

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Vliv sulfanu na anti-apoptotické faktory během
stárnutí prasečích oocytů *in vitro***

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martina Tojšlová

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Vliv sulfanu na anti-apoptické faktory během stárnutí prasečích oocytů *in vitro*** vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 13. 4. 2012

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí své práce Ing. Mgr. Tereze Krejčové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a odborné rady. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Souhrn

Oocyty, dozrálé v *in vitro* podmínkách, pokud nejsou oplozeny nebo partenogeneticky aktivovány, podléhají během prodloužené kultivace degenerativním změnám, označovaným jako stárnutí oocytů. Tyto morfologické a biochemické změny významně snižují životaschopnost oocytů, což omezuje jejich využití pro reprodukční biotechnologické metody jako je *in vitro* oplození apod. Změny v průběhu stárnutí oocytů mohou vést ke spontánní partenogenetické aktivaci, lýze nebo fragmentaci oocytů, která je důsledkem programované buněčné smrti, apoptózy.

Jednou ze skupin molekul, podílejících se na regulaci apoptózy, jsou proteiny rodiny Bcl-2, která zahrnuje pro i anti-apoptoticky působící faktory. V organismu prasete byla prokázána exprese proteinu Bcl-x_L, který patří mezi anti-apoptotické faktory rodiny Bcl-2 a je aktivně zapojen do apoptózy prasečích buněk.

Další skupinou molekul, zapojených do regulace apoptózy, jsou gasotransmitery. Jedná se o plynné signální molekuly schopné volně prostupovat buněčnými membránami a ovlivňovat různé buněčné biochemické dráhy. Na základě nedávných výzkumů byl mezi plynné gasotransmitery zařazen sulfan. V buňkách je sulfan fyziologicky produkován třemi enzymy, 3 – merkaptopyruvát sulfurtransferázou, cystathionin γ -lyázou a cystathionin β -syntázou. Sulfan je, mimo jiné, schopen ovlivňovat signální dráhy regulující apoptózu. Jeho úloha při apoptotickém zániku prasečích oocytů však nebyla doposud objasněna.

Cílem této diplomové práce je ověřit hypotézu, že je sulfan zapojen do regulace exprese a intracelulární lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L během stárnutí prasečích oocytů.

Nejprve jsme se zaměřili na detekci a intracelulární lokalizaci enzymů katalyzujících syntézu sulfanu v oocytech ve stádiu MII a v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin. U všech skupin oocytů byly lokalizovány enzymy 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza a cystathionin γ -lyáza, s ložisky intenzivního signálu rozptýlenými difuzně v cytoplasmě. Enzym cystathionin β -syntáza v našich experimentech lokalizován nebyl.

Dále jsme se zaměřili na detekci a intracelulární lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L v oocytech ve stádiu MII a v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin v čistém kultivačním médiu, nebo v kultivačním médiu s přídatkem donoru sulfanu Na₂S. Tyto dvě skupiny byly následně porovnány a byl statisticky vyhodnocen vliv donoru sulfanu na lokalizaci a distribuci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L.

V oocytech kultivovaných bez donoru sulfanu byla zjištěna nejvyšší intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů ve fázi MII. Intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti následně postupně klesala u oocytů vystavených prodloužené kultivaci 24 a 48 hodin.

Oocyty, které byly vystaveny prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na₂S vykazovaly nejvyšší intenzitu signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti po 24 hodinách prodloužené kultivace. Následně, u skupin oocytů po 48 a 72 hodinách prodloužené kultivace, intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti výrazně poklesla.

Při porovnání skupin oocytů po prodloužené kultivaci v čistém kultivačním médiu se skupinami oocytů vystavenými prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na₂S, bylo statisticky prokázáno snížení intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu po dobu 24 hodin, oproti kontrolní skupině kultivované v čistém médiu. Dále byl prokázán nárůst intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti a cytoplasmě oocytů vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu po dobu 48 hodin oproti oocytům kultivovaným v médiu bez donoru Na₂S.

V našich experimentech byla prokázána hypotéza o aktivním zapojení sulfanu v regulaci intracelulární lokalizace a distribuce anti-apoptického faktoru Bcl-x_L v průběhu stárnutí prasečích oocytů. Pro objasnění přesného mechanismu jeho působení je však potřeba realizovat další vhodné experimenty.

Klíčová slova: oocyt, prase, stárnutí, apoptóza, sulfan, Bcl-x_L

Summary

Oocytes, matured in *in vitro* conditions, unless they are fertilized or parthenogenetically activated, undergo during prolonged cultivation degenerative changes, known as oocytes aging. These morphological and biochemical changes significantly reduce the viability of oocytes, which limits their use in reproductive biotechnology methods such as *in vitro* fertilization, etc. Changes during oocytes aging can lead to spontaneous parthenogenetic activation, lysis or fragmentation of oocytes, which is a consequence of programmed cell death, apoptosis.

One group of molecules involved in the regulation of apoptosis are Bcl-2 family proteins, which includes pro- and anti-apoptotic factors. In the body of the pig has been demonstrated protein expression of Bcl-x_L, which is one of the anti-apoptotic factors of Bcl-2 family and is actively involved in the apoptosis of pig cells.

Another group of molecules involved in the regulation of apoptosis are gasotransmitters. They are a gaseous signaling molecules able to freely permeate cell membranes and affect various cellular biochemical pathways. Based on recent research hydrogen sulfide was ranked among gasotransmitters. In cells, hydrogen sulfide is physiologically produced by three enzymes, 3 - merkaptopyruvate sulfurtransferase, cystathionine γ -lyase and cystathionine β -synthase. Hydrogen sulfide is, among other things, able to affect cell signaling pathways regulating apoptosis. His role in the apoptotic demise of pig oocytes has not been clarified so far.

The aim of this thesis is to verify the hypothesis that hydrogen sulfide is involved in the regulation of expression and intracellular localization of anti-apoptotic factor Bcl-x_L during pig oocytes aging.

First, we focused on detection and intracellular localization of enzymes catalyzing the synthesis of hydrogen sulfide in oocytes in the MII stage and oocytes exposed to prolonged cultivation for 24, 48 and 72 hours. In all groups of oocytes, enzymes 3-merkaptopyruvate sulfurtransferase and cystathionine γ -lyase were localized, with intense signal dissipated diffusely in the cytoplasm. The enzyme cystathionine β -synthase was not localized in our experiments.

Furthermore, we focused on detection and localization of intracellular anti-apoptotic factor Bcl-x_L in oocytes in the MII stage and oocytes exposed to prolonged cultivation for 24, 48 and 72 hours in pure culture medium or in culture medium with the addition of hydrogen

sulfide donor Na_2S . These two groups were then compared and the effect of hydrogen sulfide donor on the localization and distribution of anti-apoptotic factor Bcl-x_L was statistically evaluated.

In oocytes, cultured without a hydrogen sulfide donor, the highest signal intensity of factor Bcl-x_L was found in cortical areas in the MII phase oocytes. Signal intensity of factor Bcl-x_L in cortical areas then gradually decreased in oocytes exposed to prolonged culture of 24 and 48 hours.

Oocytes that were exposed to prolonged cultivation in medium with hydrogen sulfide donor Na_2S showed highest signal intensity of factor Bcl-x_L in cortical areas after 24 hours of extended cultivation. Subsequently, in groups of oocytes after 48 and 72 hours of prolonged cultivation, the signal intensity of factor Bcl-x_L in cortical area decreased significantly.

When comparing groups of oocytes after prolonged cultivation in pure culture medium with groups of oocytes exposed to prolonged cultivation in medium with hydrogen sulfide donor Na_2S , reduction of the signal intensity of factor Bcl-x_L was statistically shown in cortical areas of oocytes exposed to prolonged cultivation in medium with hydrogen sulfide donor for 24 hours compared to the control group cultured in pure medium. Further was also shown an increase of signal intensity of factor Bcl-x_L in cortical area and the cytoplasm of oocytes exposed to prolonged cultivation in medium with hydrogen sulfide donor for 48 hours compared to oocytes cultured in medium without donor Na_2S .

In our experiments, the hypothesis of active involvement of hydrogen sulfide in the regulation of intracellular localization and distribution of anti-apoptotic factor Bcl-x_L in the aging of pig oocytes has been established. To clarify the exact mechanism of hydrogen sulfide activity would be necessary to implement other appropriate experiments.

Key words: oocyte, sulfan, aging, apoptosis, hydrogen sulfide, Bcl-x_L

Obsah

1. Úvod	9
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3. Literární přehled	11
3.1. Oogeneze a folikulogeneze.....	11
3.1.1. Fáze množení	11
3.1.2. Fáze růstu.....	12
3.1.3. Fáze zrání.....	13
3.1.4. MPF	14
3.1.5. MAP kinázy	15
3.2. Folikulogeneze	16
3.3. Stárnutí oocytů	18
3.3.1. Změny kortikálních granul	18
3.3.2. Změny dělicího vřeténka	19
3.3.3. Změny zony <i>pellucidy</i>	19
3.4. Apoptóza.....	20
3.4.1. Vnitřní signální dráha.....	20
3.4.2. Vnější signální dráha.....	21
3.4.3. Kaspázy	22
3.4.4. Rodina proteinů Bcl-2	23
3.5. Sulfan.....	26
3.5.1. Enzymatická produkce endogenního H ₂ S	27
3.5.2. Biologické účinky sulfanu	29
4. Materiál a metody.....	31
5. Výsledky	34
6. Diskuze	60
7. Závěr	63
8. Seznam literatury.....	64

1. Úvod

Oocyty jsou častým předmětem různých biotechnologických metod, jako je *in vitro* oplození, klonování apod. Jejich využití v těchto metodách je však limitováno postupnou ztrátou kvality a životaschopnosti oocytů s prodlouženou kultivací, tzv. stárnutím oocytů.

Následkem morfologických a biochemických změn v průběhu stárnutí, může docházet ke spontánní partenogenetické aktivaci, lýze nebo fragmentaci oocytů, přičemž fragmentace je vnějším projevem programované buněčné smrti, apoptózy. Mezi proteiny schopné apoptózu inhibovat patří Bcl-x_L, člen rodiny anti-apoptotických faktorů Bcl-2.

Sulfan byl na základě nedávných výzkumů zařazen mezi gasotransmitery, plynné signální molekuly, schopné procházet buněčnými membránami a ovlivňovat vnitrobuněčné signální dráhy. Jeho prokázaná účinnost je velmi rozmanitá a zahrnuje i ovlivnění apoptózy v somatických buňkách.

Ve své práci jsem se věnovala vlivu sulfanu anti-apoptotický faktor Bcl-x_L v průběhu stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že je plynný gasotransmitter sulfan zapojen do regulace exprese anti-apoptotických faktorů z rodiny Bcl-2 během stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Cílem této práce bylo ověřit tuto hypotézu realizací vhodných experimentů.

1. Sledování intracelulární distribuce enzymů, zodpovědných za endogenní produkci H₂S ve stárnoucích oocytech.
2. Vliv donoru sulfanu Na₂S na lokalizaci a intracelulární distribuci faktoru Bcl-x_L během stárnutí prasečích oocytů.

3. Literární přehled

3.1. Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze začíná tvorbou primordiálních zárodečných buněk a zahrnuje sérii buněčných transformací – v embryonálním vývoji přeměnu primordiálních kmenových buněk v oogonie, oogonií v oocyty a v dospělosti, oocytů ve vajíčka (Wassarman, 1988). Oogeneze probíhá současně s folikulogenezí a průběh obou těchto procesů musí být tedy velmi přesně koordinován (Senbon *et al.*, 2003).

3.1.1. Fáze množení

Primordiální kmenové buňky se objevují v rané fázi embryonálního vývoje mezi endodermálními buňkami stěny žloutkového váčku v blízkosti vyústění alantoisu (Langman *et Sadler*, 2006). Jedná se o buňky původem z epiblastu, které v průběhu gastrulace pronikly skrz primitivní proužek (Gilbert, 2006). Jejich diferenciaci z epiblastu je regulována specifickými faktory vylučovanými extraembryonálním ektodermem, a to bone morphogenic protein 4 (BMP-4) a bone morphogenic protein 8b BMP 8b, a bone morphogenic protein 2 (BMP-2) vylučovaným viscerálním endodermem (Ying *et al.*, 2002).

Primordiální kmenové buňky migrují do oblasti budoucích pohlavních lišt nejprve pasivně přes endodermální epitel zadního střeva a poté aktivně, améboidním pohybem, podél dorzálního mezenteria (Wassarman, 1988). V průběhu migrace prochází zárodečné buňky sérií mitotických dělení, které zvyšuje jejich počet z 5000 zaznamenaných ve 20 dnech po oplození, na 1 100 000 v 50 dnech po oplození. Později se jejich počet následkem nízké mitotické aktivity a atrezie sníží na přibližně 500 000 zárodečných buněk při narození (Black *et Erickson*, 1968). Do puberty tento počet ještě poklesne na 420 000 (Gosden *et Telfer*, 1987).

Black *et Erickson* (1968) zaznamenali primordiální zárodečné buňky prasat v oblasti zárodečné lišty již 18. den po oplození.

Jakmile jsou PGC ve vyvíjejícím se ováriu, začínají diferencovat v oogonie. Ztrácí schopnost améboidního pohybu a zakulacují se. Vytváří shluky dělicích se buněk se stejnou chromozomální konfigurací a navzájem propojených mezibuněčnými mosty, které pravděpodobně vznikají v důsledku nedokonalého oddělení buněk při rychle probíhající

mitóze (Motta *et al.*, 1997). Oogonie prochází druhově specifickým počtem mitóz, než vstoupí do meiózy a stanou se oocyty. Po vstupu do meiózy prochází primární oocyt fázemi *leptotene*, *zygotene* a *pachytene* profáze prvního meiotického dělení (Wassarman, 1988).

V průběhu meiózy pohlavních buněk po sobě následují dvě jaderná dělení tzv. heterotypické a homeotypické dělení. Před heterotypickým dělením se chromozomy replikují přičemž tyto sesterské chromatidy zůstávají spojené v centroměře. V *leptotene* profáze I dochází ke kondenzaci chromozomů, které se tím stávají viditelnými jako dlouhé stuhovité struktury. V následující fázi profáze I, *zygotene*, se homologní chromozomy párují za pomoci proteinové struktury zvané synaptonemální komplex. Tyto spojené páry homologních chromozomů tvoří tzv. bivalenty. V *pachytene* chromozomy dále kondenzují, což vede k jejich zkrácení a ztluštění. V pozdním *pachytene* lze pozorovat jednotlivé chromatidy, chromozomy se proto označují jak tetrády. V této fázi dochází k překřížení částí homologních chromozomů v chiasmatech a k výměně jejich částí při *crossing overu*. Na začátku *diplotene* se rozpadá synaptonemální komplex a začíná rozdělení chromozomů, které však zůstávají spojené v chiasmatech (Hartl *et Ruvolo*, 2011). V této *diplotenni* (*diktyatenni*) fázi se dělení zastavuje prvním meiotickým blokem, ve kterém oocyty setrvávají většinu svého života (Wassarman, 1988).

Tento první meiotický blok je udržován vysokou hladinou cAMP v oocytu, která inaktivuje MPF fosforylací CDK1 pomocí protein kinázy A (PKA) (Bornslaeger *et al.*, 1986; Duckworth *et al.*, 2002).

Mezitím epitel zárodečné lišty proliferuje, jeho buňky penetrují do mesenchymu a vytvářejí tzv. medulární provazce. U samic se tyto provazce rozpadají, vytvářejí nepravidelné shluky buněk a později mizí v základu dřeně ovária. Povrchový zárodečný epitel pokračuje v proliferaci a dává vzniknout druhé generaci provazců, tzv. kortikálním provazcům, které pronikají mesenchymem, ale zůstávají blízko povrchu ovária (Langman *et Sadler*, 2006).

V průběhu tohoto procesu ztrácejí oocyty mezibuněčné mosty a jsou obklopeny jednou vrstvou pregranulóznic buněk původem z kortikálních lišt, čím se vytváří tzv. primordiální folikul (Wassarman, 1988).

3.1.2. Fáze růstu

V průběhu této fáze se oocyty již nemnoží, dochází ale jejich k intenzivnímu růstu. Probíhá syntéza a shromažďování makromolekul a organel (ribozomů, mitochondrií) a oocyt

získává schopnost znovuzahájit meiózu (Szybek, 1972; Sorensen *et* Wassarman, 1976).

V průběhu fáze růstu dochází v cytoplasmě a jádře ke změnám, které jsou charakteristické transkripcí a translokací mRNA, utvářením dělicího vřetenka a vývojem mechanismů umožňujících penetraci spermie (Swain *et* Smith, 2008). Ve finálních fázích růstu oocyty *in vivo* probíhá redistribuce kortikálních granul, změny počtu, aktivity a distribuce mitochondrií (Wilding *et al.*, 2001, Van Blerkom *et al.*, 2002).

Schopnost znovuzahájení meiózy sestává ze dvou fází, které souvisí s velikostí oocyty. V první fázi je zvyšující se počet oocytů schopen projít rozpadem zárodečného váčku (GVBD) a dosáhnout stádia metafáze I. meiotického dělení, s chromozomy seřazenými v metafázní destičce. S dalším růstem je stále více oocytů schopno postoupit až do stádia metafáze 2. meiotického dělení a po oplození zahájit časný embryonální vývoj (Sorensen *et* Wassarman, 1976; Albertini *et al.*, 1991).

Meioticky kompetentní oocyty jsou charakteristické lemem kondenzovaného chromatinu obklopujícím jádrem (Mattson *et* Albertini, 1990; Zuccotti *et al.*, 1995).

3.1.3. Fáze zrání

Přechod ze stádia zárodečného váčku do stádia metafáze II se označuje jako zrání oocyty a zahrnuje změny jádra a cytoplasmy, které připravují oocyt na oplození a zahájení dalšího vývoje (Fissore *et al.*, 2002). Znovuzahájení meiózy je zahájeno předovulační vlnou gonadotropinů, zvláště vysokými hladinami luteinizačního hormonu (LH). Vlna LH způsobí snížení hladiny cAMP v oocyty, pravděpodobně ztrátou *gap junctions* spojujících oocyt s kumulárními buňkami následkem mucifikace a expanze kumulu (Sela-Abramovich *et al.*, 2006; Schoenfelder *et* Einspanier, 2003). V oocyty také dochází ke zvýšené expresi enzymu fosfodiesterázy, která cAMP rozkládá na 5'AMP, čímž dále snižuje hladinu cAMP (Richard *et al.*, 2001).

Pouze plně narostlé, meioticky kompetentní oocyty z dominantních folikulů reagují na preovulační vlnu LH znovuzahájením meiózy. Nejvýraznějším projevem znovuzahájení meiózy je rozpad zárodečného váčku, tzv. germinal vesicle breakdown (GVBD) a kondenzace chromatinu (Inoue *et al.*, 1996).

GVBD po podání hCG je u prasete *in vivo* dokončeno v rozmezí 20 – 24 hodin, *in vitro* mezi 16 – 20 hodinami (Motlík *et* Fulka, 1976).

Jaderné zrání trvá u prasete asi 44 hodin a zahrnuje dvě po sobě jdoucí dělení (M-fáze), mezi kterými neprobíhá replikace DNA (van der Hurk, 1997).

Oocyty, zablokované v diplotene profáze prvního meiotického dělení, postoupí do *diakinese*. Zde jsou chromozomy nejvíce kondenzované a začínají se od sebe vzdalovat, zatím spojené v chiasmatech. Ke konci *diakinese* začíná tvorba dělicího vřeténka a rozpad jaderné membrány. Následuje metafáze prvního meiotického dělení, ve které dochází k napojení mikrotubulů dělicího vřeténka na centromery chromozomů a seřazení bivalentů v metafázní destičce (Hartl *et* Ruvolo, 2011). Homologní chromozomy jsou k sobě připojeny chiasmaty vzniklými crossing-overem a kohezinovými spoji. Tyto spoje mezi rameny chromozomů jsou rozštěpeny separázami, což umožní oddělení homologních chromozomů v anafázi I, kohezinové komplexy na centromerách však zůstanou spojeny, což je nezbytné pro správný rozchod chromatid v meióze II. V anafázi se dvouchromatidové homologní chromozomy, spojené centromerou, rozcházejí k pólům dělicího vřeténka. Na konci telofáze dochází k vydělení pólového tělíska, které je výrazně menší než oocyt a obsahuje polovinu chromozomů (Lodish *et al.*, 2004). Následuje druhé meiotické dělení, před kterým neprobíhá replikace DNA. Toto tzv. homeotypické dělení má stejný průběh jako mitóza, v metafázi však dochází k zastavení dělení ve druhém meiotickém bloku (Wassarman, 1988).

3.1.4. MPF

MPF (maturation promoting factor) hraje zásadní roli v meiotickém zrání oocyty, protože vyvolává rozpad jaderné laminy, kondenzaci chromozomů, přestavbu mikrofilament a reorganizaci sítě intermediálních filament. Jakožto heterodimerní komplex, MPF sestává ze dvou podjednotek – katalytické podjednotky serin/threonin protein kinázy CDK1 a regulační podjednotky cyklinu B (Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1989). Bylo objeveno několik izoform cyklinu B u obratlovců, zdá se však, že pouze cyklin B1 je zásadní pro aktivitu MPF (Brandeis *et al.*, 1998). V průběhu meiotického zrání kolísají hladiny cyklinu B1 a následkem toho i aktivita MPF přesně daným způsobem. Hladina cyklinu B1 i aktivita MPF jsou nízké u oocytů zablokovaných v profázi prvního meiotického dělení. Poté se aktivita zvyšuje a svého maxima dosahuje v metafázi I. Při přechodu z metafáze I do anafáze I dojde k náhlé degradaci cyklinu B1, což vede k náhlému poklesu aktivity MPF. Oocyt pokračuje v meiotickém dělení, kdy opět stoupá hladina cyklinu B1 a tím aktivita MPF, která se udrží vysoká v průběhu 2. meiotického bloku v metafázi II (Winston, 1997; Ledan *et al.*, 2001; Nixon *et al.*, 2002; Hyslop *et al.*, 2004).

