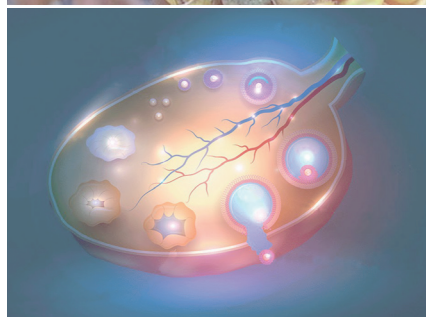


Adriana Kolesárová
Marek Halenár
Marína Kiko Medved'ová
Nora Maruniaková

**Ovariálne funkcie
modulované
sekundárnymi metabolitmi
mikroskopických húb –
mykotoxínmi**

Nitra 2017



- Názov:** Ovariálne funkcie modulované sekundárnymi metabolitmi mikroskopických húb – mykotoxínmi
- Autori:** **prof. Ing. Adriana Kolesárová, PhD. (2,3 AH)**
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra fyziológie živočíchov
Ing. Marek Halenár, PhD. (2,18 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra fyziológie živočíchov
Ing. Marína Kiko Medveďová, PhD. (1,05 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra fyziológie živočíchov
Ing. Nora Maruniaková, PhD. (1,05 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra fyziológie živočíchov
- Recenzenti:** **prof. RNDr. Alexander Sirotkin, DrSc.**
Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre
Fakulta prírodných vied, Katedra zoológie a antropológie
prof. Ing. Dana Tančinová, PhD.
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra mikrobiológie

Schválil rektor Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre
dňa 13. 9. 2017 ako vedeckú monografiu.

ISBN 978-80-552-1706-2

OBSAH

Zoznam skratiek a značiek	5
Úvod	7
1. Vaječníky a ich funkcie	9
1.1 Charakteristika a morfológická stavba	9
1.2 Folikulogenéza.....	10
1.3 Ovulácia.....	13
1.4 Luteinizácia	15
2. Regulácia ovariálnych funkcií	17
2.1 Regulácia cez os hypotalamus – hypofýza – vaječníky	17
2.2 Regulácia cytodiferenciácie a vývoja folikulu	19
2.3 Regulácia primordiálnych folikulov a oogenézy.....	19
2.4 Regulácia primárnych a sekundárnych / antrálnych folikulov	20
2.5 Regulácia predovulačných zmien a ovulácie	22
2.6 Regulácia žltého telieska	24
2.7 Regulácia výberu folikulov.....	25
3. Steroidogenéza a steroidné hormóny	27
3.1 Charakteristika syntézy steroidov	27
3.2 Estrogény – 17- β -estradiol.....	29
3.3 Gestagény – progesterón	30
4. Proliférácia a bunkový cyklus	33
4.1 Charakteristika a význam.....	33
4.2 Regulátory bunkového cyklu.....	33
5. Apoptóza.....	35
5.1 Charakteristika a význam.....	35
5.2 Morfológické prejavy apoptózy	35
5.3 Mechanizmus apoptózy.....	35
5.4 Indukcia apoptózy.....	37
6. Mykotoxíny – fuzáriové toxíny.....	39
6.1 Charakteristika, klasifikácia, výskyt.....	39
6.2 Deoxynivalenol.....	41
6.3 Zearalenón.....	42
6.4 T-2 toxín.....	44
6.5 Definícia chemických látok narúšajúcich endokrinný systém vydaná Európskou komisiou	46
7. Účinky fuzáriových mykotoxínov na bunky vaječníkov	49
7.1 Účinky DON, ZEA, T-2 a HT-2 toxínu na sekrečnú aktivitu	50
7.2 Účinky DON, ZEA, T-2 a HT-2 toxínu na markery proliferácie	54
7.3 Účinky DON, ZEA, T-2 a HT-2 toxínu na apoptózu.....	57
8. Záver	61
9. Summary	65
10. Použitá literatúra	69

Podakovanie

Srdečné poďakovanie patrí Dr. h. c. prof. Ing. Jozefovi Bullovi, DrSc. za vzácne rady, profesionálny a priateľský prístup a cennú spoluprácu.

