells – a Cellular-Model of the Human Fetal Adrenal. In *Molecular Endocrinology*, vol. 7, 1993, no. 3, pp. 423-433.