Aktivita MPF je regulována Myt1 a Wee1 kinázami, které jej inaktivují fosforylací CDK1 na Thr14 a Tyr15. Fosfatáza CDC25 naopak CDK1 na těchto aminokyselinách

defosforyluje a tím ji aktivuje. Pro aktivaci CDK1, a tím MPF, je nutná vysoká aktivita CDC25 a nízká aktivita Myt1 a Wee1 kináz (Norbury *et Nurse*, 1992; Jones, 2004). Inaktivní MPF, tzv. pre-MPF, se nahromaduje v průběhu G2 fáze a přechod do M fáze závisí na jeho defosforylaci fosfatázou CDC25 (Taieb *et al.*, 1997).

V průběhu druhého meiotického bloku je udržována stabilní hladina MPF. Oocyty jsou zablokovány s plně vytvořeným dělicím vřeténkem a na něm napojenými chromozomy (Jones, 2004). Druhý meiotický blok je umožněn inhibicí APC (anaphase promoting complex) pomocí Emi2 a udržován Emi2 a kaskádou c-Mos/MAPK, které stabilizují MPF. Při poklesu aktivity MPF pod určitou úroveň c-Mos/MAPK kaskáda potlačí degradaci cyklinu B, čímž se opět zvýší aktivita MPF. Naopak přílišné zvýšení aktivity MPF způsobí degradaci cyklinu B pomocí APC (Yamamoto *et al.*, 2005, Madgwick *et Jones*, 2007).

3.1.5. MAP kinázy

MAP kinázy (mitogen-activated protein kinases) jsou rodina serin-threoninových protein kináz, z nichž nejlépe prozkoumané jsou Erk1 a Erk2 (Extracellular signal regulated kinase1 a 2), které se uplatňují v regulaci buněčné proliferace na základě podnětů růstových faktorů (Ye *et al.*, 2003).

Aktivace MAP kináz probíhá fosforylací na threoninu a tyrozinu MEK kinázou (MAP kinase-Erk kinase), která je v oocytech aktivovaná Raf nebo Mos (Posada *et al.*, 1993; Ferrell, 1996).

Předpokládá se, že signální dráha Mos-MAPK zahrnuje prvky CSF (cytostatic factor) (Masui *et Markert*, 1971), který udržuje vysokou aktivitu MPF a umožňuje druhý meiotický blok (Sagata *et al.*, 1989; Masui, 2000).

Dále jsou MAP kinázy zodpovědné za udržení kondenzace chromatinu a zabránění replikaci DNA v přechodu mezi meiózou I a meiózou II, kdy je nízká aktivita MPF (Verlhac *et al.*, 1994).

Není úplně jasné, kdy a jak, dochází k aktivaci MAP kinázy u prasat v průběhu meiotického zrání. Výsledky Ye *et al.*, (2003) ukazují, že MAP kináza i MPF jsou aktivovány přibližně ve stejnou dobu při rozpadu zárodečného váčku (GVBD). Aktivity obou souběžně stoupají a znatelné úrovně dosáhnou asi 7 hodin po GVBD. Vrcholná aktivita nastává asi po 10 hodinách při MI, přičemž aktivita MAP kinázy při přechodu z MI do MII zůstává stejná, zatímco aktivita MPF výrazně poklesne (Ye *et al.*, 2003).

3.2. Folikulogeneze

Vývoj folikulu je morfoloicky charakteristický zvětšením průměru oocytu a synchronní proliferací granulozních buněk, jejímž výsledkem je mnoho vrstev buněk obalujících každý oocyt. Vývoj folikulu zahrnuje rekrutment primordiálních folikulů, jejich růst, selekci dominantního folikulu, ovulaci a luteinizaci (Vanderhyden, 2002).

Více než 99% folikulů v savčích ovariích podléhá v průběhu folikulogeneze atrezii. Není mnoho známo o molekulárním mechanismu výběru folikulů, významnou roli v něm ale hraje apoptóza buněk granulosity (Manabe *et al.*, 2004).

Již před porodem se u samičího plodu začnou dále vyvíjet skupiny primordiálních folikulů a první antrální folikuly se u prasat objevují již v 70 dnech po porodu (Mauleon, 1978; Oxender *et al.*, 1979). Vývoj z primordiálního do antrálního folikulu prasete trvá 84 dní a dalších 19 dní je potřeba k dosažení předovulační úrovně vývoje (Morbeck *et al.*, 1992). V průběhu této periody dochází k mnoha morfoloickým změnám jak na oocytu, tak na okolních folikulárních buňkách.

Proces folikulogeneze má dvě fáze – preantrální, nezávislou na gonadotropinech a antrální fázi, závislou na gonadotropinech.

V průběhu preantrální fáze pregranulózní buňky primordiálního folikulu diferencují v kubické a vytváří jednovrstevný obal primárního oocytu, uzavřený v bazální membráně a vytvářející primární folikul. Později granulóza proliferuje a vytváří vícevrstevný obal sekundárního folikulu (Norris *et Lopez*, 2010). V této fázi oocyt roste a vytváří si glykoproteinový obal, *zonu pellucidu*. *Zona pellucida* se postupně stává tlustší a pevnější sítí vzájemně propojených filament, která obaluje oocyt a převážně ho odděluje od folikulárních buněk. Jsou však zachovány spoje *gap junctions* mezi oocytem a folikulárními buňkami. *Gap junction* jsou tvořeny microvilli oocytu a výběžky folikulárních buněk, které procházejí *zonou pellucidou* (Albertini *et Anderson* 1974; Wassarman, 1988).

Gap junctions hrají zásadní roli ve vývoji oocytu, protože zprostředkovávají výměnu metabolitů a signálních molekul mezi oocytem a okolními granulózními buňkami, stejně jako mezi sousedními granulózními buňkami navzájem (Lodish *et al.*, 2004). Okolní granulózní buňky oocytu dodávají nukleosidy, aminokyseliny a fosfolipidy, ale také udržují iontovou rovnováhu a stabilitu mRNA zrajícího oocytu (Hunter, 2000). Rychlost růstu oocytu je přímo závislá na počtu granulózních buněk, které jsou s ním spojené (Herlands *et Schultz*, 1984).

Velikost sekundárního folikulu prasete je asi 300 μm s oocytem o velikosti asi 90 μm (van der Hurk *et al.*, 1997).

V této fázi tvoří granulózní buňky morfologicky homogenní populaci a získávají receptory pro folikulostimulační hormon (FSH) a steroidní hormony (Richards, 1975; Erickson *et al.*, 1985). Současně vytváří buňky stromatu ovária další vrstvu somatických buněk obalujících folikul, tzv. *thecu*. Thekální buňky dále diferencují ve vnitřní endokrinní vrstvu *theca folliculi interna* a vnější vrstvu *theca folliculi externa*, která má vazivový charakter. *Theca folliculi interna* vaskularizuje, cévy však neprochází basální membránou a nevstupují tudíž do *membrany granulosity* (Norris *et Lopez*, 2010).

Jakmile se okolo oocyty naakumuluje několik tisíc granulózních buněk, které tvoří vícevrstevnou strukturu, extracelulární prostor se začne zvětšovat a vytvoří dutinu zvanou antrum (Eppig *et al.*, 1990).

U myši dokončuje oocyt svůj růst před formací antra folikulu, růst folikulu tedy převážně probíhá až po dokončení růstu oocyty. U domestikovaných zvířat však oocyt podstatně zvětšuje svůj objem i po vytvoření antra folikulu (Senbon *et al.*, 2003).

Průměr oocyty se zvětšuje z přibližně 30 μm na 120 μm . V 1,8 mm folikulech jsou oocyt o téměř konečné velikosti 115 μm (Motlík *et Fulka*, 1986).

Prasečí folikuly o velikosti méně než 0,7 mm obsahují oocyt meioticky nekompetentní, pouze některé oocyt z folikulů o velikosti 0,8 – 1,6 mm mohou dozrát *in vitro*. Ani oocyt z folikulů větších než 1,7 mm nedosáhnou všechny po 48 hodinách v *in vitro* podmínkách do metafáze II (Motlík *et al.*, 1984).

Po dosažení pohlavní dospělosti jsou v průběhu každého ovariačního cyklu některé folikuly v rané antrální fázi rekrutovány a pokračují v růstu. To je řízeno hypofyzárním folikulo-stimulačním hormonem (FSH) (Gougeon, 1996). Mezi buňkami granulózy se začne akumulovat tekutina a vytvoří se centrální dutina *antrum folliculi*, která granulózní buňky vytlačí na periferii folikulu. Oocyt však zůstává obklopen skupinou asi tisíce těsně spojených buněk, a vytváří se tak *cumulus oophorus* (Salustri *et al.*, 1992). Antrum se dále rozpíná, proliferace buněk granulózy pokračuje a terciární folikul se zvětšuje. Při ovulaci terciární folikul praská a oocyt ovuluje (Manabe *et al.*, 2004).

3.3. Stárnutí oocytů

Oocyty zablokované v MII fázi jsou normálně oplozené brzy po ovulaci, pokud k tomu však nedojde, neoplozené oocyty ve vejcovodu (*in vivo*) nebo v kultuře (*in vitro*) projdou zhoršením kvality, k tzv. stárnutím (Miao *et al.*, 2009)

Během stárnutí dochází k mnoha morfologickým a biochemickým změnám, které výrazně snižují kvalitu a životachopnost oocytů.

Změny spojené se stárnutím oocytů zahrnují například sníženou schopnost oplození (Winston *et al.*, 1993), výskyt polyspermie (Badenas, 1989), partenogenezi (Marston *et al.*, 1964), anomálie chromozomů (Mailhes *et al.*, 1998), zvýšenou citlivost k aktivačním podnětům (Goud *et al.*, 1999), nástup anafáze II (Abbot *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 1997), částečnou exocytózu kortikálních granul, strukturální změny a ztvrdnutí *zony pellucidy*, snížení aktivity MPF a MAPK (Xu *et al.*, 1997), epigenetické změny (Liang *et al.*, 2008) a abnormální nebo opožděný vývoj embryí (Winston *et al.*, 1993).

Stárnutí oocytu způsobuje mnoho morfologických změn, jako jsou změny struktury plazmatické membrány, *zony pellucidy*, cytoskeletu, mitochondrií, přesunutí dělicího vřeténka, vychýlení chromozomů, rozptýlení centrosomu, přemístění pólového tělíska a kortikálních granul a předčasnou exocytózu kortikálních granul (Miao *et al.*, 2009).

Předpokládá se, že jednou z příčin změn při stárnutí oocytů je akumulace vnitrobuněčných reaktivních kyslíkových radikálů a oxidativních poškození (Shigenaga *et al.*, 1994).

Degenerativní změny v oocytech stárnoucích v podmínkách *in vitro* vedou k jejich spontánní partenogenetické aktivaci, fragmentaci nebo lýze (Petrová *et al.*, 2004, 2005, 2009; Jeřeta *et al.*, 2008). Perez *et al.*, (1999) prokázali, že za degeneraci neoplozených myších oocytů, tzv. fragmentaci, je zodpovědná apoptóza.

Příčinou častné spontánní partenogenetické aktivace a fragmentace je snížená aktivita MPF ve stárnoucích oocytech (Kikuchi *et al.*, 1995)

3.3.1. Změny kortikálních granul

U nestárnoucích oocytů tvoří kortikální granula pod oolemou oocytu těsně uspořádanou vrstvu, typicky s výjimkou oblasti nad meiotickým aparátem. Po oplození dojde k přesně koordinované kortikální reakci a tím k vylití obsahu kortikálních granul do perivitelinního prostoru, které způsobí změny *zony pellucidy* a vytvoří extracelulární blok polyspermii (Okada *et al.*, 1993).

Kortikální reakce u nestárnoucích oocytů proběhne typicky pouze po oplození spermií, zatímco u oocytů, které podlely stárnutí se snadno spouští spontánně. Jejich kortikální granula se přesouvají a dochází u nich k částečné exocytóze (Xu *et al.*, 1997; Goud *et al.*, 2005).

3.3.2. Změny dělicího vřeténka

Dělicí vřeténko prasečích oocytů je umístěno periferně, s radiálně orientovanou osou souměrnosti, má tvar soudku a délku přibližně 10 μm . V průběhu stárnutí se vzdálenost mezi póly vřeténka výrazně zvětšuje, dochází také k snížení hustoty periferních mikrofilament, které se podílí na ukotvení dělicího vřeténka ke kortexu oocytu. Tyto změny mohou vést ke špatné segregaci chromozomů u stárnoucích oocytů (Suzuki *et al.*, 2002).

3.3.3. Změny zony pellucidy

Zona pellucida oocytů má charakter granulofibrilární sítě s póry, zatímco u stárnoucích oocytů nabývá dlaždicovité struktury, která sestává z těsných shluků granulofibrilárního materiálu, zřetelně oddělených mezerami o šířce 0,3 μm (Longo, 1981). Při pokusech s chymotrypsinem se také ukázalo, že se *zona pellucida* stárnoucích oocytů rozpustí za podstatně delší čas než *zona pellucida* nestárnoucích oocytů (Longo, 1981, Xu *et al.*, 1997; Goud *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2005).

3.4. Apoptóza

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt je přesně regulovaný proces zániku buněk. Typicky dochází k morfologickými změnám jako je zakulacení buňky a zatažení pseudopodií, rychlé snížení objemu buňky spolu se zvýšením její hustoty, kondenzace chromatinu, rozpad jádra, konvoluce a „blebbing“ cytoplasmatické membrány, kompaktace cytoplasmatických organel a zvětšení endoplasmatického retikula (Wyllie, 1987; Kroemer *et al.*, 2009).

V savčích buňkách je apoptóza zprostředkována skrze vnější nebo vnitřní signální dráhu, v závislosti na původu podnětu.

3.4.1. Vnitřní signální dráha

Podněty k aktivaci vnitřní signální dráhy se obecně označují jako stresory a jsou to např. UV záření, γ záření, genotoxické a cytotoxické látky, volné kyslíkové radikály, metabolické jedy, nedostatek cytokinů, růstových a survival faktorů, toxiny poškozující aktinový cytoskelet, oddělení buňky od extracelulární matrix, chyby replikace nebo rekombinace a mutagenní látky apod. (Nagata, 1997; Fumarola *et* Guidotti, 2004; Norbury *et* Zhivotovsky, 2004; Batista *et al.*, 2009). Poškození DNA způsobené těmito stresory vede k aktivaci proteinu p53, který působí jako transkripční faktor pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 jako jsou Bid, Bik, Bax, Puma, Noxa nebo Bim (Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden *et* Lu, 2002; Tian *et al.*, 2007).

Inaktivace této dráhy zpravidla vede k rakovinnému bujení (Riedl *et* Shi, 2004).

Pro vnitřní signální dráhu je typická mitochondriální dráha, která je kontrolována rodinou pro- a anti-apoptotických Bcl-2 proteinů. Po překročení určitého prahu pro-apoptotických signálů se zvýší permeabilita vnější membrány mitochondrie a uvolní se apoptogenní proteiny jako je cytochrom c, endonukleáza G, AIF (apoptotic inducing factor), Smac/DIABLO, HtrA2/Omi a další (Chipuk *et* Green, 2008; Youle *et* Strasser, 2008). AIF je flavoprotein, který má schopnost indukovat apoptotické změny jádra bez aktivace kaspáz (Susin *et al.*, 1999). Uvolnění cytochromu c a dalších proteinů z mitochondrie je umožněno zformováním MAC kanálu (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) ve vnější membráně mitochondrie, který je tvořen proteiny Bax a Bak (Dejean *et al.*, 2010).

Cytochrom c uvolněný do cytoplasmy se v přítomnosti dATP nebo ATP váže na Apaf-1 a vytváří oligomerní komplex, tzv. apoptozóm (Zou *et al.*, 1999; Purring *et al.*, 1999).

Na apoptozóm se poté naváže iniciační kaspáza této dráhy, pro-kaspáza 9, což vede k její autoaktivaci (Li *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1999). Tvorba komplexu mezi kaspázou 9 a Apaf - 1 je zprostředkována vysoce specifickou vazbou mezi CARD doménami (Caspase activation and recruitment domain) obou proteinů (Zkou *et al.*, 1999).

Aktivovaná kaspáza 9 dále aktivuje pro-kaspázy 3 a 7. Aktivovaná kaspáza 3 dále zpětně aktivuje pro-kaspázy 3 a 9, čímž vytváří dráhu pozitivní zpětné vazby a štěpí další proteiny, což vede k apoptotickým změnám jako je smrštění buněk, “blebbing“ cytoplasmatické membrány, kondenzace chromatinu a fragmentace DNA (Porter *et Jänicke*, 1999; Fan *et al.*, 2005).

3.4.2. Vnější signální dráha

Tato dráha je zahájena extracelulárními ligandy z TNF rodiny jako jsou TNF α , FasL/CD95L, TRAIL a další (Krammer, 2000; Screaton *et Xu*, 2000), které se váží na odpovídající membránové receptory smrti (TNFR, Fas/CD95, DR3 a DR4/DR5) a způsobují jejich trimerizaci. Na vnitřní straně membrány se na doménu (DD – death domain) těchto receptorů připojí adaptorové proteiny TRADD nebo FADD, na které se přes DED doménu (death effector domain) připojí pro-kaspázy 8 nebo 10 (Micheau *et al.*, 2002). Ligand, receptor, adaptorový protein a kaspáza 8 vytváří tzv. DISC (death inducing signaling complex) (Kischkel *et al.*, 1995). Těsným navázáním dvou pro-kaspáz 8 dojde k jejich autoaktivaci. Aktivní kaspázy 8 poté aktivují v závislosti na typu buňky různé další signální dráhy. V lymfoidních buněčných liniích je kaspáza 8 silně aktivní a přímo aktivuje pro-kaspázu 3. V jiných buňkách není kaspáza 8 schopna pro-kaspázu 3 aktivovat. Spouští však mitochondriální apoptotickou dráhu přes Bid, pro-apoptotického člena rodiny Bcl-2, jeho štěpením v aktivní formu tBid (Gross *et al.*, 1999, Li *et al.*, 1998). tBid následně stimuluje tvorbu Bax nebo Bak pórů ve vnější mitochondriální membráně, které umožní vylití cytochromu c, AIF a jiných proteinů z mitochondrie a tím spuštění apoptózy (Korsmeyer *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2005).

Kromě aktivace FADD a následně kaspázy 8 interaguje Fas/CD95 i s proteinem Daxx. Aktivovaný Daxx následně aktivuje apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), která funguje jako MAPKKK v signálních drahách c-Jun N-terminální kinázy a p38 MAPK. Trvalá aktivace JNK a p38 MAPK signálních drah poté vede k apoptóze (Yang *et al.*, 1997, Chang *et al.*, 1998).

3.4.3. Kaspázy

Kaspázy jsou proteázy obsahující cystein, které specificky štěpí peptidovou vazbu za aspartátem (Alnemri, 1997). Všechny obsahují v aktivním místě stejnou pentapeptidovou sekvenci QACXG (Q - glutamin, A - alanin, C - cystein, X - arginin/glutamin/glycin, G - glycin). Jsou syntetizovány jako inaktivní proenzymy (zymogeny), které se skládají z N - terminálního peptidu (prodomény) variabilní délky, velké p20 podjednotky s aktivním cysteinovým místem a malé p10 podjednotky, která se účastní rozpoznávání substrátu a katalýzy enzymatických reakcí (Cohen, 1997; Lamkanfi *et al.*, 2002). Intracelulární a extracelulární signály vedou k tvorbě proteinových komplexů, tzv. caspase activation platforms, na které se kaspázy váží svou prodoménou. Strukturální změny proenzymu nebo blízkost dvou proenzymů vyvolá aktivaci autoproteolytickým oddělením dvou katalytických podjednotek p10 a p20 (Riedl *et Shi* 2004, Fuentes-Prior *et Salvesen* 2004). Kaspázy s méně než 30 aminokyselinovými zbytky, tj. kaspázy 3, 6 a 7 jsou aktivovány proteolytickým štěpením jinou kaspázou nebo granzymem B (Degterev *et al.*, 2003). Kaspáza 9 může mít významnou aktivitu i v nerozštěpeném stavu (Stennicke *et al.*, 1999).

Do současnosti bylo zaznamenáno 15 savčích kaspáz, přičemž kaspázy 11 a 13 jsou ortology lidské kaspázy 4 (Koenig *et al.*, 2001; Lamkanfi *et al.*, 2002; Eckhart *et al.*, 2005). Kaspázy mohou být rozděleny do tří funkčních skupin a to iniciační (kaspázy 2, 8, 9 a 10), pro které je charakteristická prodloužená oblast N-konce, která obsahuje jednu nebo více adaptorových domén, efektorové (kaspázy 3, 6 a 7), které mají typicky 20 – 30 aminokyselinových zbytků ve své prodoménové sekvenci a kaspázy, účastníci se zánětlivých procesů a aktivace cytokinů (1, 4, 5, 11, 12, 13 a 14) (Cohen, 1997; Riedl *et Shi*, 2004).

Iniciační kaspázy obsahují doménu smrti (DD – death domain) a CARD doménu (caspase activation and recruitment domain) (kaspázy 1, 2, 4 a 9) nebo DED doménu (death effector domain) (kaspázy 8 a 10), které umožňují interakce kaspáz s jinými molekulami (Rastogi *et al.*, 2009).