Autori úprimne ďakujú Výskumnému ústavu živočíšnej výroby Nitra NPPC, predovšetkým Odboru genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat a Odboru malých hospodárskych zvierat za spoluprácu a tiež firme Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln, Rakúsko za poskytnutie mykotoxínov.

Podakovanie patrí aj recenzentom prof. RNDr. Alexandrovi V. Sirotkinovi, DrSc. z Katedry zoológie a antropológie, Fakulty prírodných vied UKF v Nitre, prof. Ing. Dane Tančinovej, PhD. z Katedry mikrobiológie, Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre a vedúcemu Katedry fyziológie živočíchov prof. MVDr. Petrovi Massányimu, DrSc., Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre, za odborné posúdenie, ako aj Ing. Ľubici Ďudákovovej, vedúcej Vydavateľstva SPU v Nitre a jej tímu za technickú, grafickú a jazykovú korektúru.

Experimentálna časť bola finančne podporená projektami Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-0304-12, SK-FR-2015- 0009, Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0022/13, 1/0039/16, Kultúrnou a edukačnou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky KEGA 011SPU-4/2016.

Vydanie vedeckej monografie bolo finančne podporené Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-0304-12.

Autori

Zoznam skratiek a značiek

Apaf-1	faktor-1 aktivujúci apoptotické proteázy
ATA	alimentárna toxická aleukia
ATP	adenozíntrifosfát
Bad	proapoptotický proteín
Bak	proapoptotický proteín
Bax	Bcl-2 – asociovaný X proteín
Bcl-2	antiapoptotický proteín
Bcl-XL	Bcl-2 závislé formy génov X
BH	Bcl-2 homológia doména 3,4
Bid	BH3 interagujúca doména
BMP	kostné morfogenetické proteíny (2, 4, 6, 15)
Bok	propoptotický proteín
Ca ²⁺	kalciový ión
cAMP	cyklický adenoínmonofosfát
Cdk	cyklín-závislé kinázy (1, 2, 4, 6)
C ₂₁ H ₃₀ O ₂	chemický vzorec pre progesterón
C ₂₄ H ₃₄ O ₉	chemický vzorec pre T-2 toxín
C ₂₂ H ₃₂ O ₈	chemický vzorec pre HT-2 toxín
cyt. c	cytochróm c
DAS	diacetoxy-scirpenol
dATP	deoxyadenozíntrifosfát
DHEA	dehydroepiandrosterón
DHEAS	DHEA-sulfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DON	deoxynivalenol
E	estrogén
E ₂	17β-estradiol
E ₃	estriol
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
EGF	epidermálny rastový faktor
ELISA	imunologická metóda na detekciu protilátok
ER	estrogénový receptor
F	<i>Fusarium</i>
Fas	transmembránový proteín patriaci do TNF superrodiny
FGH	fibroblastový rastový faktor
FSH	folikulostimulačný hormón
GDF	rastový a diferenciačný faktor
GH	rastový hormón
G ₀	G ₀ -fáza bunkového cyklu
G ₁	gap-1 fáza bunkového cyklu
G ₂	gap-2 fáza bunkového cyklu
GnRH	gonadotropín-uvolňujúci hormón
hCG	humánny choriový gonadotropín
HeLa	humánna línia buniek karcinómu krčka maternice
HepG2	humánne bunky pečene zastavené v G2 fáze
HL-60	humánne bunky promyelocytovej leukémie
17β-HSD-I	17β-hydroxysteroiddehydrogenáza-1
3β-HSD-II	3β-hydroxysteroiddehydrogenáza-2
Hsp-60	proteín tepelného šoku-60
HT-29	bunková línia karcinómu hrubého čreva
H295R	humánna línia adrenokortikálnych karcinómových buniek
IEC-6	intestinálna epitelálna línia buniek