Iniciační kaspázy jsou aktivovány adaptorovými proteiny jako jsou FADD a Apaf-1, které se váží na prodomény kaspázových proenzymů (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997). Schopnost adaptorových molekul aktivovat kaspázy je kontrolována několika rodinami regulačních molekul. Apoptóza spouštěná přes Apaf-1 může být inhibována členy rodiny Bcl-2 (Hu *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Moriishi *et al.*, 1999) a apoptóza signalizovaná FADD může být inhibována proteinem FLIP (Irmeler *et al.*, 1997).

Aktivace kaspáz nevede k úplné degradaci buněčných proteinů, spíše k selektivnímu

štěpení určitých cílových proteinů, většinou na jednom, nebo několika místech jejich řetězce, vždy však po aspartátu. Většinou vedou tyto sestřihy k inaktivaci proteinů, může však dojít i k aktivaci a to buď přímo, odštěpením negativní regulační domény, nebo nepřímo, inaktivací regulační podjednotky (Hengartner, 2000).

3.4.3.1. IAPs – proteiny inhibující apoptózu

Rodina IAP proteinů je charakteristická svou schopností potlačovat apoptózu vazbou na kaspázy a BIR doménou (baculoviral IAP repeat), označovanou podle baculoviru, ve kterém byly IAP původně objeveny. (Crook *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994). Někdy se tyto proteiny označují i jako BIRCs (BIR-containing proteins), neboli proteiny obsahující BIR doménu.

Pro schopnost potlačovat apoptózu je nutná přítomnost alespoň jedné BIR domény a v některých případech i RING domény (Clem *et al.* 1994; Deveraux *et al.*, 1997). Lidské proteiny c-IAP1 a c-IAP2 obsahují mezi BIR a RING doménami i CARD doménu, zdá se však, že pro potlačení apoptózy není nezbytně nutná (Roy *et al.*, 1997).

XIAP, c-IAP1, c-IAP2 a Survivin jsou schopné vázat, a tím silně inhibovat, kaspázy 3, 7 a 9, ne však kaspázy 1, 6, 8 a 10 (Deveraux *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997, Tamm *et al.*, 1998).

Přestože IAP proteiny nejsou schopné se vázat na iniciační kaspázu vnější signální dráhy, kaspázu 8, váží se a inhibují její efektorovou kaspázu 3 a tím zastavují proteolytickou kaskádu této dráhy (Deveraux *et al.*, 1997, 1998; Roy *et al.*, 1997).

Naopak v mitochondriální signální dráze se XIAP, c-IAP1 a c-IAP2 váží přímo na iniciační pro-kaspázu 9, a tím brání její aktivaci cytochromem c (Deveraux *et al.*, 1998).

Smac/DIABLO je protein uvolňovaný v průběhu apoptózy z mitochondrií, který svou vazbou neutralizuje inhibiční aktivitu proteinů IAPs. Vazba Smac/DIABLO na IAPs zabraňuje jejich interakci s kaspázami, kterou inhibují jejich aktivaci nebo aktivitu (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000).

3.4.4. Rodina proteinů Bcl-2

Bcl-2 proteiny se v buňkách vyskytují hlavně na vnější membráně mitochondrií, byly ale detekovány i v mitochondriální matrix a kristách, na perinukleární membráně a v cytoplasmě (Monaghan *et al.*, 1992).

Proteiny Bcl-2 rodiny mohou být rozděleny do tří skupin na základě jejich struktury a role v apoptóze:

- Anti-apoptotické proteiny, pro které je charakteristická přítomnost všech čtyř Bcl-2 homologních domén (BH1, BH2, BH3 a BH4). Jsou to např. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mbcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10, Bcl-B.
- Pro-apoptotické proteiny (např. Bax, Bak, Bok/Mtd a Bcl-Xs), které obsahují tři homologní domény BH1, BH2 a BH3
- Proteiny, které obsahují pouze BH3 doménu (tzv. BH3-only faktory) – Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, BimL/Bod, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Bnip3 a Bnip3 L, které se podílejí na regulaci apoptózy aktivací pro-apoptotických proteinů jako je Bax, nebo inhibicí anti-apoptotických proteinů jako je Bcl-2. (Tsujimoto *et Shimizu* 2000; Er *et al.*, 2006)

Proteiny Bcl-2 rodiny mají unikátní schopnost homodimerizace nebo heterodimerizace anti-apoptotických a pro-apoptotických proteinů, čímž se mohou navzájem inhibovat (Oltvai *et al.*, 1993; Yin *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1996b). Heterodimerizace těchto proteinů je umožněna vazbou BH3 domény u pro-apoptotického proteinu do hydrofobní štěrbině tvořené BH1, BH2 a BH3 anti-apoptotického proteinu (Sattler *et al.*, 1997).

Multidoménové proteiny se mohou vyskytovat v aktivní nebo inaktivní konformaci. Ve zdravých buňkách se pro-apoptotické multidoménové proteiny vyskytují jako neaktivní monomery lokalizované v mitochondriích (Bak) nebo v cytosolu (Bax) (Wolter *et al.*, 1997).

V živých buňkách brání apoptotickým změnám na mitochondriích převážně anti-apoptotičtí členové rodiny Bcl-2. V průběhu apoptózy jsou aktivovány pro-apoptotické proteiny Bcl-2 rodiny defosforylací (Bad) a proteolytickým štěpením kaspázami (Bid), které vedou ke změně konformace a k odhalení BH3 domény (Zha *et al.*, 1996a; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998),

3.4.4.1. Pro-apoptotické faktory a BH3-only faktory

Pro-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2, zvláště ty obsahující pouze BH3 doménu, indukují buněčnou smrt vazbou na anti-apoptotické proteiny, čímž neutralizují jejich efekt na adaptorové proteiny, které jsou tím uvolněny a mohou spouštět kaskádu kaspáz (Puthalakath *et al.*, 1999).

Inaktivní Bim je lokalizován v cytoplasmě, navázán na lehký dyneinový řetězec,

kterým je připojen k dyneinovému motorovému komplexu na mikrotubulech. Apoptotické podněty rozruší toto spojení, čímž se Bim uvolní a může inhibovat anti-apoptotické faktory Bcl-2 (Puthalakath *et al.*, 1999).

Bax je ve zdravých buňkách jako monomer volně v cytoplasmě, případně volně připojený k membránám, při apoptóze se však přesouvá do membrán buněčných organel (Wolter *et al.*, 1997).

3.4.4.2. Anti-apoptotické faktory

Anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, A1/Bfl-1, Mcl-1 a Boo) regulují apoptózu kontrolou adaptorových proteinů, jsou proto zásadní pro přežití buněk (Oltvai *et Korsmeyer*, 1994; Adams *et Cory*, 1998).

Pro anti-apoptotickou aktivitu této podrodiny Bcl-2 proteinů je zásadní jejich BH4 doména (Huang *et al.*, 1998).

Bcl-2 a Bcl-x_L brání mitochondriálním změnám jako je uvolnění cytochromu c a snížení membránového potenciálu ψ (Kharbanda *et al.*, 1997). Bcl-2 byl lokalizován v jaderné membráně, endoplasmatickém retikulu a ve vnější membráně mitochondrie (Chen-Levy *et al.*, 1989; Hockenbery *et al.*, 1990; Monaghan *et al.*, 1992; Krajewski *et al.*, 1993). Bcl-x_L se vyskytuje na vnější membráně mitochondrie, ale i volně v cytoplasmě (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997).

Jedním z klíčových anti-apoptotických mechanismů účinku Bcl-2 je řízení hladin vápníkových iontů v buňkách, a to konkrétně tlumením jeho mobilizace z endoplazmatického retikula (Hanson *et al.*, 2004) a snížením jeho příjmu mitochondriemi, ve kterých jinak podporuje apoptotické změny (Hanson *et al.*, 2008).

Bcl-x_L se skládá ze dvou centrální hydrofobních α -helixů, obklopených pěti amfipatickými helixy (Muchmore *et al.*, 1996). Bcl-x_L se dokáže vázat na Apaf-1 současně s kaspázou 9, čím může hrát další roli v regulaci apoptózy (Pan *et al.*, 1998).

Bcl-x_L byl u prasat mimojiné detekován v partenogeneticky aktivovaných embryích (Jeong *et al.*, 2005).

3.5. Sulfan

H_2S je nejjednodušší sloučenina síry s vodíkem, bezbarvý plyn, jenž ve velkém zředění nepříjemně zapáchá po shnilých vejcích. Lze jej připravit přímou syntézou jeho složek $\text{S} + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$, $\Delta H = 4,8 \text{ kcal}$. Laboratorně se obvykle připravuje rozkladem sulfidů kyselinami, např. $\text{FeS} + 2 \text{HCl} \rightarrow \text{FeCl}_2 + \text{H}_2\text{S}\uparrow$. Sulfan je chemicky velmi aktivní, zapálený na vzduchu shoří modrým plamenem na vodní páru a oxid siřičitý. S většinou kovů se ochotně slučuje na příslušné sulfidy, zejména za přítomnosti vlhkosti nebo tepla. Má silné redukční účinky. Ve vodě je rozpustný, jeho vodný roztok reaguje kyselé, protože se chová jako velmi slabá dvojsytná kyselina. Nenasycený vodný roztok sulfanu slouží v laboratořích jako činidlo pod názvem sirovodíková voda. H_2S je velmi jedovatý, vdechovaný v malých množstvích způsobuje bolest hlavy, závratě a nevolnost. Ve větší koncentraci může stejně jako kyanovodík přivodit náhlou smrt (Bína, 1968).

Primární biochemický efekt způsobující jeho toxicitu je inhibice cytochrom c oxidázy mitochondrií (Dorman *et al.*, 2002). Cytochrom c oxidáza je koncový elektronový akceptor mitochondriálního dýchacího řetězce, který katalyzuje oxidaci ferrocitochromu c plynným molekulárním kyslíkem. Není proto překvapivé, že s tímto enzymem mohou reagovat i jiné plyny jako oxid dusnatý, oxid uhelnatý, kyanovodík a sulfan (Cooper *et Brown*, 2008).

Mechanismus působení sulfanu je jiný než u NO nebo CO, které využívají guanylyl cyklázu a její produkci cGMP (Abe *et Kimura*, 1996; Zhao *et al.*, 2001). Sulfan pravděpodobně otevírá ATP – dependentní draslíkové kanály a tím např. hyperpolarizuje membránový potenciál hladké svaloviny, což vede k její relaxaci (Zhao *et al.*, 2001). Sulfan dále také přeměňuje thiolové (-SH) funkční skupiny proteinů přidáním síry na hydropersulfidové (-SSH), které mají vyšší chemickou reaktivitu. Například sulfhydratace jaterního proteinu GAPDH zvýší jeho aktivitu sedmkrát (Mustafa *et al.*, 2009b).

Koncentrace H_2S v savčích tkáních a krvi je relativně vysoká 10 – 160 μM a ještě se zvyšuje při zánětlivých procesech (Li *et al.*, 2005). Aktivní enzymatický transport sulfanu do buněk však nebyl potvrzen (Mathai *et al.*, 2009).

Při pH 7,4 se sulfan v buňkách vyskytuje ve formě HS^- nebo H_2S v poměru 3 : 1. Tato ionizace H_2S při fyziologickém pH naznačuje jeho zvýšenou permeabilitu skrz lipidové membrány oproti NO nebo CO (Kabil *et Banerjee*, 2010).

V buňkách je sulfan rychle oxidován, hlavně v mitochondriích, na thiosulfát, který se rychle přeměňuje na sulfit a sulfát. Oxidace na thiosulfát je pravděpodobně neenzymatický proces spojený s transportem elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně, není však

vyloučeno, že by tato reakce mohla být katalyzována i pomocí superoxidodismutázy. Přeměnu thiosulfátu na sulfid katalyzuje enzym thiosulfát-kyanid sulfurtransferáza (TST). Závěrečná přeměna sulfidu na sulfát probíhá za přítomnosti sulfid oxidázy (SO) (Łowicka *et* Bełtowski, 2007). Velmi malá část H₂S je methylována v cytosolu konvertována na méně toxické látky jako je methylmercaptan a dimethylsulfát prostřednictvím enzymu thiol S-metyl transferázy (Wang, 2002). Tyto metabolity se vyloučí ledvinami, gastrointestinálním ústrojím a plícemi během 24 hodin, takže endogenně produkovaný H₂S se za fyziologických podmínek neakumuluje v organismu v míře toxického ohrožení buněk. Další cesta eliminace sulfanu je jeho vazba na hemoglobin, podobně jako je tomu u CO nebo NO, čímž vzniká sulfhemoglobin (Wang, 2002; Stárka, 2009)

3.5.1. Enzymatická produkce endogenního H₂S

Jsou známy tři hlavní enzymy schopné fyziologicky produkovat sulfan, a to cystathionin β -syntáza (CBS, EC 4.2.1.22), cystathionin γ -lyáza (CSE, EC 4.4.1.1) a 3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza (MPST, EC 2.8.1.2) (Kimura *et. al.*, 2009). Kromě okamžité produkce sulfanu enzymy, může být v buňce také uložen ve vazbě jako sulfan síry, ze kterého se uvolňuje na základě fyziologických podnětů (Kimura, 2011).

3.5.1.1. Cystathionin β -syntáza (CBS)

Cystathionin β -syntáza vytváří cystathionin kondenzací homocysteinu se serinem, v jiné reakci katalyzuje tvorbu sulfanu z cysteinu přes β -substituční reakci s různými thioley, přičemž současně dochází k formaci odpovídajícího thiolového etheru (Braunstein *et al.*, 1971; Porter *et al.*, 1974). CBS se vyskytuje převážně jako homotetramer s molekulární hmotností podjednotek 63 kDa. Každá podjednotka také váže kofaktor pyridoxal 5'-fosfát (PLP), allosterický aktivátor S-adenosyl methionin (SAM) a hem, který upravuje aktivitu enzymu na základě redoxních změn a vazby oxidu uhelnatého (Miles *et* Kraus 2004; Banerjee *et* Zou 2005).

C-koncová část CBS obsahuje tandemovou repetici „CBS domény“, která má pravděpodobně inhibiční funkci, protože její delece vede k aktivaci enzymu (Kery *et al.*, 1998; Shan *et* Kruger 1998). CBS doména může být sumoylována (Kabil *et al.*, 2006), což naznačuje na lokalizaci enzymu v jádře buněk. Katalytická aktivita CBS je sumoylizací inhibována (Agrawal *et* Banerjee, 2008).

Množství CBS je relativně vysoké v mozku, kde se předpokládá, že je fyziologickým zdrojem H₂S (Abe *et* Kimura, 1996). Exprese CBS chybí v tkáních lidských komor a předsíní, nebyla prokázána ve *vena saphena*, v koronárních cévách ani aortě. CBS má hlavní úlohu při generování H₂S v mozku, nikoli však v kardiovaskulárním systému (Wang, 2002). Popsána byla exprese CBS v endoteliálních buňkách umbilikálních cév (Abe *et* Kimura, 1996).

3.5.1.2. Cystathionin γ -lyáza (CSE)

Cystathionin γ -lyáza je další enzym, který dokáže vytvářet sulfan z cysteinu nebo cystinu (Cavallini *et al.*, 1962a,b; Szczepekowski *et* Wood, 1967) jejich rozkladem na thiocystein, pyruvát a amoniak. Thiocystein následně reaguje s cysteinem nebo jinými thioley a produkuje sulfan a cystin, nebo odpovídající disulfid. Klasická funkce CSE je však hydrolyza cystathioninu na cystein s amoniakem a α -ketobutyratem jako vedlejšími produkty (Gaddala *et* Snyder, 2010). V periferních tkáních je množství CSE vyšší než CBS, které ale dominuje v mozku. (Abe *et* Kimura, 1996; Yang *et al.*, 2008; Mustafa *et al.*, 2009a,b).

3.5.1.3. 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (MPST)

3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza dokáže produkovat H₂S z 3-merkaptopyruvátu, který je produktem cystein aminotransferázy (CAT) z L-cysteinu a α -ketoglutarátu (Shibuya *et al.*, 2009a,b). Je lokalizovaný v mitochondriích a částečně i v cytoplasmě v neuronech, mitrálních buňkách oční bulvy, Purkyňových buňkách, pyramidových neuronech v mozkové kůře a hipocampu (Kimura, 2010). Dále se také objevuje v endotelu a hladké svalovině cév (Shibuya *et al.*, 2009b). Nagahara *et al.* (1998) zjistil u krys výskyt tohoto enzymu v endotelu proximálních tubulů ledvin, jaterních hepatocytech, buňkách srdeční svaloviny a v neurogliálních buňkách mozku. Intracelulární lokalizace se mezi tkáněmi lišila, převážně byl enzym MPST lokalizován v mitochondriích a cytoplasmě.

MPST a CAT jsou lokalizovány hlavně v mitochondriích, které v buňkách produkují většinu reaktivních forem kyslíku. Buňky s vysokým množstvím těchto enzymů vykazují odolnost k oxidativnímu stresu, která může být zapříčiněna právě vyšší produkcí H₂S (Kimura, 2010).

3.5.2. Biologické účinky sulfanu

H₂S je signální gasotransmitter, který působí na různé iontové kanály a receptory. Je první identifikovaný gasotransmitter otevírající ATP – citlivé K⁺ kanály v buňkách hladké svaloviny cév. Tím snižuje krevní tlak, chrání srdce před ischemií, inhibuje sekreci inzulínu v pankreatických β buňkách a vykazuje protizánětlivé, protibolestivé a protiapoptotické účinky. Uplatňuje se i v regulaci Ca²⁺ a Cl⁻ kanálů v různých tkáních (Wang *et al.*, 2010).

Jako signální molekula reguluje nervový přenos, uvolňuje hladkou svalovinu, ovlivňuje uvolňování inzulínu a je zapojen v zánětlivých procesech (Kimura, 2011).

H₂S chrání kultury neuronů před oxidativním stresem způsobeným glutamátem, tzv. oxidativní glutamátovou toxicitou, zvyšováním množství antioxidantu glutathionu v buňkách, pomocí zvyšování aktivity gama-glutamylcystein syntetázy a zvýšením transportu cystinu a cysteinu, které jsou limitujícími substráty v jeho syntéze (Kimura *et al.* 2004). Sulfan produkovaný v mitochondriích také může přímo snižovat oxidativní stres (Kimura *et al.*, 2010). Jako neuroprotektor působí i díky vlivu na tyrosin kinázy a MAP kinázy (Tan *et al.*, 2009), kdy chrání proti imunologickému a oxidativnímu stresu (Chen *et al.*, 2007).

Nízké dávky sulfanu dokáží vyvolat reverzibilní stav silně zpomaleného metabolismu u nehibernujících zvířat, jako je myš domácí, a to aniž by jim to přivodilo nějakou újmu, což naznačuje jeho možné budoucí použití jako anestetika (Blackstone *et al.*, 2005).

O zapojení sulfanu do regulace reprodukčních procesů je toho známo zatím velice málo. Byla prokázána přítomnost enzymů cystathionin- β -syntázy (CBS) a cystathionin- γ -lyázy (CSE) v intrauterinní tkáni potkana a člověka. Jejich prostřednictvím zde dochází k syntéze sulfanu, jehož přítomnost byla zjištěna u potkana v děloze, placentě a plodových obalech. Přítomnost sulfanu byla popsána i v placentě člověka. Endogenně produkovaný sulfan zde patrně ovlivňuje patologické procesy spojené s preeklampsií a těhotenstvím (Patel *et al.*, 2009).

Během oogeneze a folikulogeneze je granulózními buňkami secernována folikulární tekutina, která mimo jiné obsahuje též homocystein a methionin. Do metabolismu těchto látek je zapojena CBS, která uvolňuje sulfan a ten pravděpodobně reguluje průběh vývoje oocyty. Přítomnost CBS přímo v oocytech však zatím prokázána nebyla. Vysoká exprese mRNA pro CBS byla zatím detekována pouze v granulózních buňkách antrálních folikulů. To by mohlo naznačovat možnou roli CBS jako mediátoru interakcí oocyty s granulózními buňkami (Liang *et al.*, 2006). Zapojení sulfanu do procesu stárnutí oocytů zatím nebylo prokázáno.

Vliv sulfanu na apoptózu byl prokázán v několika výzkumech. Hu *et al.* (2009) se zabývali vlivem sulfanu na poškození lidských buněk neuroblastomu toxinem rotenonem. Prokázali, že sulfan v závislosti na koncentraci svého donoru Na₂S, snižoval rotenonem způsobené poškození buněk a apoptózu. Konkrétně bránil fosforylaci MAP kinázy JNK kinázou, změnám v hladinách Bcl-2 a Bax, snížení membránového potenciálu ψ v mitochondriích, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz 9 a 3 (Hu *et al.*, 2009).

Sulfan dále chránil buňky rakoviny tlustého střeva před apoptózou indukovanou b-fenylethyl isothiokyanátem (Rose *et al.*, 2005).

Naopak Cao *et al.* (2005) popsali indukci apoptózy donorem sulfanu Na₂S u acinárních buněk pankreatu. Docházelo u nich k aktivaci kaspáz 3, 8 a 9, aktivaci exprese pro-apoptického proteinu Bax a naopak nedocházelo k aktivaci anti-apoptických faktorů Bcl-2 a Bcl-x_L. Dále byla snížena aktivita proteinu FLIP, inhibujícího apoptózu (Cao *et al.*, 2005).

Sulfan ve fyziologických koncentracích dále indukoval apoptózu lidských buněk hladké svaloviny aorty. Bylo prokázáno že endogenní hladiny H₂S v těchto buňkách jsou důležité pro apoptózu těchto buněk, která má fyziologický význam při vaskulární remodelaci (Yang *et al.*, 2004).

4. Materiál a metody

4.1. Získávání a odběr oocytů

Oocyty byly získávány z folikulů vaječníků jatečně poražených prasnic v různé fázi pohlavního cyklu. Bezprostředně po odběru byly vaječníky umístěny do termosek s fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C a přepraveny do laboratoře KVD. Oocyty byly z vaječníků aspirovány pomocní injekční stříkačky a jehly 20G (Sterican, Braun Melsunger, Německo). Pod binokulární lupou byly následně ze získané folikulární tekutiny pomocí tenké skleněné kapiláry vybírány kvalitní oocyty s neporušenou cytoplasmou a kompaktním obalem kumulárních buněk.

4.2. Kultivace oocytů

Před kultivací byly oocyty omyty v modifikovaném kultivačním médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Skotsko), které obsahuje hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7 % roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), 10% fetálního telecího séra (GibcoBRL, Life technologies, Německo, Lot No. 40F2190F) a 13,5 IU eCG: 6,6 hCG/ml (P.G. 600, Intervet, Boxmeer, Holandsko). Kultivace probíhala v Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Dánsko) s 3 ml kultivačního média, při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem. Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze 2. meiotického dělení. Poté z nich byly mechanicky skleněnou pipetou odstraněny kumulární buňky a kultivace probíhala dále po dobu 24, 48 a 72 hodin. Pokusné skupiny byly kultivovány za přítomnosti 300 μM donoru sulfanu Na₂S a kontrolní skupiny pouze v čistém modifikovaném médiu M199. Koncentrace 300 μM Na₂S byla použita na základě předchozích experimentů, ve kterých byla prokázána jako efektivní.

4.3. Kontrola zrání oocytů

Pro kontrolu zrání oocytů v našich kultivačních podmínkách bylo z každého experimentu vybráno několik oocytů, které byly 48 hodin fixovány v roztoku ethanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1. Poté byly obarveny 1 % vodným roztokem orceinu a posouzeny pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Do hodnocení byly zahrnuty pouze experimenty, z nichž dosáhlo 85 % kontrolních oocytů po 48 hodinách inkubace stádia metafáze II.

4.4. Metodika stanovení intracelulární lokalizace enzymů katalyzujících syntézu sulfanu a anti-apoptického faktoru Bcl-x_L ve stárnoucích oocytech

Po uplynutí příslušné doby kultivace byly oocyty zbaveny zony *pellucidy* pomocí média s přidavkem 0,1 % pronázy. Takto připravené oocyty byly při laboratorní teplotě 39 °C opláchnuty ve třech kapkách 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin) v PBS a poté 1 hodinu fixovány v 2,5 % (w/v) paraformaldehydu v PBS, přičemž byl fixační roztok po 30 minutách vyměněn za čerstvý. Fixované oocyty byly ošetřeny 0,5 % (v/v) Tritonem X-100 v PBS při laboratorní teplotě, po 2 hodinách krátce opláchnuty v 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS a následně inkubovány přes noc při teplotě + 4 °C ve vlhkém prostředí v inkubačním médiu (0,1 % (w/v) BSA a 0,01 % (v/v) Tween 20 v PBS) s primární protilátkou specifickou pro daný enzym nebo anti-apoptický faktor Bcl-x_L (anti-MPST, anti-CBS, anti-CSE, anti-Bcl-x_L; Sigma – Aldrich), ředěnou v poměru 1 : 100. Nenavázané protilátky byly odmyty v roztoku 0,1 % (v/v) Tween 20 v PBS při laboratorní teplotě třikrát po dobu 10-ti minut. Poté byly oocyty 1 hodinu inkubovány ve tmě se sekundárními protilátkami anti-králičí nebo anti-myší IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem - FITC (Jackson ImmunoResearch). Negativní kontroly byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou proti daným enzymům nebo faktoru Bcl-x_L, aby se vyloučila nespecifická vazba na tyto enzymy nebo faktor. Byly použity pouze experimenty, které nevykazovaly žádný signál v negativní kontrole.

Po inkubaci byly oocyty třikrát promyty v roztoku 0,1 % (w/v) BSA v PBS po dobu 10 minut a 15 minut barveny v barvivu Hoechst 33258 (Sigma – Aldrich) pro vizualizaci chromatinu. Následně byly oocyty opláchnuty v ekvilibračním pufru a přeneseny v kapce glycerolu v PBS na podložní sklíčko. Preparáty byly poté sledovány na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu (Leica SPE, Německo) a hodnoceny v programu analýzy obrazu NIS Elements.

4.5. Statistické hodnocení

Každý experiment byl minimálně třikrát opakován. Výsledky všech experimentů byly statisticky vyhodnoceny programem STATISTICA 9.0. Pro testování statistické významnosti rozdílů mezi skupinami oocytů byl použit dvouvýběrový t-test a analýza rozptylu s hladinami významnosti $p < 0,05$.

4.6. Experimentální schéma

Pro experimenty byly použity pouze skupiny oocytů, z nichž 85 % kontrolních oocytů dosáhlo po 48 hodinách kultivace stádia MII. Pro vyhodnocení byly použity pouze experimenty jejichž negativní kontrola, inkubovaná jen se sekundárními protilátkami nevykazovala žádný pozitivní signál. Oblasti chromatinu nebo dělicího vřeténka v oocytech v MII fázi a prvojádra stárnoucích oocytů, byly ve výsledcích zjednodušeně označeny jako jádro.

Experiment č. 1 Lokalizace enzymů katalyzujících syntézu sulfanu ve stárnoucích oocytech prasete

Tento experiment byl zaměřen na sledování intracelulární lokalizace a redistribuce enzymů 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (MPST), cystathionin γ -lyázy (CSE) a cystathionin β -syntázy (CBS), katalyzujících syntézu sulfanu v buňkách. Byly hodnoceny oocyty ve stádiu MII a oocyty vystavené prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin. Intracelulární lokalizace a redistribuce enzymů MPST, CSE a CBS byla sledována imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metody 4.4.). Oocyty byly snímány laserovým konfokálním mikroskopem (Leica, SPE, Německo) a následně vyhodnoceny v programu analýzy obrazu NIS Elements.

Experiment č. 2 Vliv donoru sulfanu Na_2S na lokalizaci a intracelulární distribuci faktoru Bcl-xL během stárnutí prasečích oocytů

V rámci druhého experimentu byl lokalizován anti-apoptotický faktor Bcl-x_L v oocytech ve stádiu MII a v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin v kultivačním médiu M199, nebo v kultivačním médiu M199 s přídatkem donoru sulfanu Na_2S v koncentraci 300 μM . Intracelulární lokalizace a redistribuce faktoru Bcl-x_L byla sledována imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metody 4.4.). Oocyty byly snímány laserovým konfokálním mikroskopem (Leica, SPE, Německo) a následně vyhodnoceny v programu analýzy obrazu NIS Elements. Hodnoty průměrných intenzit signálu v jednotlivých oblastech oocytů byly statisticky vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem a analýzou rozptylu.

5. Výsledky

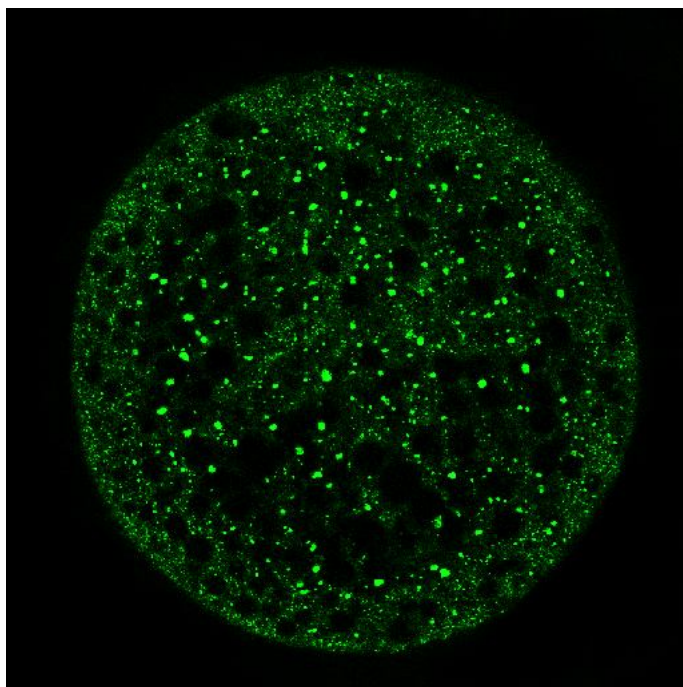
5.1. Lokalizace enzymů katalyzujících syntézu sulfanu ve stárnoucích oocytech prasete

Cílem prvního experimentu bylo lokalizovat enzymy MPST, CSE a CBS v oocytech ve stádiu MII a oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin.

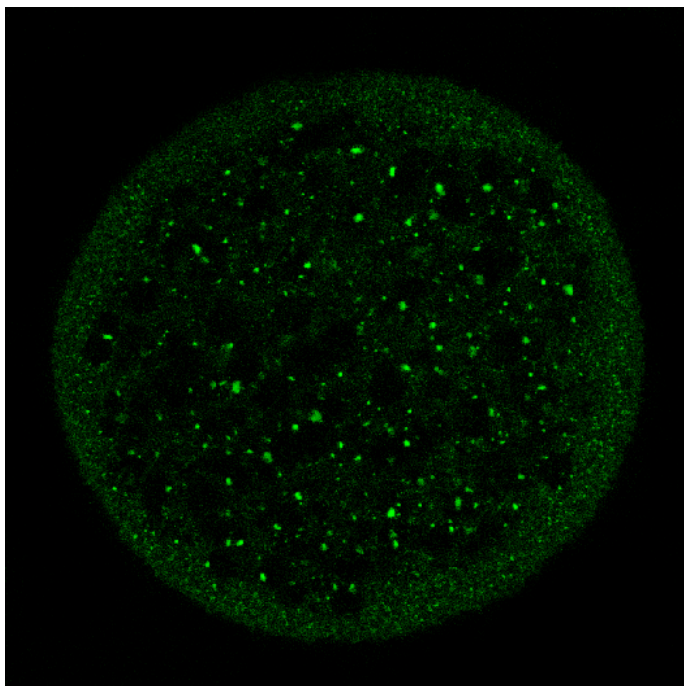
5.1.2. Lokalizace 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (MPST)

Enzym MPST byl detekován v jednotlivých ložiscích rozptýlených v cytoplasmě u oocytů ve fázi MII i u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin. Intenzita signálu enzymu MPST i počet jednotlivých ložisek se u stárnoucích oocytů postupně snižovala.

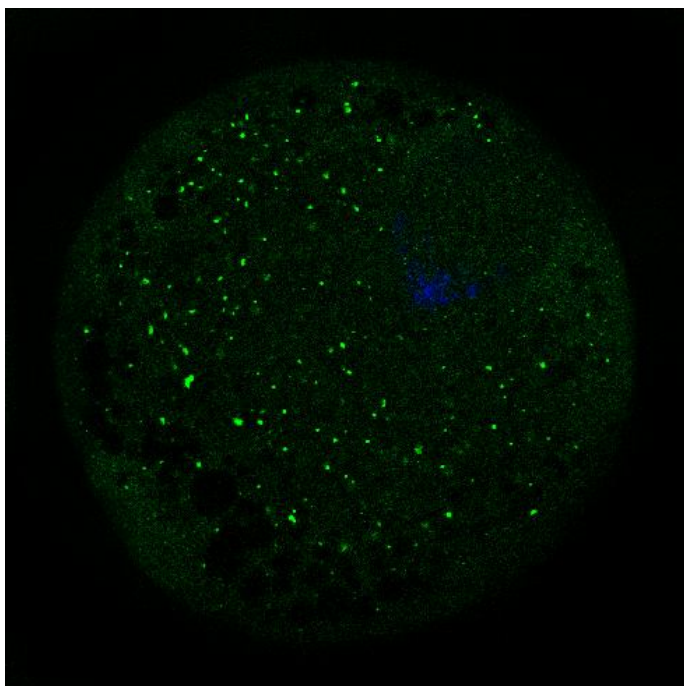
***Obrázek č. 1** Lokalizace enzymu MPST v oocytu ve fázi MII (MPST značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).*



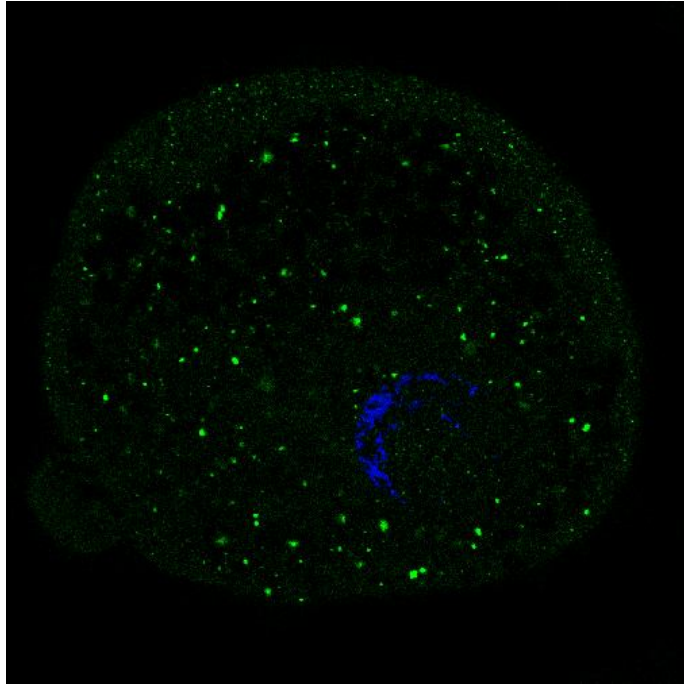
Obrázek č. 2 Lokalizace enzymu MPST v oocyty po 24 hodinách prodloužené kultivace (MPST značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 3 Lokalizace enzymu MPST v oocyty po 48 hodinách prodloužené kultivace (MPST značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 4 Lokalizace enzymu MPST v oocyty po 72 hodinách prodloužené kultivace (MPST značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



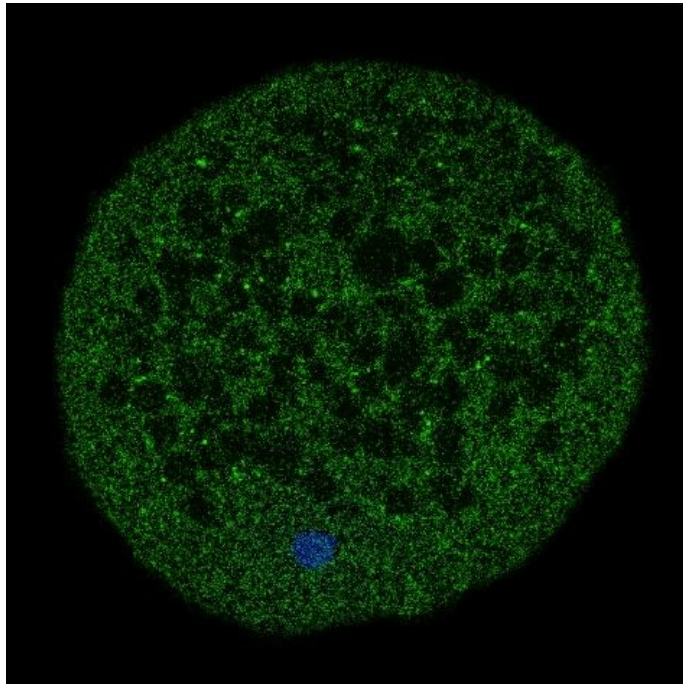
Obrázek č. 5 Negativní kontrola experimentu (MPST značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



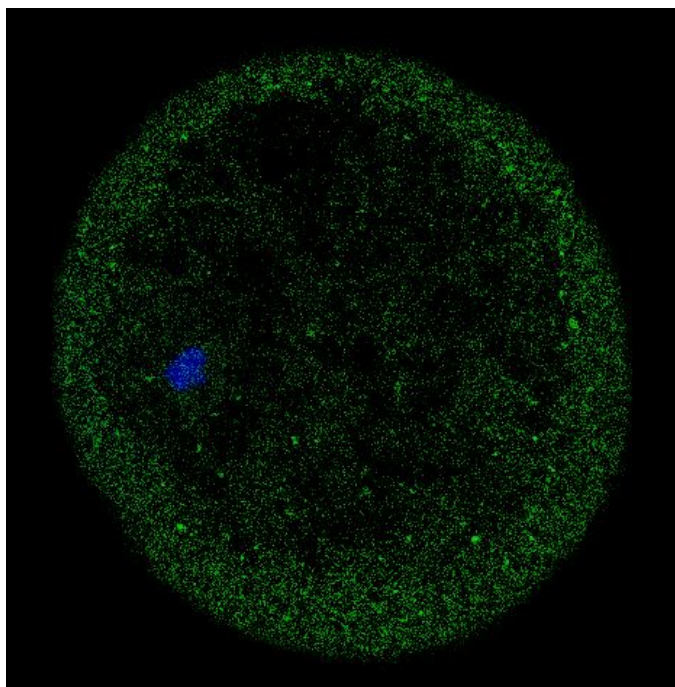
5.1.3. Lokalizace cystathionin γ -lyázy (CSE)

Enzym CSE byl lokalizován v oocytech ve stádiu MII i v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin. Signál enzymu CSE byl oproti signálu enzymu MPST slabší a množství intenzivních bodů v cytoplasmě bylo také výrazně nižší.

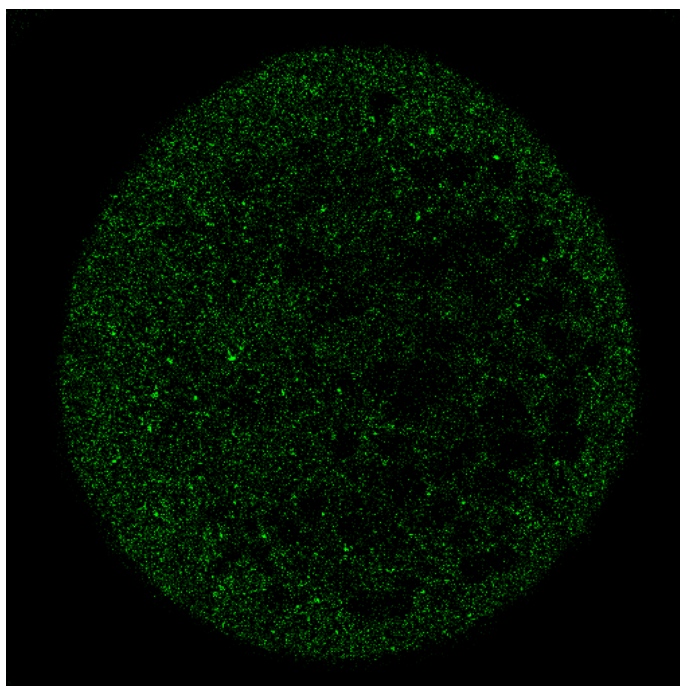
Obrázek č. 6 Lokalizace enzymu CSE v oocytu ve fázi MII. (CSE značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x)



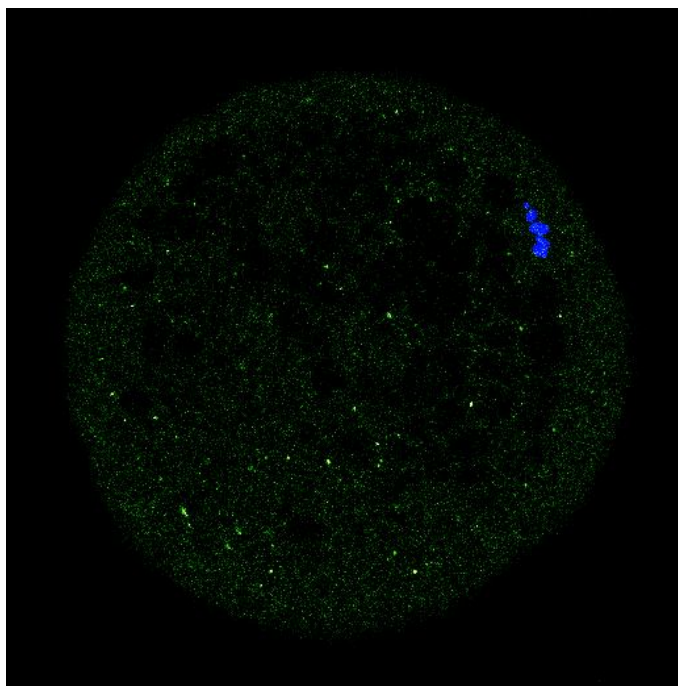
Obrázek č. 7 Lokalizace enzymu CSE v oocyty po 24 hodinách prodloužené kultivace (CSE značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 8 Lokalizace enzymu CSE v oocyty po 48 hodinách prodloužené kultivace (CSE značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 9 Lokalizace enzymu CSE v oocyty po 72 hodinách prodloužené kultivace (CSE značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



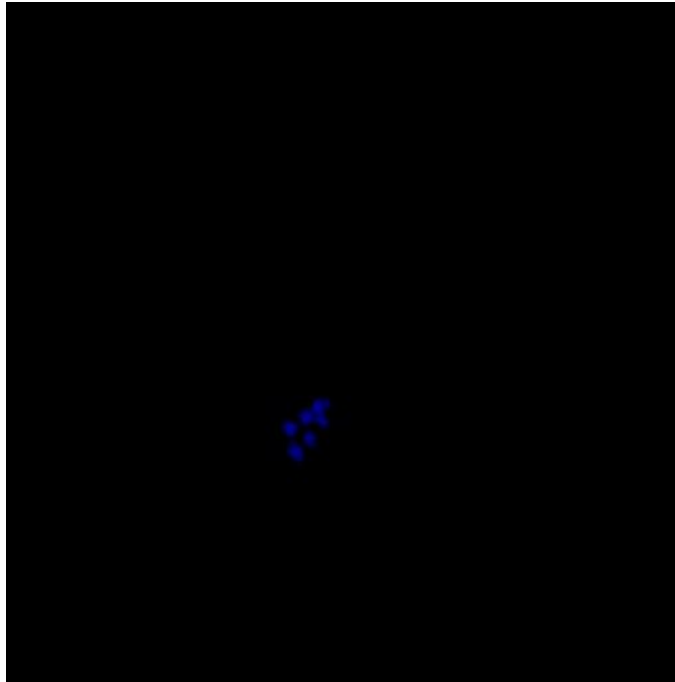
Obrázek č. 10 Negativní kontrola experimentu (CSE značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



5.1.4. Lokalizace cystathionin β -syntázy (CBS)

Enzym CBS nebyl v oocytech ve stádiu MII, ani v oocytech vystavených prodloužené kultivaci 24, 48 a 72 hodin lokalizován.