OVARIÁLNE FUNKCIE MODULOVANÉ SEKUNDÁRNYMI METABOLITMI MIKROSKOPICKÝCH HŮB – MYKOTOXÍNMI

IFN-g	interferón-g
IGF	inzulínu podobný rastový faktor
IGF-I	inzulínu podobný rastový faktor typu I
IGF-II	inzulínu podobný rastový faktor typu II
IGFBP	väzbové proteíny pre IGF
IgG	imunoglobulín G
IH	inhibičné hormóny
IPCS	medzinárodný program chemickej bezpečnosti
JECFA	spoločný vedecký výbor FAO a WHO pre aditívne látky v potravinách
LDL	lipoproteíny s nízkou hustotou
LH	luteinizačný hormón
M	mitóza
MAP	mitogen aktivovaný proteín
MAPK	mitogen aktivovaná proteínkináza
MCF-7	bunková línia karcinómu prsníka
MMP	mitochondriálny medzibunkový priestor
MPF	faktor podporujúci maturáciu
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MXC	metoxychlór
NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NHLF	humánne bunky normálnych pľúcnych fibroblastov
NIV	nivalenol
OMI	inhibitor dozrievania oocytov
P ₄	progesterón
P450arom	P450 aromatáza
P450c17	17 α -hydroxyláza/17,20 lyáza/17,20 dezmoláza
P45011 α 1	enzým štiepiaci bočné refazce cholesterolu
P450scc	P450 enzým štiepiaci bočné refazce
p53	tumorový proteín 53
p51	tumorový proteín 51
PCNA	proliferačný bunkový jadrový antigén
PCOS	syndróm polycystických vaječníkov
PGE 2	prostaglandín E-2
PGF2 α	prostaglandín F2 α
PI3K	fosfatidylinozitol-3 kináza
PKA	proteínkináza A
PKB	proteínkináza B
PRL	prolaktín
RNA	ribonukleová kyselina
RPTEC	humánne proximálne epiteliálne bunky obličiek
S	syntetická fáza bunkového cyklu
SCF	vedecký výbor pre potraviny
SF-1	steroidogénny faktor 1
SHBG	globulíny viažúce pohlavné hormóny
STAR	steroidogénny akútny regulačný proteín
TGF β	transformačný rastový faktor- β
TK	tyrozín kináza
TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor- α
TNFR-1	receptor pre TNF
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
β -ZOL	β -zearalenol
ZEA	zearalenón
ZEA-E2-R	komplex ZEA- E2-receptor

Úvod

Súčasná spoločnosť je neustále vystavená vplyvu rizikových faktorov, medzi ktoré patria toxínogénne mikroskopické huby, resp. produkty ich metabolickej činnosti – mykotoxíny, vyskytujúce sa v potravinách, krmivách či v životnom prostredí. Mikroskopické huby rodu *Fusarium* sú široko rozšírené v prírode a sú súčasťou pôdneho ekosystému, kde sa podieľajú na rozklade organickej hmoty. Často napádajú kukuricu, ovocie, zemiaky, obilniny a citrusy. Termín mykotoxín je odvodený z gréckeho slova „mycos“, čo znamená, huba, a latinské slovo „toxicum“, čo znamená jed. Mykotoxíny majú relatívne nízku molekulovú hmotnosť a sú to sekundárne metabolity, ktoré sú škodlivé pre zvieratá a ľudí. Napriek mnohým štúdiám, ktoré dokazujú, že fuzáriové toxíny nepriaznivo vplyvajú na zdravie a reprodukčné funkcie živočíchov, zostáva množstvo otázok týkajúcich sa potenciálnych rizík stále nezodpovedaných.