Obrázek č. 11 Lokalizace enzymu CBS v oocytu po 24 hodinách prodloužené kultivace (CBS značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



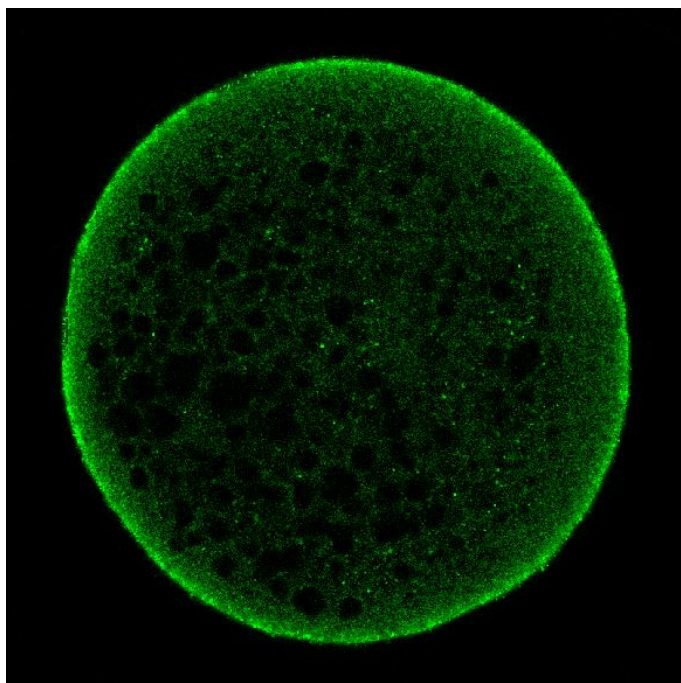
5.2. Vliv donoru sulfanu Na_2S na lokalizaci a intracelulární distribuci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L během stárnutí prasečích oocytů

Cílem experimentu bylo lokalizovat anti-apoptotický faktor Bcl-x_L v oocytech oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin v čistém kultivačním médiu, nebo v kultivačním médiu s dodaným donorem sulfanu Na_2S .

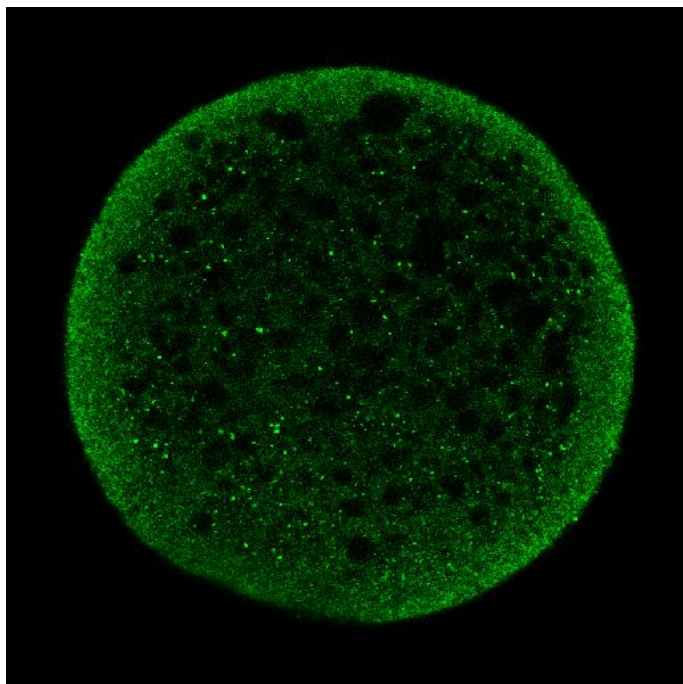
5.2.1. Lokalizace faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace prasečích oocytů

Anti-apoptotický faktor Bcl-x_L byl lokalizován ve všech oblastech oocytů ve fázi MII a oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin. Nejvyšší intenzita faktoru Bcl-x_L byla zaznamenána v korové oblasti oocytů ve fázi MII, následně intenzita Bcl-x_L v této oblasti u stárnoucích oocytů postupně klesala.

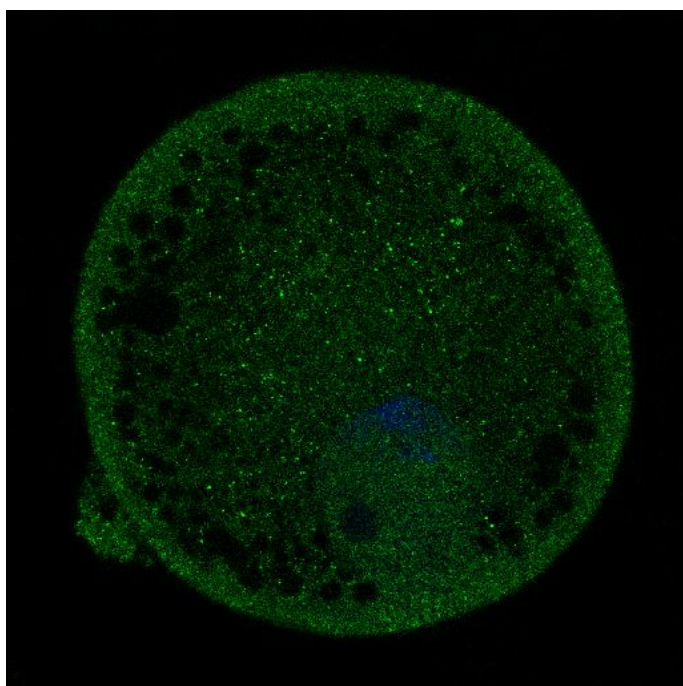
Obrázek č. 12 Lokalizace faktoru Bcl-x_L v oocytu ve stádiu MII. (Bcl-x_L značen zeleně - FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x)



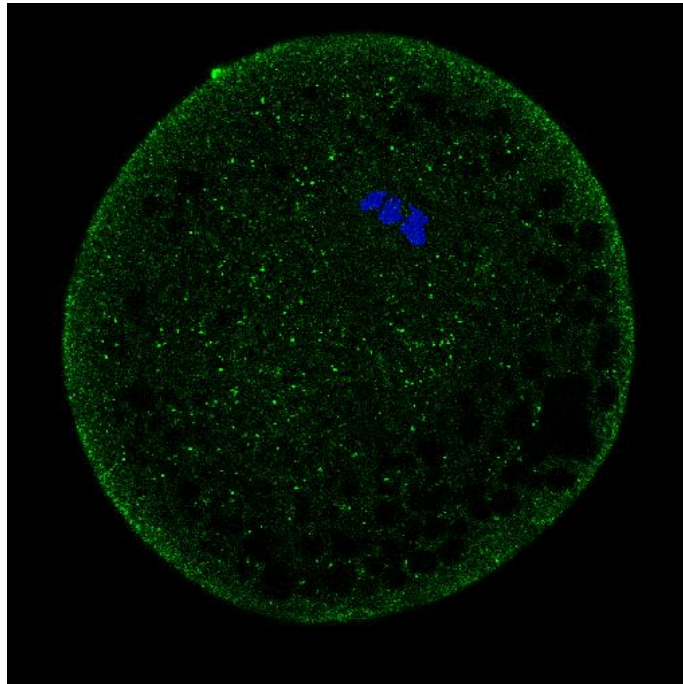
Obrázek č. 13 Lokalizace faktoru $Bcl-x_L$ v oocytu po 24 hodinách prodloužené kultivace ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



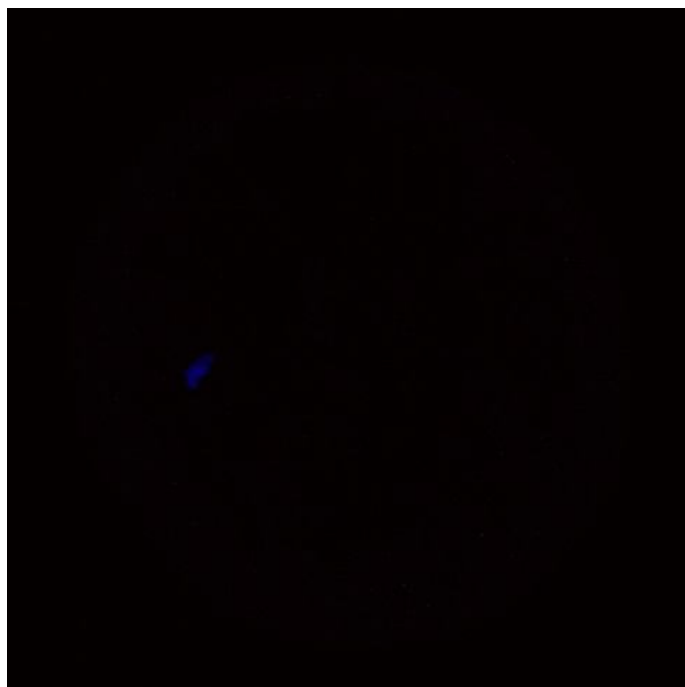
Obrázek č. 14 Lokalizace faktoru $Bcl-x_L$ v oocytu po 48 hodinách prodloužené kultivace ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 15 Lokalizace faktoru $Bcl-x_L$ v oocyty po 72 hodinách prodloužené kultivace. ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x)



Obrázek č. 16 Negativní kontrola experimentu ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



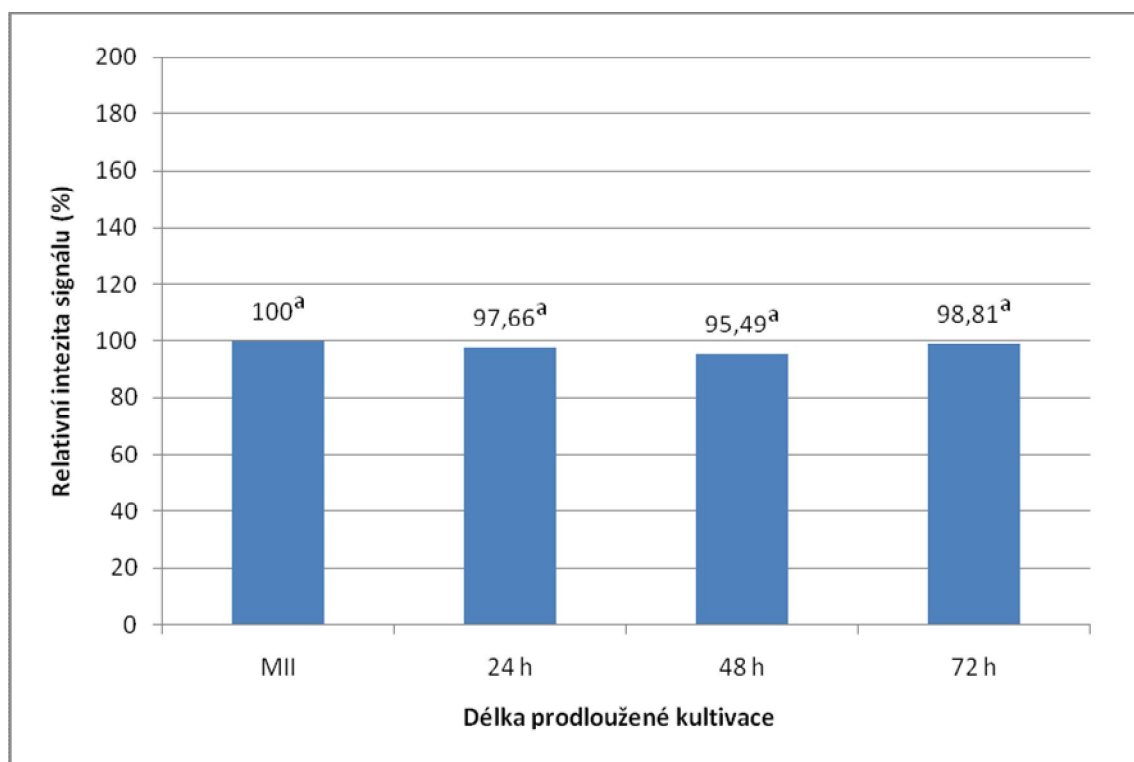
5.2.1.1. Statistické vyhodnocení lokalizace faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace prasečích oocytů

Výskyt faktoru Bcl-x_L v oblasti jádra, cytoplasmy a korové oblasti v oocytech ve fázi MII a v průběhu prodloužené kultivace po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Nejprve jsme se zaměřili na hodnocení statisticky významných rozdílů mezi intenzitami faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace oocytů v oblasti jádra.

Výsledky shrnuje graf č. 1

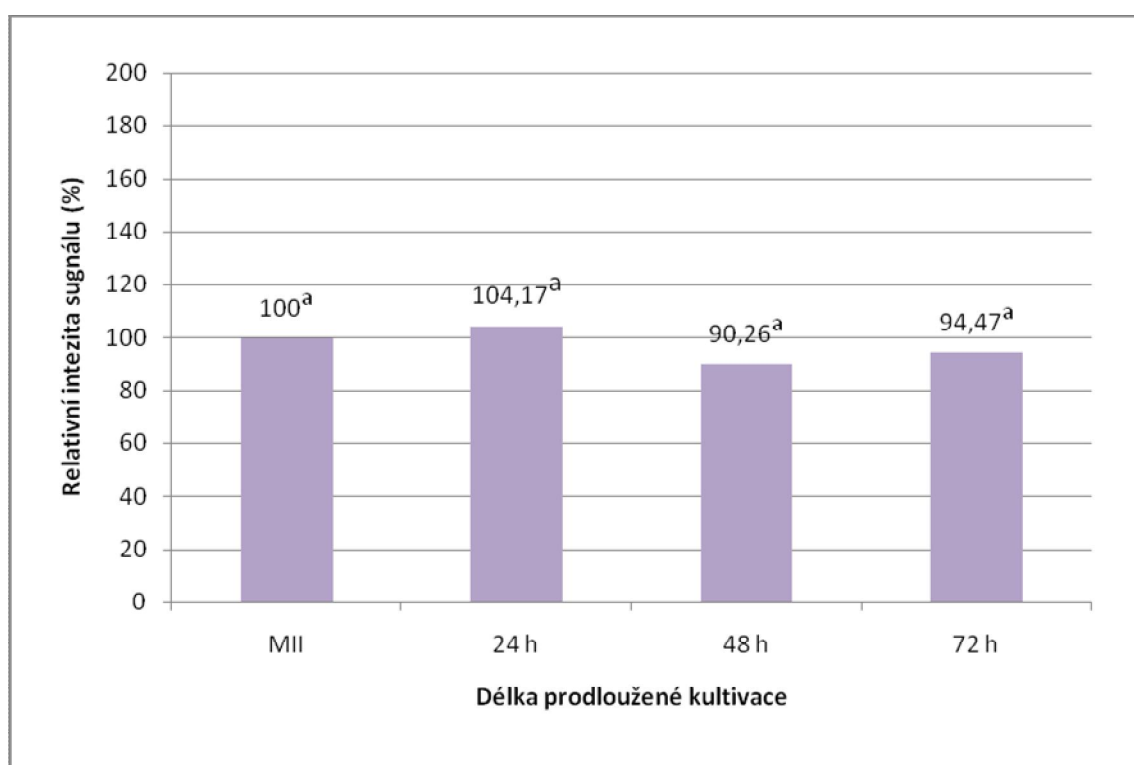
Graf č. 1 Relativní intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v oblasti jader oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin, vztažená k intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L oocytů ve fázi MII. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



V oblasti jader oocytů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu fluorescenčně značeného faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace.

Následně jsme se zaměřili na statistické zhodnocení rozdílů intenzity signálu lokalizovaného faktoru Bcl-x_L v cytoplasmě oocytů ve stádiu MII a oocytů vystavených prodloužené kultivaci 24, 48 a 72 hodin. Výsledky shrnuje graf č. 2.

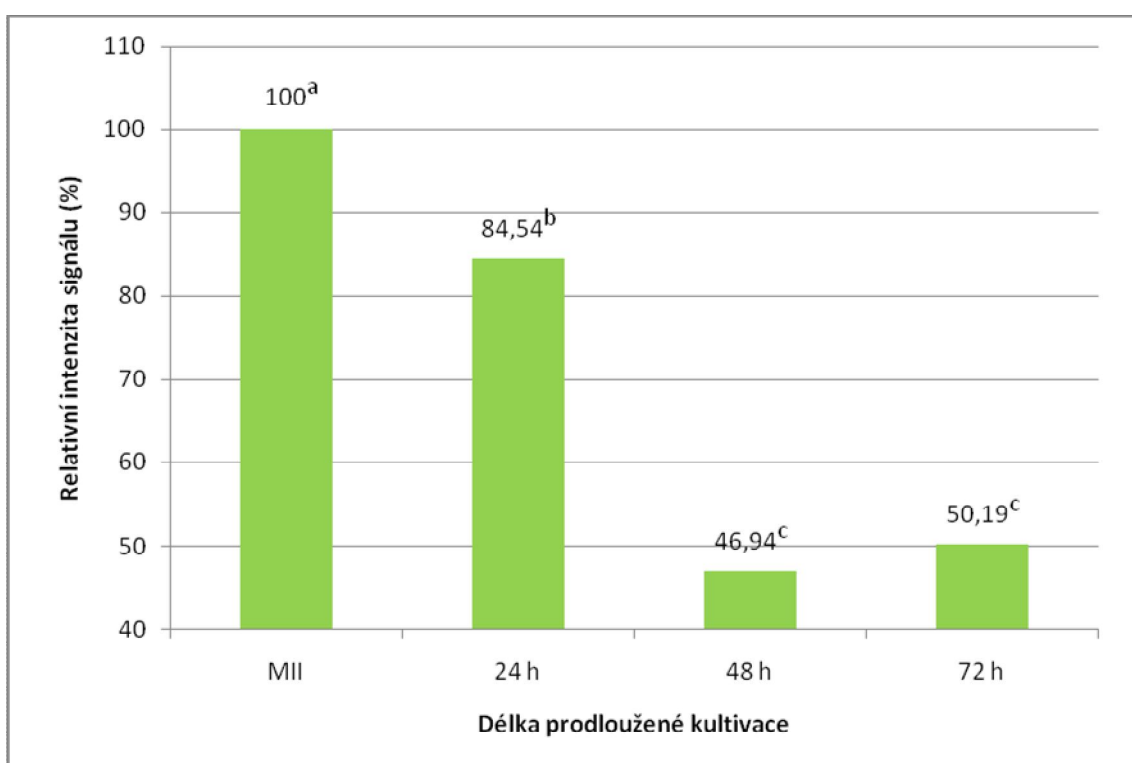
Graf č. 2 Relativní intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v oblasti cytoplasmy oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin, vztažená k intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L oocytů ve fázi MII. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



V oblasti cytoplasmy oocytů ve fázi MII a oocytů vystavených prodloužené kultivaci nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L.

Statistické zhodnocení rozdílů intenzity signálu lokalizovaného faktoru Bcl-x_L jsme provedli i v korové oblasti oocytů ve stádiu MII a oocytů vystavených prodloužené kultivaci 24, 48 a 72 hodin. Výsledky znázorňuje graf č. 3.

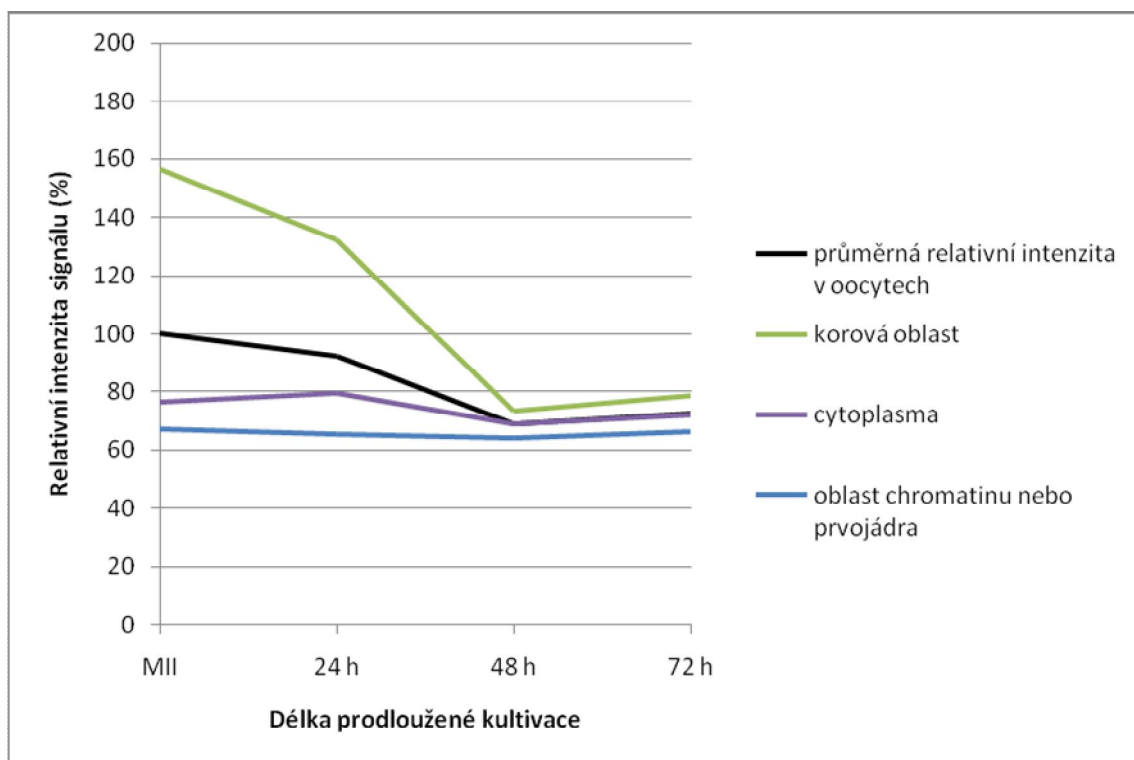
Graf č. 3 Relativní intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin, vztažená k intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L oocytů ve fázi MII. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



V průběhu prodloužené kultivace došlo v korové oblasti ke statisticky významnému poklesu signálu faktoru Bcl-x_L u skupiny vystavené prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin a k dalšímu výraznému poklesu signálu faktoru Bcl-x_L u skupin vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 a 72 hodin. Mezi průměrnými intenzitami signálu faktoru Bcl-x_L po 48 a 72 hodinách prodloužené kultivace již nebyl detekován statisticky významný rozdíl.