Náš toxikologický výskum využíva metódy *in vitro*, ktoré detegujú možný vplyv mykotoxínov na reprodukčné funkcie tým, že skúma dávkovú odpoveď, cesty expozície a mechanizmy účinku vybraných toxínov. Cieľom výskumu v podmienkach *in vitro* je načrtnúť potenciálne riziko prírodných toxických látok, ktoré môžu indukovať reprodukčné alterácie v živočíšnom organizme. Aby sa predišlo škodám spôsobeným mykotoxínmi alebo sa ich rozsah aspoň minimalizoval, je potrebné včas zaviesť diagnostické opatrenia. Taktiež je potrebné venovať značnú pozornosť mykotoxínom vo výžive ošipovaných, nakoľko sú na kontamináciu krmív mykotoxínmi veľmi senzitívne. Mykotoxíny sú hlavným problémom predovšetkým v krajinách, kde klimatické podmienky a nesprávne skladovacie postupy prispievajú k rastu húb, a tým aj k produkcii ich toxínov. Niektoré sú mutagénne, karcinogénne a špecificky organotoxické, ktoré môžu indukovať reprodukčné alterácie a nádorové ochorenia.

Základným prejavom živého systému je reprodukcia a predstavuje neoddeliteľnú súčasť pre zachovanie živočíšneho druhu. Rozmnožovanie je zabezpečené reprodukčnou sústavou a jej činnosť je ovplyvnená rôznymi faktormi. Neoddeliteľnou súčasťou reprodukčnej sústavy sú vaječníky, ktoré okrem tvorby oocytov produkujú značné množstvo hormónov a majú významnú sekrečnú aktivitu. **Sekrečná činnosť vaječníkov** ovplyvňuje ostatné časti reprodukčnej sústavy, vrátane tých, ktoré kontrolujú dospievanie, cyklickosť, produkciu samičích pohlavných buniek a funkcie mozgu, hypofýzy, samotných vaječníkov ako aj tých, ktoré podporujú vývoj embrya, graviditu a laktáciu (reprodukčná sústava, maternica, mliečna žľaza) (Sirotkin and Luck, 2008; Sirotkin, 2011). Dva hlavné typy somatických buniek prítomné v ovariálnom folikule sú bunky *theca folliculi* a bunky *stratum granulosum* (Skinner, 2005). Ovariálny cyklus pozostáva z folikulárnej fázy, ovulácie a luteálnej fázy (Clayton et al., 1980). Folikul sa vyvíja a prechádza štádiami od primordiálneho, primárneho až po sekundárne štádium pred vytvorením dutiny (*antrum folliculi*). V antrálnom štádiu mnohé folikuly podliehajú atrezií, zatiaľ čo niektoré z nich pod vplyvom pravidelnej stimulácie gonadotropnými hormónmi, ktorá nastáva po pubertálnom období, dosiahnu predovulačné štádium (Hirshfield, 1991; Gougeon, 1996). Ovariálny folikulárny rast a vývoj je riadený endokrinnými, parakrinnými a autokrinnými faktormi (Hsueh et al., 1984; Kolesárová a i., 2008; Sirotkin, 2011). Mozog reguluje ovariálny cyklus prostredníctvom hypotalamu a hypofýzy. Hypotalamus produkuje gonadoliberín (GnRH), ktorý ovplyvňuje sekrečnú činnosť gonadotropných hormónov – folikulostimulačného hormónu (FSH) a luteinizačného hormónu (LH) (Clayton et al., 1980; Sirotkin and Kolesárová, 2011). Hormóny, rastové faktory, cytokíny, indolamíny, eikosanoidy sú extracelulárne regulátory funkcií ovariálnych buniek, ktoré sprostredkujú účinok vonkajších faktorov na bunku (Sirotkin, 2011; Sirotkin, 2011). Proces **steroidogenézy** začína transportom cytoplazmatického cholesterolu