Změny v signálu faktoru Bcl-x_L v průběhu prodložené kultivace jednotlivých oblastech oocytů jsme znázornili v souhrnném grafu.

Graf č. 4 Relativní porovnání průběhů změn průměrných intenzit signálu faktoru Bcl-x_L v jednotlivých oblastech oocytů a průměrných celkových intenzit oocytů vztažených k průměrné intenzitě oocytů ve fázi MII.

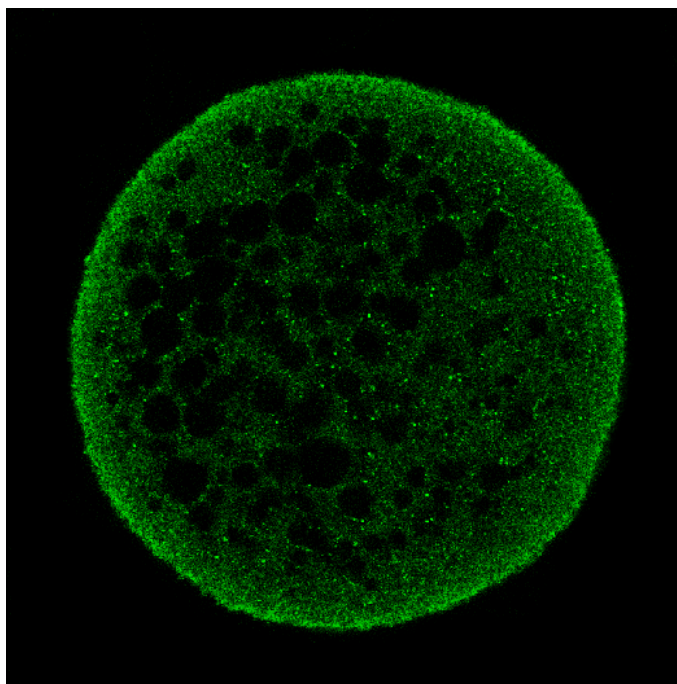


Z grafu je zřejmá vysoká intenzita signálu Bcl-x_L v korové oblasti oocytů ve fázi MII a jeho pokles po prodložené kultivaci po dobu 24 a 48 hodin.

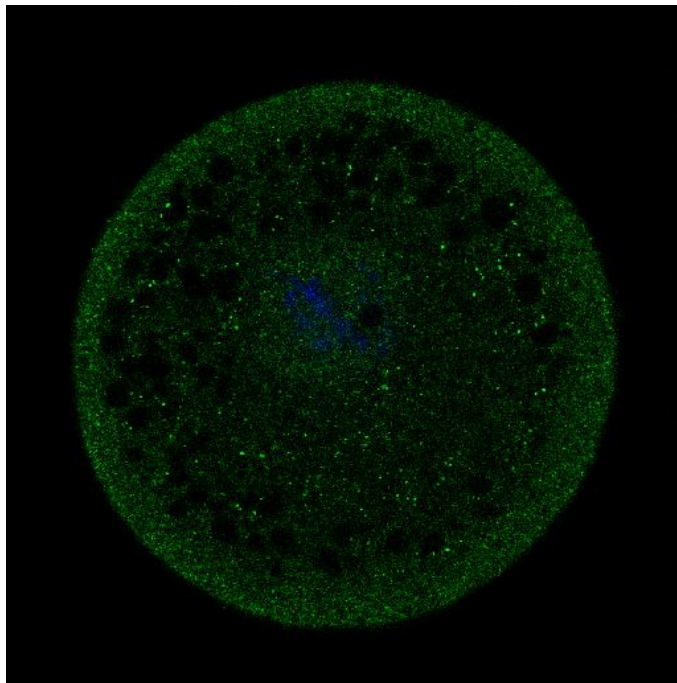
5.2.2. Lokalizace faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace prasečích oocytů v médiu s donorem sulfanu Na₂S

Anti-apoptotický faktor Bcl-x_L byl lokalizován ve všech oblastech oocytů ve fázi MII a oocytů vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na₂S po dobu 24, 48 a 72 hodin. Nejvyšší intenzita faktoru Bcl-x_L byla zaznamenána v korové oblasti oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin. Následně intenzita Bcl-x_L v této oblasti u stárnoucích oocytů postupně klesala.

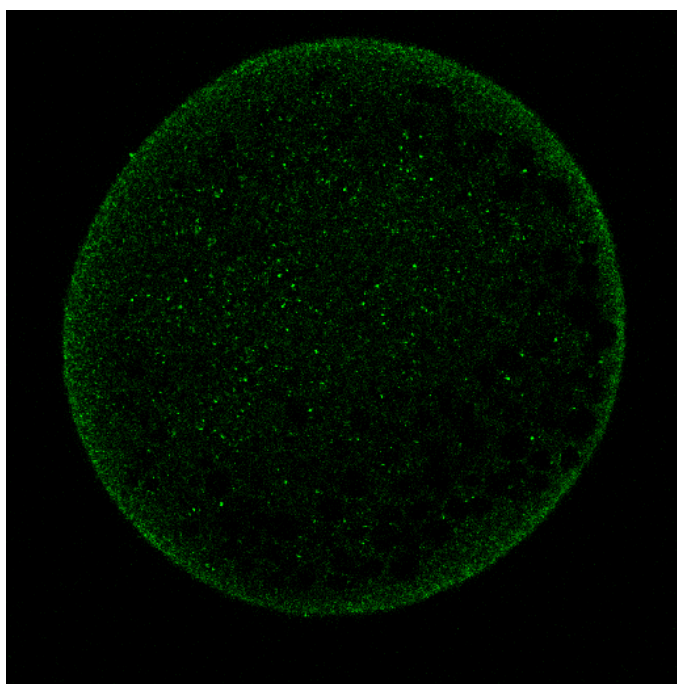
Obrázek č. 17 Lokalizace faktoru Bcl-x_L v oocytu po 24 hodinách prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S (Bcl-x_L značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 18 Lokalizace faktoru $Bcl-x_L$ v oocyty po 48 hodinách prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na_2S ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).



Obrázek č. 19 Lokalizace faktoru $Bcl-x_L$ v oocyty po 72 hodinách prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na_2S ($Bcl-x_L$ značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – Hoechst 33258, zvětšení 400 x).

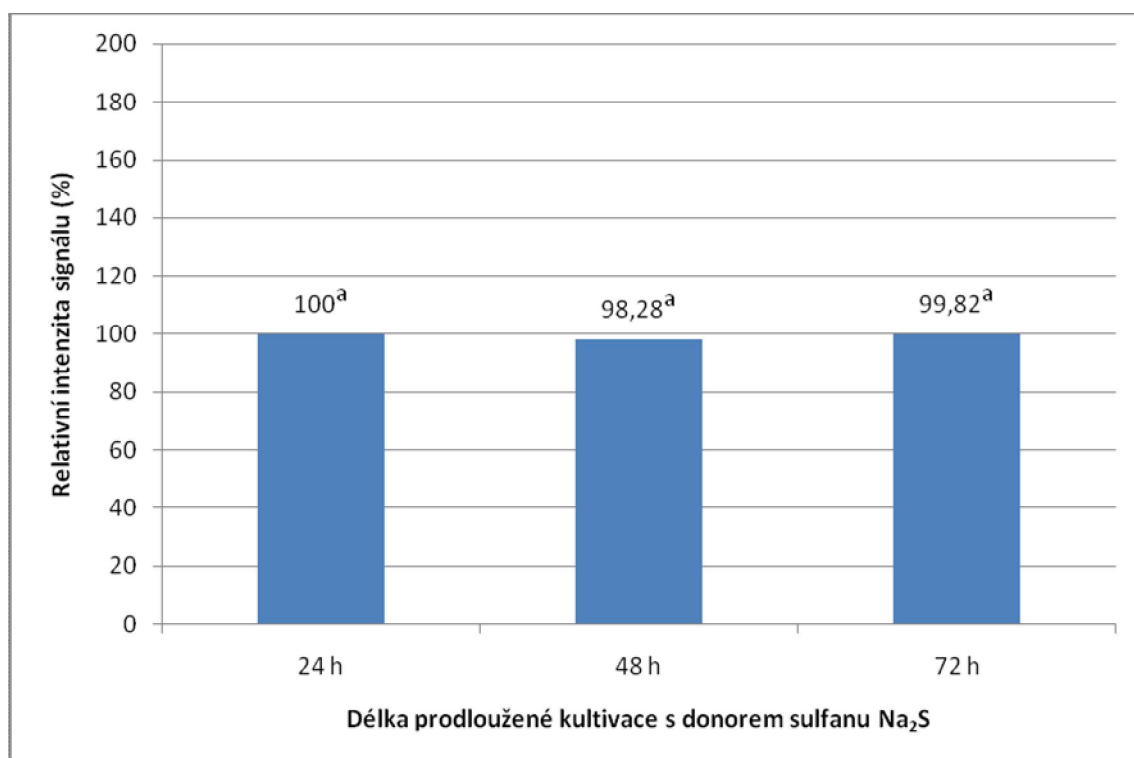


5.2.2.1. Statistické vyhodnocení lokalizace faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace prasečích oocytů v médiu s donorem sulfanu Na₂S

Hodnoty intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v oocytech vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu po dobu 24, 48 a 72 hodin jsme statisticky vyhodnotili.

Nejprve jsme se zaměřili na statistické vyhodnocení signálu faktoru Bcl-x_L v oblasti jádra oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin.

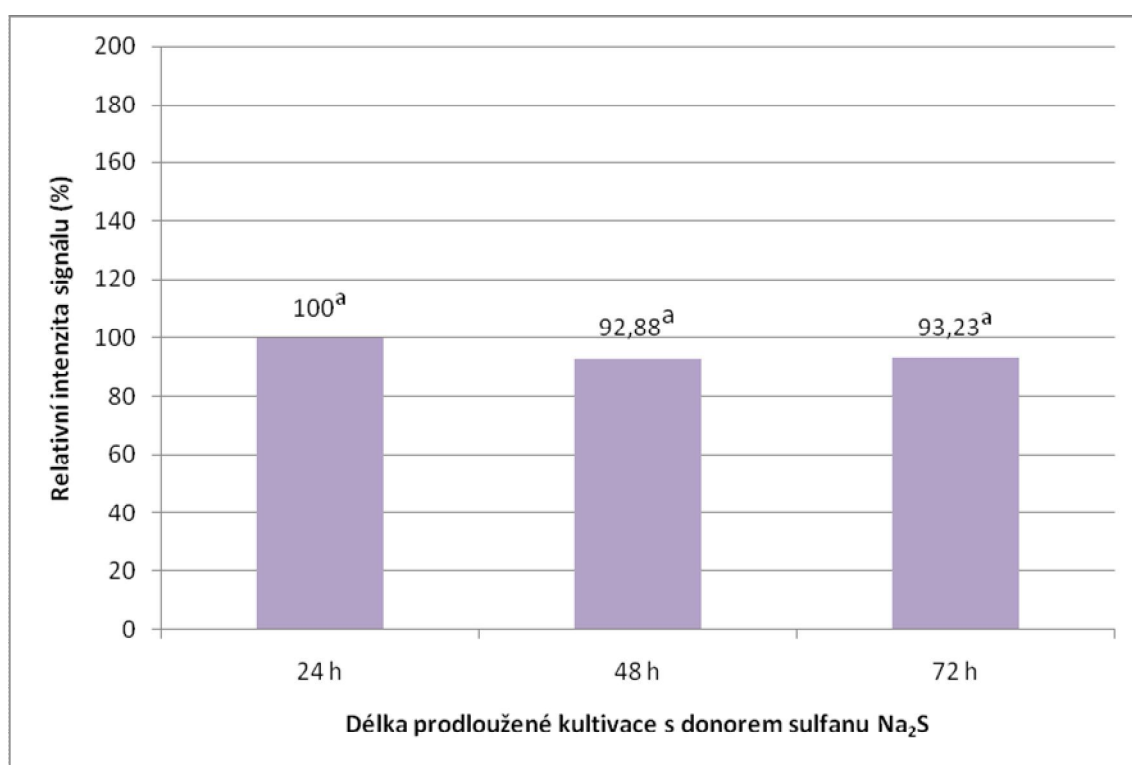
Graf č. 5 Relativní intenzita signálu v průběhu prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S v oblasti jádra a oocytů. Relativní intenzita je průměrná intenzita v oblasti chromatinu nebo prvojádra v dané fázi, vztažená k průměrné intenzitě v oblasti jádra po 24 hodinách prodloužené kultivace. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



Statistickým hodnocením nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi intenzitami Bcl-x_L v oblasti jádra v průběhu prodloužené kultivace oocytů s donorem sulfanu Na₂S.

Dále jsme statisticky vyhodnotili hodnoty intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v oblasti cytoplasmy oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin.

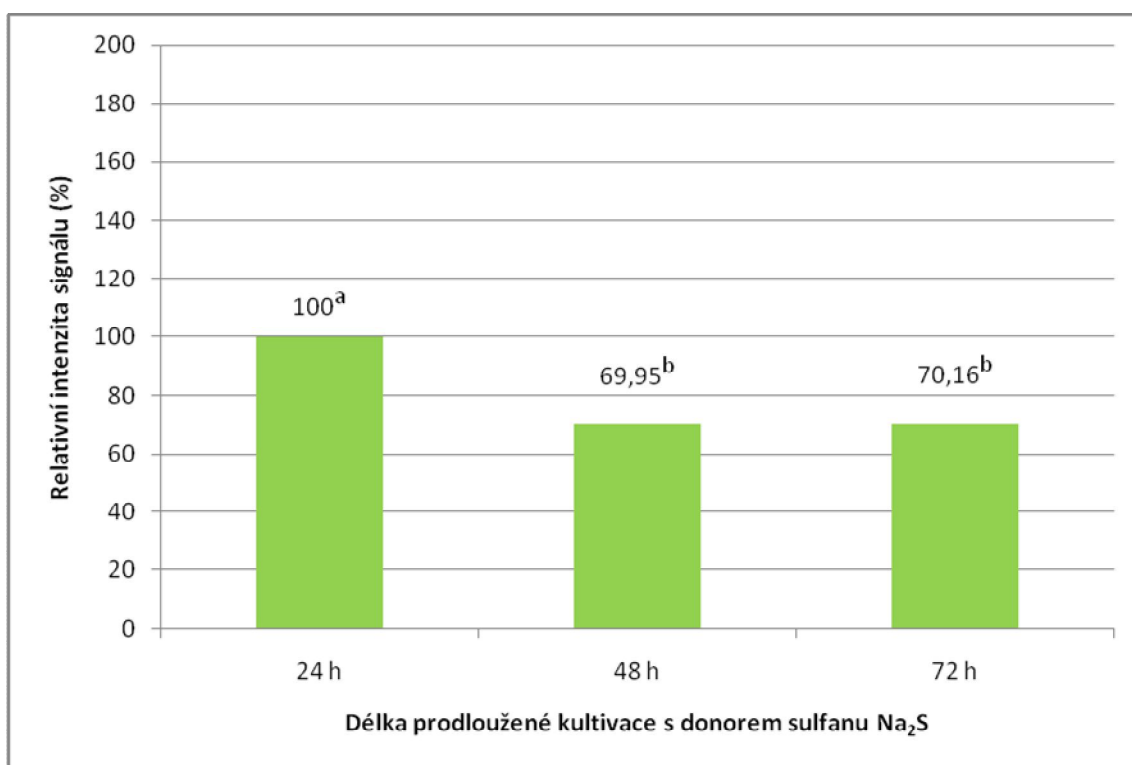
Graf č. 6 Relativní intenzita signálu v oblasti cytoplasmy oocytů v průběhu prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S. Relativní intenzita je průměrná intenzita v cytoplasmě v dané délce prodloužené kultivace, vztahená k průměrné intenzitě po 24 hodinách kultivace. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



Skupiny oocytů podrobené prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S po dobu 24, 48 a 72 hodin se v intenzitě signálu Bcl-x_L v cytoplasmě navzájem statisticky významně nelišily.

Nakonec jsme se zaměřili na statistické vyhodnocení intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 a 72 hodin.

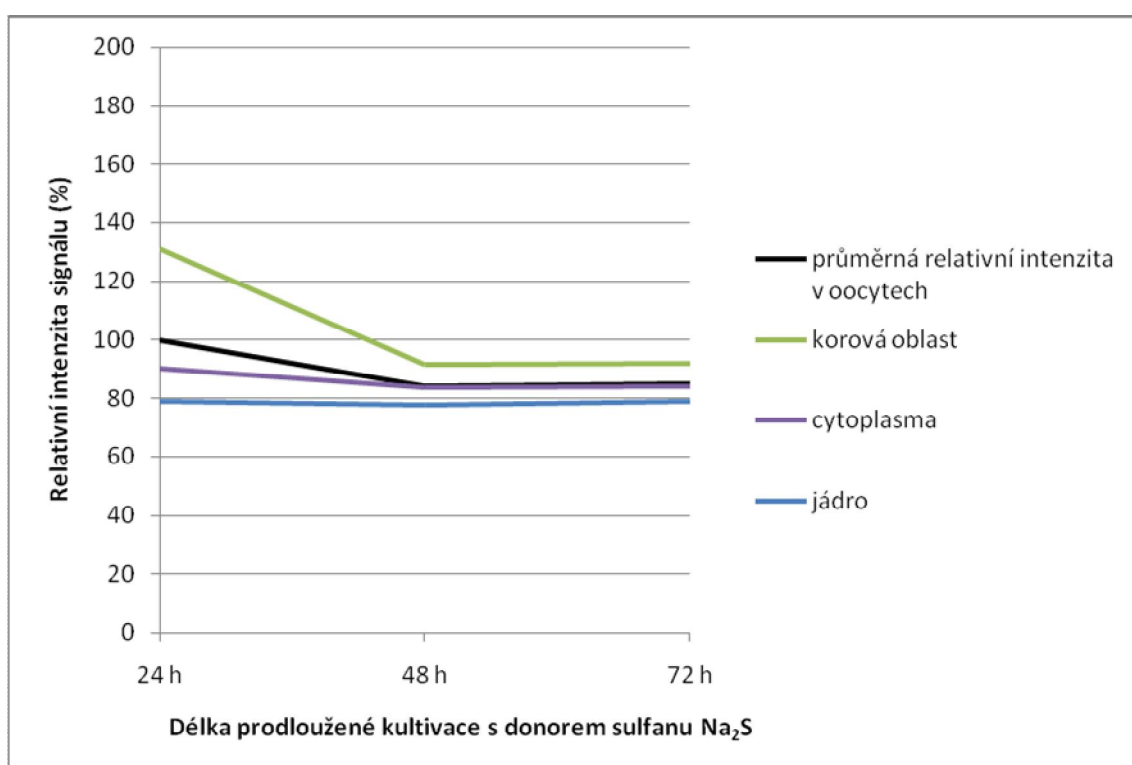
Graf č. 7 Relativní intenzita signálu v korové oblasti oocytů v průběhu prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S. Relativní intenzita je průměrná intenzita v dané délce prodloužené kultivace, vztahená k průměrné intenzitě po 24 hodinách prodloužené kultivace. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



Ve skupinách oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 a 72 hodin s donorem sulfanu Na₂S došlo na hladině významnosti $p < 0,05$ ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu faktoru Bcl-x_L oproti intenzitě tohoto signálu u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin.

Hodnoty intenzity signálu Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S jsme znázornili v souhrnném grafu.

Graf č. 8 Relativní porovnání průběhů změn průměrných intenzit Bcl-x_L v jednotlivých oblastech oocytů a průměrných celkových intenzit oocytů kultivovaných s donorem sulfanu Na₂S, vztahených k průměrné intenzitě oocytů po 24 hodinách prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S.



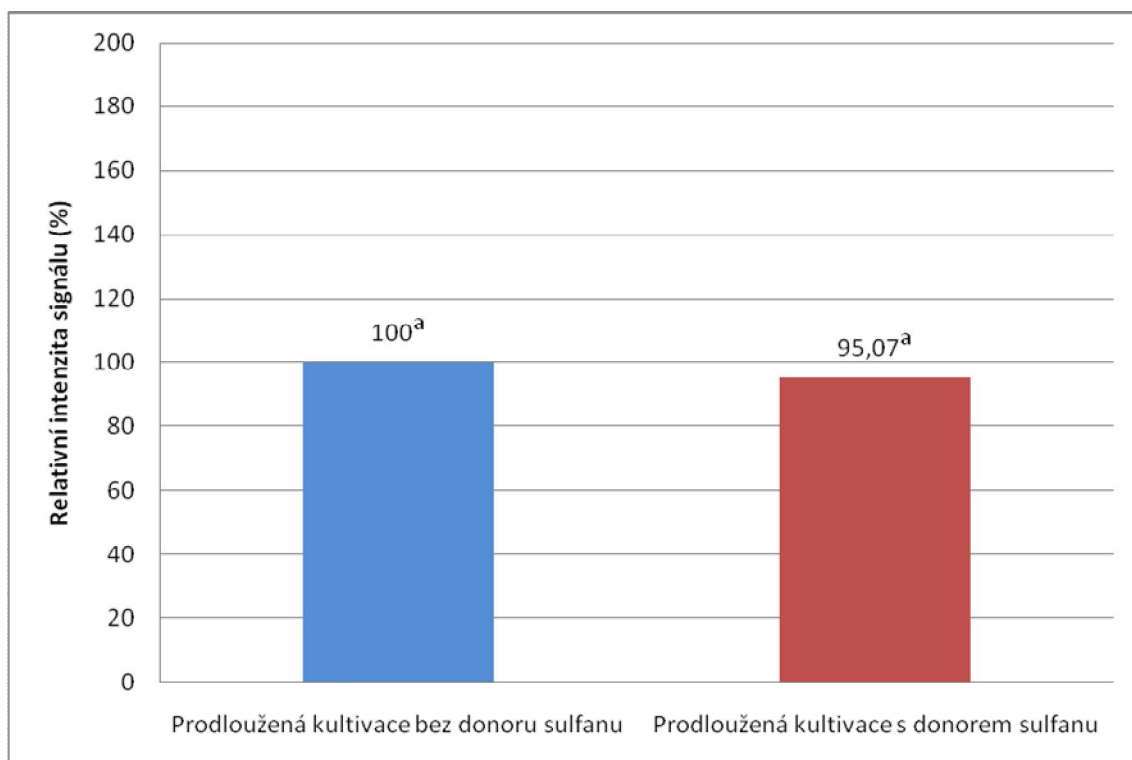
Z grafu je patrná zvýšená intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů po prodloužené 24 hodinové kultivaci a následné snížení intenzity faktoru Bcl-x_L v této oblasti k průměrné hodnotě intenzity faktoru Bcl-x_L oocytů po prodloužené kultivaci 48 a 72 hodin.

5.2.3. Vliv donoru sulfanu Na₂S na intracelulární lokalizaci a redistribuci faktoru Bcl-x_L při stárnutí prasečích oocytů *in vitro*

Výsledky předchozích experimentů, popisujících intracelulární lokalizaci a redistribuci faktoru Bcl-x_L v jednotlivých oblastech oocytů kultivovaných v čistém kultivačním médiu a v médiu s dodaným donorem sulfanu Na₂S, byly statisticky vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem.

Nejprve jsme se zaměřili na vyhodnocení vlivu donoru sulfanu Na₂S na průměrné hodnoty intenzit faktoru Bcl-x_L u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin.

Graf č. 9 Relativní porovnání průměrných intenzit signálů faktoru Bcl-x_L v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin s donorem sulfanu Na₂S, vztažených k průměrným intenzitám signálů oocytů vystavených prodloužené kultivaci v čistém kultivačním médiu. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S na hladině významnosti $p < 0,05$.



Statistickým vyhodnocením nebyl nalezen rozdíl mezi průměrnými intenzitami signálu faktoru Bcl-x_L oocytů vystavených 24 hodinové prodloužené kultivaci v čistém médiu a intenzitou signálu tohoto faktoru v oocytech vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na₂S.

Následně byly otestovány rozdíly mezi jednotlivými oblastmi oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin v čistém kultivačním médiu a oocytů vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S. Výsledky uvádí tabulka č. 1

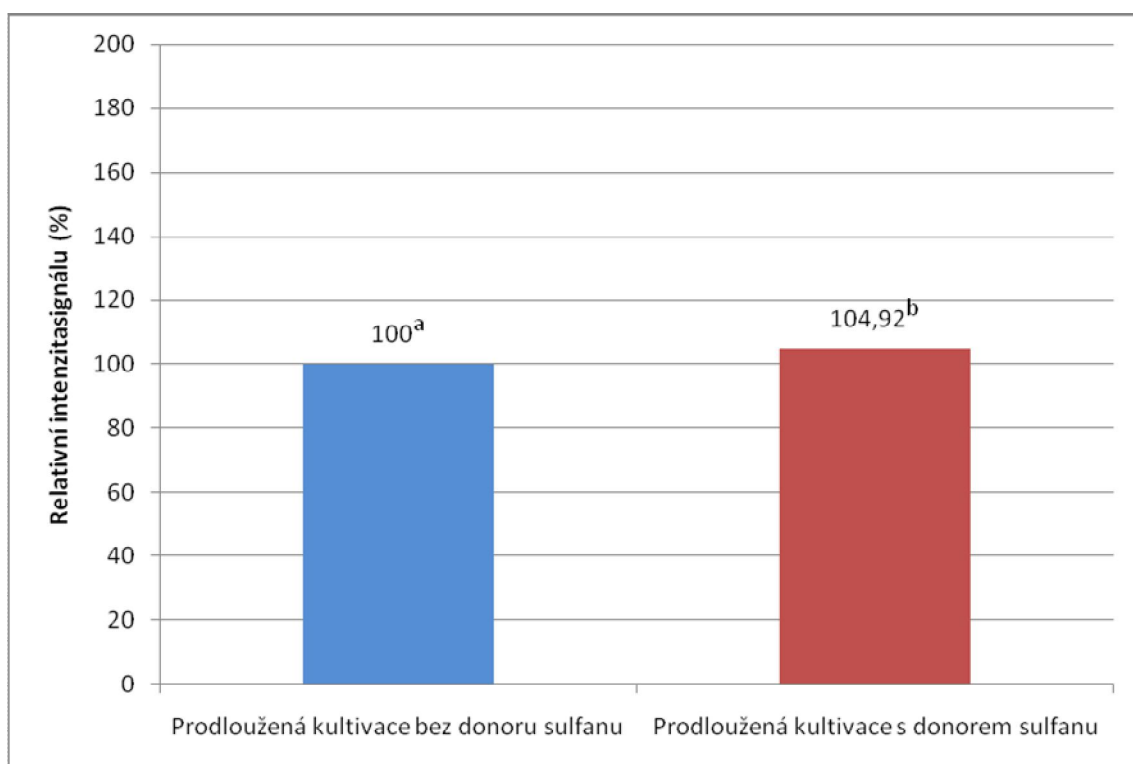
Tabulka č. 1 Statistické porovnání vlivu donoru sulfanu Na₂S v jednotlivých oblastech oocytu mezi skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin v čistém médiu a skupinou oocytů prodlouženě kultivovaných s donorem sulfanu Na₂S. Rozdílnými ^{abc} superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly v rámci jednotlivých oblastí oocytů mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S na hladině významnosti $p < 0,05$.

	Korová oblast	Cytoplasma	Jádro
Prodloužená kultivace bez donoru sulfanu	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Prodloužená kultivace s donorem sulfanu	84,77 ^b	97,27 ^a	103,17 ^a

Statistickým šetřením byl prokázán významný pokles intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin s donorem sulfanu Na₂S oproti intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L v oocytech po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin v čistém médiu. V ostatních oblastech oocytů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Dále jsme vyhodnotili vliv donoru sulfanu Na_2S na průměrné hodnoty intenzit faktoru Bcl-x_L u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin.

Graf č. 10 Relativní porovnání průměrných intenzit signálu faktoru Bcl-x v oocyttech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu a průměrných intenzit signálu faktoru Bcl-x_L oocytů kultivovaných s donorem sulfanu Na_2S . Rozdílnými ^{abc} superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na_2S na hladině významnosti $p < 0,05$.



Statistickým vyhodnocením jsme našli významný nárůst v intenzitě signálu faktoru Bcl-x_L ve skupině oocytů vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na_2S po dobu 48 hodin, oproti skupině oocytů vystavených prodloužené kultivaci v čistém kultivačním médiu.

Hodnoty signálu v jednotlivých oblastech oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu a v médiu s donorem sulfanu Na₂S jsme následně vyhodnotili v tabulce 2.

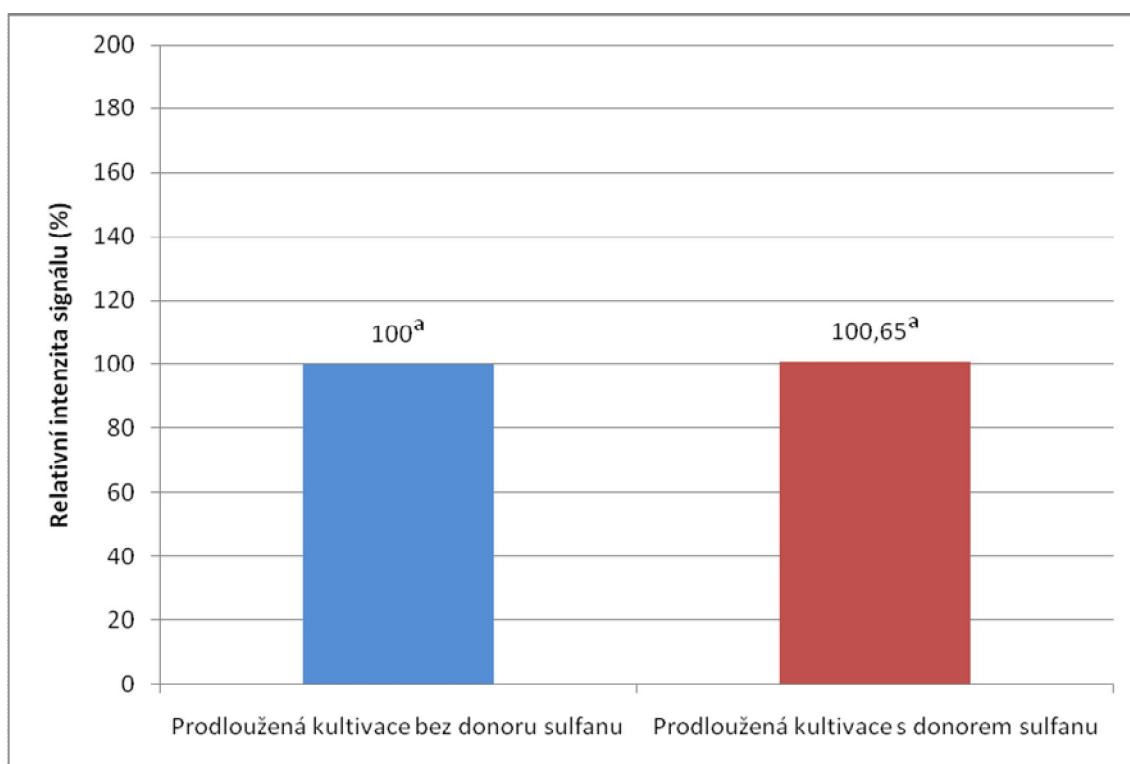
Tabulka č. 2 Statistické porovnání vlivu donoru sulfanu Na₂S v jednotlivých oblastech oocytu mezi skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin v čistém médiu a skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin s donorem sulfanu Na₂S. Rozdílnými ^{abc} superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly v rámci jednotlivých oblastí oocytů mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S na hladině významnosti $p < 0,05$.

	korová oblast	cytoplasma	jádro
Prodloužená kultivace bez donoru sulfanu	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Prodloužená kultivace s donorem sulfanu	106,79 ^b	104,27 ^b	103,79 ^a

Mezi skupinami oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin s donorem sulfanu Na₂S a skupinami vystaveným prodloužené kultivaci v čistém médiu byl nalezen statisticky významný nárůst intenzity signálu faktoru Bcl-x_L v korové oblasti a cytoplasmě oocytů vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S oproti skupině oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin v čistém médiu.

Na závěr jsme testovali skupiny oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém kultivačním médiu a v médiu s donorem sulfanu Na_2S .

Graf č. 11 Relativní porovnání průměrných intenzit signálů oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém kultivačním médiu a průměrných intenzit signálů oocytů kultivovaných s donorem sulfanu Na_2S . Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na_2S na hladině významnosti $p < 0,05$.



Mezi průměrnými intenzitami faktoru Bcl-x_L v oocytech vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém kultivačním médiu a v médiu s donorem sulfanu Na_2S nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

Hodnoty intenzit faktoru Bcl-x_L v jednotlivých oblastech oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém médiu a s donorem sulfanu jsme následně statisticky vyhodnotili a shrnuli v tabulce č. 3.

Tabulka č.3 Statistické porovnání vlivu sulfanu v jednotlivých oblastech oocytu mezi skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém médiu a skupinou oocytů prodlouženě kultivovaných s donorem sulfanu Na₂S. Rozdílnými ^{abc}superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami oocytů vystavenými dané době prodloužené kultivace bez a za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S na hladině významnosti $p < 0,05$

	korová oblast	cytoplasma	jádro
Prodloužená kultivace bez donoru sulfanu	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Prodloužená kultivace s donorem sulfanu	100,19 ^a	99,99 ^a	101,79 ^a

Mezi intenzitami faktoru Bcl-x_L v oblastech oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v čistém kultivačním médiu a v médiu s donorem sulfanu Na₂S nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

6. Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že je sulfan zapojen do regulace exprese a intracelulární lokalizace anti-apoptického faktoru Bcl-x_L během stárnutí prasečích oocytů. V průběhu stárnutí dochází u neoplozených oocytů k biochemickým a morfologickým změnám, které mohou vést ke spontánní partenogentické aktivaci, lýze nebo fragmentaci. Fragmentace je projevem kontrolované buněčné smrti, apoptózy. Jedná se složitě regulovaný proces, jehož kontroly se účastní mnoho různých skupin molekul. Jednou z nich je skupina proteinů rodiny Bcl-2, jejíž členové mohou vykazovat pro i anti-apoptickou aktivitu.

Sulfan patří mezi gasotransmitery, molekuly schopné volně procházet buněčnými membránami a ovlivňovat vnitrobuněčné signální dráhy. Přesné zapojení sulfanu do regulace apoptózy není zatím objasněno, jeho vliv na apoptotický zánik buněk však byl prokázán například v experimentech Cao *et al.* (2005), Rose *et al.* (2005), Yang *et al.* (2004) a Hu *et al.* (2009).

Prvním cílem této práce byla lokalizace enzymů katalyzujících syntézu sulfanu 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (MPST), cystathionin β -syntázy (CBS) a cystathionin γ -lyázy (CSE) ve stárnoucích oocytech.

V našich experimentech jsme lokalizovali enzym MPST ve všech skupinách oocytů vystavených prodloužené kultivaci. Tento enzym byl doposud lokalizován v endotelu cév a v mozku (Shibuya *et al.*, 2009a,b). V našich experimentech byl signál enzymu MPST detekován difúzně v cytoplasmě oocytů, s množstvím roztroušených intenzivních ložisek. Dle Kimura (2011) je MPST lokalizován převážně v mitochondriích a částečně v cytoplasmě.

Dalším úspěšně lokalizovaným enzymem byla cystathionin γ -lyáza (CSE). Jeho lokalizace jinými autory byla zatím prokázána pouze v hladké svalovině cév (Zhao *et al.*, 2001; Hosoki *et al.*, 1997), hladké svalovině gastrointestinálního traktu a penisu (Fiorucci *et al.*, 2005; d'Emmanuele di Villa *et al.*, 2009) a v myometriu (Patel *et al.*, 2009; You *et al.*, 2011).

Enzym cystathionin β -syntáza (CBS) nebyl v našich experimentech ve stárnoucích oocytech lokalizován. Liang *et al.* (2006), který zkoumal lokalizaci tohoto enzymu v myších ováriích, také CBS v oocytech nelokalizoval. Popisuje však silný výskyt cystathionin β -syntázy ve folikulárních buňkách v průběhu folikulogeneze. V dalším výzkumu (Liang *et al.*, 2007) dále potvrdil význam enzymu CBS při zrání oocytů, přestože v nich nebyl lokalizován. Pravděpodobně tento enzym ovlivňuje zrání oocytů pouze nepřímo, prostřednictvím folikulárních buněk.

Ve druhém experimentu jsme se zaměřili na intracelulární distribuci a lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace v čistém kultivačním médiu, nebo v médiu s donorem sulfanu Na₂S. Tyto dvě skupiny jsme následně porovnali a stanovili tak vliv sulfanu na intracelulární distribuci a lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace prasečích oocytů *in vitro*.

V průběhu prodloužené kultivace jsme pozorovali změny na oocytech typické pro stárnutí, jako je spontánní partenogenetická aktivace, lýza a fragmentace, která je projevem apoptózy. Výskyt těchto změn se zvyšoval s délkou prodloužené kultivace. Petrová *et al.* (2004) ve svém experimentu oocyty vystavila prodloužené kultivaci po dobu 1 až 5 dní, přičemž se výskyt partenogeneticky aktivovaných, lytických a fragmentovaných oocytů též postupně zvyšoval.

V našich experimentech jsme anti-apoptotický faktor Bcl-x_L v průběhu prodloužené kultivace zaznamenali v oblasti jádra, cytoplasmy i v korové oblasti oocytů. Nejvyšší intenzita signálu faktoru Bcl-x_L byla u skupin vystavených prodloužené kultivaci v čistém médiu i u skupin kultivovaných donorem sulfanu Na₂S v korové oblasti v počátečních fázích prodloužené kultivace oocytů, přičemž se intenzita signálu faktoru Bcl-x_L následně s délkou prodloužené kultivace postupně snižovala.

Anti-apoptotický faktor Bcl-x_L v byl zatím u prasečích oocytů popsán pouze u partenogeneticky aktivovaných oocytů a to v experimentech Gupta *et al.* (2007), Cui *et al.* (2003) a Cui *et al.* (2005). Dále byl faktor Bcl-x_L popsán v prenatalních oocytech myši (de Felici *et al.*, 1999). V těchto experimentech však nebyla sledována intracelulární lokalizace tohoto anti-apoptotického faktoru. Hu *et al.* (2001), zaznamenal faktor Bcl-x_L v mitochondriích malých preantrálních folikulů myši. V oocytech *Xenopus laevis* je popisována lokalizace Bcl-x_L v cytoplasmě, v okolí mitochondrií (Kloc *et al.*, 2007).

V průběhu stárnutí prasečích oocytů bylo v experimentech Ma *et al.*, (2005) pozorováno postupné snižování exprese faktoru Bcl-2, Bcl-x_L příbuzného člena rodiny anti-apoptotických faktorů.

Při statistickém porovnání intenzity signálu faktoru Bcl-x_L ve skupinách oocytů vystavených prodloužené kultivaci v čistém médiu, nebo v médiu s donorem sulfanu Na₂S, byl prokázán vliv sulfanu na intenzitu signálu faktoru Bcl-x_L u skupiny oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin a to v korové oblasti, kde se intenzita signálu vlivem donoru sulfanu mírně snižovala. Naopak po 48 hodinách prodloužené kultivace byla intenzita signálu v korové oblasti a cytoplasmě u oocytů vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu oproti oocytům kultivovaným v čistém médiu prokazatelně vyšší. V našich

experimentech jsme tedy prokázali vliv sulfanu na lokalizaci a distribuci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L.

Vliv sulfanu na apoptózu byl prokázán v různých experimentech. Cao *et al.* (2005) se zabývali vlivem sulfanu na apoptózu acinárních buněk pankreatu. V tomto experimentu docházelo působením sulfanu k indukci apoptózy, který zde expresi faktoru Bcl-x_L neovlivňoval, ale naopak aktivoval expresi pro-apoptotického faktoru Bax.

Hu *et al.* (2009) zkoumali vliv sulfanu na poškození lidských buněk neuroblastomu toxinem rotenonem. Prokázali, že sulfan v závislosti na koncentraci svého donoru Na₂S, snižoval rotenonem způsobené poškození buněk a apoptózu. Konkrétně blokoval fosforylaci MAP kinázy JNK kinázou a inhiboval změny v hladinách Bcl-2 a Bax, snížení membránového potenciálu ψ v mitochondriích, uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz 9 a 3 (Hu *et al.*, 2009).

Sulfan dále chránil buňky rakoviny tlustého střeva před apoptózou indukovanou b-fenylethyl isothiokyanátem (Rose *et al.*, 2005) a také ve fyziologických koncentracích dále indukoval apoptózu lidských buněk hladké svaloviny aorty. (Yang *et al.*, 2004).

Zdá se, že vliv sulfanu na apoptózu není jednoznačný a je velice tkáňově specifický.

7. Závěr

Degenerativní změny oocytů v průběhu jejich prodloužené kultivace mohou vyústit ve spontánní partenogenetickou aktivaci, lýzu, nebo fragmentaci, která je projevem apoptózy. Apoptóza je regulována složitými signálními kaskádami, do nichž je zapojeno mnoho skupin různých molekul. Mezi ně patří i rodina Bcl-2 proteinů, jejíž členové vykazují pro- i anti-apoptotickou aktivitu. Jedním z anti-apoptotických faktorů je protein Bcl-x_L, jehož lokalizaci ve stárnoucích oocytech jsme se zabývali. Sulfan se jako signální molekula podílí na ovlivnění mnoha různých procesů v buňkách, včetně regulace apoptózy.