do vnútornej mitochondriálnej membrány, kde je prostredníctvom enzýmu konvertovaný na pregnenolón, z ktorého sú tvorené steroidné hormóny (Hall, 1970). Hlavnými producentmi steroidných hormónov sú tri typy buniek (bunky *stratum granulosum*, *theca interna* a *theca externa*) ovariálneho folikulu, ktoré obklopujú vajíčko – oocyt (Porter et al., 1989; Drummond, 2006; Groothuis and Schwabl, 2008). Progesterón produkovaný bunkami *stratum granulosum* je prekursorom androgénov a estrogénov (Johnson, 2000). Inzulínu podobný rastový faktor typu I (IGF-I) môže ovplyvniť funkciu buniek autokrinne, parakrinne a endokrinne. Úloha IGF-I v prenatalnom a postnatalnom období je veľmi dobre známa a niekoľko štúdií popisuje úlohu IGF-I v riadení reprodukčných funkcií (Daftary and Gore, 2005; Kolesárová a i., 2008; Sirotkin, 2011; Maruniaková et al., 2015). Bunková **proliferácia** a diferenciácia sú biologickými procesmi kontrolované extracelulárnymi signálmi, ktoré ovplyvňujú proces bunkového cyklu a génovú expresiu. Vo vaječníku hormóny kontrolujú vývoj každého folikulu, dynamické zmeny v proliferácii granulóznych buniek a expresiu génov (Pederson, 1970; Richards, 1978; Hirshfield, 1991; Sirotkin, 2011; Kolesárová et al., 2015). Cyklíny sú centrálnymi regulátormi bunkového cyklu. Sú súčasťou cyklín-závislej kinázy, a tým ovplyvňujú jej aktivitu (Dore a Hunt, 2002; Sirotkin, 2011; Kolesárová et al., 2015). Proliferačný bunkový jadrový antigén (PCNA) je regulátorom vývoja ovariálnych folikulov (Langerak et., 2007; Kolesárová et al., 2015). Expresia PCNA a cyklínu B₁ v ovariálnych bunkách bola preukázaná pri viacerých druhoch cicavcov (Hutt et al., 2006; Meszárošová et al., 2008; Sirotkin, 2011; Kolesárová et al., 2015). **Apoptóza** je významný a komplexný biologický proces umožňujúci organizmu zničiť a odstrániť nežiaduce bunky počas vývoja organizmu, normálnej homeostázy a ochorení (Thompson, 1995; Jacobson et al., 1997). Mechanizmus apoptózy je veľmi zložitý a programovaný proces, ktorý zahŕňa kaskádu molekulárnych dejov. Výskum preukázal existenciu dvoch hlavných apoptotických dráh: vonkajšiu (cez receptory bunkovej smrti) a vnútornú (mitochondriálnu dráhu) (Igney a Krammer, 2002). Kaspáza-3 je jednou z najpreskúmanejších efektorových kaspáz. Jej aktivácia signalizuje finálne štádium bunkovej smrti, proteolytickú deštrukciu veľkého množstva rozličných komponentov na jednej strane a aktiváciu proapoptického faktora na strane druhej (Nicholson, 1999). Avšak mechanizmus účinku p-53 v rozličných tkanivách ešte nie je úplne objasnený. Mnohé výskumy naznačujú, že indukuje apoptózu v rôznych typoch buniek (Clarke et al., 1993), vrátane buniek *stratum granulosum* (Keren-Tal et al., 1995).

Cieľom vedeckej monografie je poskytnúť základné poznatky z oblasti reprodukčnej biológie a ovariálnej fyziológie živočíchov so zameraním sa na hodnotenie účinkov prírodných toxických látok – fuzáriových mykotoxínov, ktoré predstavujú značné riziko pre reprodukčný systém živočíchov.

**Ovariálne funkcie modulované sekundárnymi metabolitmi
mikroskopických húb – mykotoxínmi**

**Adriana Kolesárová, Marek Halenár,
Marína Kiko Medved'ová, Nora Maruniaková**

Vydala: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vydanie: prvé

Náklad: 100 ks

Jazyková korektúra: Ing. Ľubica Ďudáková

Grafická úprava a návrh obálky: Tatiana Šmehilová

AH-VH: 6,58-6,75

ISBN 978-80-552-1706-2