V první části našich experimentů jsme ve stárnoucích oocytech úspěšně lokalizovali enzymy 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázu a cystathionin γ -lyázu, katalyzujících katalyzujících syntézu sulfanu v buňkách.

Následně jsme se zaměřili na lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L ve stárnoucích oocytech a ve stárnoucích oocytech s donorem sulfanu Na₂S. Faktor Bcl-x_L byl úspěšně lokalizován u obou těchto skupin oocytů. Intenzita signálu faktoru Bcl, x_L byla nejvyšší v korové oblasti oocytů na počátku stárnutí. S delší dobou prodloužené kultivace intenzita signálu faktoru Bcl-x_L v této oblasti postupně klesala.

Při následném porovnání skupin oocytů vystavených prodloužené kultivaci v čistém médiu se skupinami oocytů vystavených prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S, jsme prokázali statisticky významné rozdíly v korové oblasti na počátku prodloužené kultivace a následně i v korové oblasti a cytoplasmě.

V našich experimentech byla prokázána hypotéza o aktivním zapojení sulfanu v regulaci intracelulární lokalizace a distribuce anti-apoptotického faktoru Bcl-x_L v průběhu stárnutí prasečích oocytů. Pro objasnění přesného mechanismu jeho působení je však potřeba realizovat další vhodné experimenty.

8. Seznam literatury

- Abbot A.L., Xu Z., Kopf G.S., Ducibella T, Schultz R.M. (1998): *In vitro* culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in *in vivo* unfertilized mouse eggs. *Biology of reproduction* 59, 1515 – 1521
- Abe K., Kimura H. (1996): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of neuroscience* 16, 1066 – 1071
- Adams J. M., Cory S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322 – 1326
- Agrawal N., Banerjee R. (2008): Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine b-synthase sumoylation. *PLoS ONE* 3, e4032
- Albertini D. F., Anderson E. (1974): The appearance and structure of the intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovation follicle with special reference to gap junctions. *Journal of Cell biology* 63, 243 - 250
- Albertini D. F., Wickramasinghe D., Ebert K. M. (1991): Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental biology* 143, 162 – 172
- Alnemri, E.S. (1997): Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *Journal of Cellular Biochemistry* 64, 33 – 42
- Badenas J., Santalo J., Calafell J. M., Estop A. M., Egozcue J. (1989): Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Research* 24, 205 - 218
- Banerjee R., Zou C.-G. (2005): Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-b-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 144 – 156
- Batista L. F. Z., Kaina B., Meneghini R., Menck C. F. M. (2009): How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research: Reviews in Mutation Research* 681, 197 - 208
- Bína, J. (1968): *Malá encyklopedie chemie*. Obzor, Bratislava, český překlad: odpovědný redaktor Šrámek J., SNTL, Praha, 1976
- Birnbaum M. J., Clem R.J., Miller L.K. (1994): An apoptosisinhibiting gene from a

- nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology* 68, 2521 – 2528
- Black J. L., Erickson B. H. (1968): Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1), 45 – 55
 - Blackstone E., Morrison M., Roth M. B. (2005): H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308 (5721), p. 318
 - Boldin M. P., Goncharov T. M., Goltsev Y. V., Wallach D. (1996): Involvement of mach, a novel mort1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803 – 815
 - Bornslaeger E. A., Mattei P. M., Schultz R. M. (1986): Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Developmental Biology* 114, 453 – 462
 - Brandeis M, Rosewell I., Carrington M., Crompton T., Jacobs M. A., Kirk J., Gannon J., Hunt T. (1998): Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (8), 4344 - 4349
 - Braunstein A. E., Goryachenkova E. V., Tolosa E. A., Willhardt I. H., Yefremova L. L. (1971): Specificity and some other properties of liver serine sulphhydrylase: evidence for its identity with cystathionine b-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 242, 247 – 260
 - Cao Y., Adhikari S., Ang A. D., Moore P. K., Bhatia M. (2006): Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. *American journal of physiology, Cell physiology* 291, 503 - 510
 - Cavallini D., Mondovi B., De Marco C., Scioscia-Santoro A. (1962a): The mechanism of sulphhydration of cysteine. *Enzymologia* 24, 253 – 266
 - Cavallini D., Mondovi B., De Marco C., Scioscia-Santoro A. (1962b): Inhibitory effect of mercaptoethanol and hypotaurine on the desulphydration of cysteine by cystathionase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 96, 456 – 457
 - Chang H. Y., Nishitoh H., Yang X., Ichijo H., Baltimore D. (1998): Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860 - 1863
 - Chen-Levy Z., Nourse J., Cleary M.L. (1989): The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14; 18) translocation. *Molecular Cell Biology* 9,

- Chipuk J. E., Green D. R. (2008): How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* 18(4), 157 – 164
- Clem R. J., Miller L.K. (1994): Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and IAP. *Molecular Cell Biology* 14, 5212 – 5222
- Cohen M. G. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326, 1 - 16
- Cooper C. E., Brown G. C. (2008): The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40, 533 - 539
- Crook N. E., Clem R.J., Miller L.K. (1993): An apoptosisinhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology* 67, 2168 – 2174
- d’Emmanuele di Villa B. R., Sorrentino R., Maffia P., Mirone V., Imbimbo C., Fusco F., De Palma R., Ignarro L. J., Cirino G. (2009): Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11), 4513 – 4518.
- de Felici M., Di Carlo A., Pesce M. , S Iona S., Farrace M.G., Piacentini M. (1999): Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell death and differentiation* 6, 908 - 915
- Degterev A., Boyce M., Yuan J. (2003): A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543 - 8576
- Dejean L. M., Ryu S.-Y., Peixoto P. M., Teijido O., Kinnally K. W. (2010): MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (6-7), 1231 - 1238
- Deveraux Q. L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula M., Alnemri E.S., Salvesen G.S., Reed J.C. (1998): IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal* 17, 2215 – 2223
- Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature* 388, 300– 303
- Dorman D. C., Moulin F. J. – M., McManus B. E., Mahle K. C., James R. A., Struve M. F. (2002): Cytochrome Oxidase Inhibition Induced by Acute Hydrogen Sulfide Inhalation: Correlation with Tissue Sulfide Concentrations in the Rat Brain, Liver,

- Lung, and Nasal Epithelium. *Toxicological sciences* 65 (1), 18 – 25
- Du c., Fang M., Li Y., Wang X. (2000): Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 102 (1), 33 - 42
 - Duckworth B. C., Weaver J. S., Ruderman J. V. (2002): G₂ arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (26), 16794 - 16799
 - Dunphy W. G., Brizuela L., Beach D., Newport J. (1988): The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54 (3), 423 - 431
 - Eckhart L., Ballaun C., Uthman A., Kittel C., Stichenwirth M., Buchberger M., Fischer H., Sipos W., Tschachler E. (2005): Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *The journal of biological chemistry* 280, 35077 – 35080
 - Eppig J. J. (1993): Regulation of mammalian oocyte maturation. In: *The Ovary*, edited by Adashi E. Y., Leung P. C. K., Raven Press Ltd., New York
 - Er E. , Oliver L. , Cartron P. F. , Juin P. , Manon S., Vallette F. M. (2006): Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 1301–1311
 - Fan T.-J., Han L.-H., Cong R.-S., Liang J. (2005): Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727
 - Ferrell J. E., Jr (1996): MAP kinases in mitogenesis and development. *Current Topics in Developmental Biology* 33, 1 – 60
 - Fiorucci S., Antonelli E., Distrutti E., Rizzo G., Mencarelli A., Orlandi S., Zanardo R., Renga B., Di Sante M., Morelli A., Cirino G., Wallace J. L. (2005): Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury cause by anti-inflammatory non-steroidal drugs. *Gastroenterology* 129 (4), 1210 – 1224
 - Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124. 745–754.
 - Fuentes-Prior P., Salvesen G.S. (2004): The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemistry journal* 384, 201–232
 - Fumarola C., Guidotti G. G.(2004): Stress-induced apoptosis: Toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 9, 77 – 82
 - Gautier J., Matsukawa T., Nurse P., Maller J., (1989): Dephosphorylation and activation of *Xenopus*34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* 339, 626 - 629

- Gautier J., Norbury C., Lohka M., Nurse P., Maller J. (1988): Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54 (3), 433 - 439
- Gilbert S.F. (2006): *Developmental Biology* Eight Edition. Sinauer Associates Publishers, Sutherland, Massachusetts, pp 817
- Gosden R. G., Telfer E. E. (1987): Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology* 211, 169 – 175
- Goud P., Goud A., Van Oostveldt P., Van der Elst J., Dhont M. (1999): Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertility and Sterility* 72, 245 - 252
- Goud A. P., Goud P. T., Diamond M. P., Van Oostveldt P., Hughes M. R. (2005): Microtubule turnover in ooplasm biopsy reflects ageing phenomena in the parent oocyte. *Reproductive Biomedicine Online* 11, 43 – 52
- Gougeon A. (1996): Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews* 17, 121 – 155
- Hanson C. J., Bootman M. D., Roderick H. L. (2004): Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death. *Current Biology* 14, 933–935
- Hanson C. J., Bootman M. D., Distelhorst C. W., Wojcikiewicz R. J. H., Roderick H. L. (2008): Bcl-2 suppresses Ca^{2+} release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits Ca^{2+} uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content. *Cell Calcium* 44 (3), 324 – 338
- Hartl D., Ruvolo M. (2011): *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Eight edition. Jones & Bartlett Publishers, pp 832
- Hengartner M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770 – 776
- Herlands R. L., Schultz R. M. (1984): Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology* 229, 317–325
- Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R. D., Korsmeyer S. J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334 – 336
- Hosoki, R., Matsiki, N., Kimura, H. (1997): The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 237, 527 - 531
- Hsu Y.-T., Wolter K. G., Youle R. J. (1997): Cytosol-to-membrane redistribution of

- Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), 3668 – 3672
- Hu L.-F., Lu M., Wu Z.-Y, Wong P. T.-H., Bian J.-S. (2009): Hydrogen sulfide inhibits rotenone-Induced Apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Molecular Pharmacology* 75 (1), 27 - 34
 - Hu X., Christian P., Sipes G. I., Hoyer P. B. (2001): Expression and Redistribution of Cellular Bad, Bax, and Bcl-x_L Protein Is Associated with VCD-Induced Ovotoxicity in Rats. *Biology of reproduction* 65 (5), 1489 - 1495
 - Hu Y. M., Benedict M. A., Wu D. Y., Inohara N., Nunez, G. (1998): Bcl-x-l interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent cas pase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4386 – 4391
 - Huang D. C., Adams J. M., Cory S. (1998): The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO Journal* 17(4), 1029 - 1039
 - Hunter M. G. (2000): Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* 5, 122 – 130
 - Hyslop L. A., Nixon V. L., Levasseur M., Chapman F., Chiba K., McDougall A., Venables J. P., Elliott D. J., Jones K. T. (2004): Ca²⁺-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Developmental Biology* 269, 206– 219
 - Inoue M., Naito K., Nakayama T., Sato R. (1996): Mitogen-activated protein kinase activity and microtubule organization are altered by protein synthesis inhibition in maturing porcine oocytes. *Zygote* 4, 191 - 198
 - Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, B Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi D., French L. E., Tschopp J.. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190 – 195
 - Jeong Y.-J., Cui X.-S., Kim B.-K., Kim I. H., Kim T., Chung Y.-B., Kim N.-H. (2005): Haploidy influences Bak and Bcl-xL mRNA expression and increases incidence of apoptosis in porcine embryos. *Zygote* 13 (1), 17 - 21
 - Jeřeta M., Petr J., Krejčová T., Chmelíková E., Jílek F. (2008): In vitro ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Zygote* 16 (2), 145 – 152.
 - Jones K. T. (2004): Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular human reproduction* 10 (1), 1 – 5

- Kabil O., Banerjee R. (2010): Redox biochemistry of Hydrogen sulfide. *The journal of biological chemistry* 285 (29), 21903 – 21907
- Kabil O., Zhou Y., Banerjee R. (2006): Human cystathionine b-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry* 45, 13528 – 13536
- Kery V., Poneleit L., Kraus J. P. (1998): Trypsin cleavage of human cystathionine b-synthase into an evolutionary conserved active core: structural and functional consequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 355, 222 – 232
- Kharbanda S., Pandey P., Schofield L., Israels S., Roncinske R., oshida K., Bharti A., Yuan Z.-M., Saxena S., Weichselbaum R., Nalin C., Kufe D. (1997): Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13), 6939 – 6942
- Kikuchi K., Izaike Y., Noguchi J., Furukawa T., Daen F. P., Naito K., Toyoda Y. (1995): Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 105, 325 – 330
- Kimura H. (2011): Hydroge sulfide: its production and functions. *Experimental physiology* 96 (9), 833 - 835
- Kimura H., Kimura Y., Goto Y., (2010): Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12 (1), 1 - 13
- Kimura H., Shibuya N., Tanaka M., Yoshida M., Ogasawara Y., Togawa T., Ishii K. (2009): 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (4), 703 – 714
- Kimura Y., Kimura H. (2004): Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (10), 1165 – 1167
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal* 14 (22), 5579 - 5588
- Kloc, M., Shirato, Y., Bilinski, S., Browder, L. W., Johnston, J. (2007): Differential subcellular sequestration of proapoptotic and antiapoptotic proteins and colocalization of Bcl-xL with the germ plasm, in *Xenopus laevis* oocytes. *Genesis* 45 (8), 523 – 531.

- Koenig U., Eckhart L., Tschachler E. (2001): Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 1150 – 1154
- Korsmeyer S. J., Wei M. C., Saito M., Weiler S., Oh K. J., Schlesinger P. H. (2000): Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death & differentiation* 7 (12), 1166 - 1173
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M. J., Fenton W., Reed J. C. (1993): Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Research* 53, 4701 – 4714
- Krammer P.H. (2000): CD95's deadly mission in the Immune System. *Nature* 407, 789 – 95
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., El-Deiry W. S., Golstein P., Green D. R., Hengartner M., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Malorni W., Nuñez G., Peter M. E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G., (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16 (1), 3 - 11
- Lamkanfi M., Declercq W., Kalai M., Saelens X., Vandenabeele P. (2002): Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man, *Cell Death & Differentiation* 9, 358 – 361
- Langman J., Sadler T. W., (2006): *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins. 371s
- Ledan E., Polanski Z., Terret M. E., Maro B. (2001): Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology* 232, 400 – 413
- Li H., Zhu H., Xu C., Yuan J. (1998): Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 481 – 490
- Li L., Bhatia M., Zhu Y. Z., Zhu Y. C., Ramnath R. D., Wang Z. J. (2005): Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB Journal* 19, 1196 – 1198
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. (1997): Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91 (4), 479 - 489

- Liang C. G., Su Y. Q., Fan H. Y., Schatten H., Sun Q. Y. (2007): Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endocrinology* 21, 662 - 673
- Liang R., Yu W.-D., Du J.-B., Yang L.-J., Yang J.-J., Xu J., Shang M., Guo J.-Z. (2007): Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive toxicology* 24 (1), 89 - 96
- Liang X. W., Zhu J. Q., Miao Y. L., Liu J. H., Wei L., Lu S. S., Hou Y., Schatten H. Lu K. H., Sun Q. Y. (2008): Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371, 16 - 21
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. (2004): *Molecular Cell Biology* 5th. edition. Palgrave Macmillan, W. H. Freeman, 967 p.
- Longo F. J. (1981): Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biology of reproduction* 25, 399 – 411
- Łowicka E., Bełowski J. (2007): Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports* 59 (1), 4 - 24
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 (4), 471 – 480
- Ma W., Zhang D., Hou Y., Li Y.-H., Sun Q.-Y., Sun X.-F., Wang W.-H. (2005): Reduced Expression of MAD2, BCL2, and MAP Kinase Activity in Pig Oocytes after In Vitro Aging Are Associated with Defects in Sister Chromatid Segregation During Meiosis II and Embryo Fragmentation After Activation. *Biology of reproduction* 72 (2), 373 - 383
- Madgwick S., Jones K. J. (2007): How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic factor. *Cell division* 2, 4
- Mailhes J. B., Young D., London S. N. (1998): Postovulatory ageing of mouse oocytes *in vivo* and premature centromere separation and aneuploidy. *Biology of Reproduction* 58, 1206 - 1210
- Manabe N., Goto Y., Matsuda-Minehata F., Inoue N., Maeda A., Sakamaki K., Miyano T. (2004): Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *The journal of reproduction and development* 50 (5), 493 - 514

- Marston J. H., Chang M. C. (1964): The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *Journal of Experimental Zoology* 155, 237 - 251
- Masui Y. (2000): The elusive cytostatic factor in the animal egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 228 – 232
- Masui Y., Markert C. L. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 177, 129 – 145
- Mathai J. C., Missner A., Kuegler P., Saparov S. M., Zeidel M. L., Lee J. K., Pohl P. (2009): No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (39), 16633 – 16638
- Mattson B. M., Albertini D. F. (1990): Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Molecular reproduction and development* 25, 374 – 383
- Miao Y. L., Liu X. Y., Qiao T. W., Miao D. Q., Luo M. J., Tan J. H. (2005): Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 73, 1025 – 1031
- Miao Y.-L., Kikuchi K., Qing-Yuan Sun Q.-Y., Schatten H. (2009): Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update* 15(5), 573 - 585
- Micheau O., Thome M., Schneider P., Holler N., Tschopp J., Nicholson D. W., Briand C., Grütter M. G. (2002): The Long Form of FLIP Is an Activator of Caspase-8 at the Fas Death-inducing Signaling Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 45162 - 45171
- Miles E. W., Kraus J. P. (2004): Cystathionine b-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 29871 – 29874
- Monaghan P., Robertson D., Amos A.T.S., Dyer M.J.S., Mason D. Y., Greaves M.F. (1992): Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 40 (12), 1819 - 1825
- Morbeck, D. E., Esbenshade K. L., Flowers W. L., Britt J. H. (1992): Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction* 47, 485 – 491
- Moriishi K., Huang D. C. S., Cory S., Adams J. M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9683 – 9688
- Motlík J., Crozet N., Fulka J. (1984): Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes

- isolated from early antral follicles. *Jou of Reproduction and Fertility* 72, 323 – 328
- Motlík J., Fulka J. (1976): Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of experimental zoology* 198 (2), 155 - 162
 - Motlík J., Fulka J. (1986): Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 25, 87 – 96
 - Motta P. M., Nottola S. A., Makabe S. (1997): Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive biology* 75, 5 - 10
 - Muchmore S. W., Sattler M., Liang H., Meadows R. P., Harlan J. E., Yoon H. S., Nettlesheim D., Chang B. S., Thompson C. B., Wong S. L., Ng S. L., Fesik S. W. (1996): X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335 - 341
 - Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N., Ki S.M., Mu W., Gazi S. K, Barrow R. K., Yang G., Wang R., Snyder S. H. (2009b): H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling* 2 (96), ra72
 - Mustafa A. K., Gadalla M. M., Snyder S. H. (2009a): Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling* 2 (68), re2
 - Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F. C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J. D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P. H., Dixit V. M. (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/Ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817 – 827
 - Nagahara N., Ito T., Kitamura H., Nishino T. (1998): Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and cell biology* 110 (3), 243 – 250
 - Nagata S. (1997): Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355 - 365
 - Nixon V. L., Levasseur M., McDougall A., Jones K. T. (2002): Ca²⁺ oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Current Biology* 12, 746 – 750
 - Norbury C. J., Zhivotovsky B. (2004): DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797 - 2808
 - Norbury C., Nurse P. (1992): Animal cell cycles and their control. *Annual review of Biochemistry* 61, 441 – 470.
 - Norris D.O., Lopez K.H. (2010): The endocrinology of the mammalian ovary. In

Hormones and Reproduction of Vertebrates, Vol. V, Amphibians. Ed. Norris D.O., Lopez K.H. Academic Press, pp. 59 - 72

- Okada A., Inomata K., Nagae T. (1993): Spontaneous cortical granule release and alteration of zona pellucida properties during and after meiotic maturation of mouse oocytes. *The Anatomical Record* 1 (237), 518 – 526
- Oltvai Z. N., Korsmeyer S.J. (1994): Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79, 189 – 192
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993): Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 (4), 609 - 619
- Pan G., O'Rourke K., Dixit V. M. (1998): Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 Form a Ternary Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5841 - 5845
- Patel P., Vatish M., Heptinstall J., Wang R., Carson R. J. (2009) The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproduction Biology and Endocrinology* 7, 10
- Perez, G.I., Tao X. – J., Tilly J. L. (1999): Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Molecular Human Reproduction* 5 (5), 414 - 420
- Petrová I., Sedmíková M., Chmelíková E., Švestková D., Rajmon R. (2004): In vitro ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science* 49 (3), 93 – 98
- Petrová I., Sedmíková M., Petr J., Vodková Z., Pytloun P., Chmelíková E., Řehák D., Čtrnáctá A., Rajmon R., Jílek F. (2009): The roles of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and p38 Mitogen-activated Protein Kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 55 (1), 75 – 82
- Petrová, I., Rajmon, R., Sedmíková, M., Kuthanová, Z., Jílek, F., Rozinek, J. (2005): Improvement of developmental competence of aged porcine oocytes by means of synergistic effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF). *Czech Journal of Animal Science* 50 (7), 300 – 310
- Porter A. G., Jänicke R. U. (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* 6, 99 - 104
- Porter P. N., Grishaver M. S., Jones O. W. (1974): Characterization of human cystathionine b-synthase. Evidence for the identity of human L-serine dehydratase and cystathionine b-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 364, 128 – 139
- Posada J., Yew N., Ahn N. G., Vandewoude G. F., Cooper J.A. (1993): Mos stimulates map kinase in *Xenopus* oocytes and activates a map kinase kinase *in vitro*. *Molecular*

and Cellular Biology 13, 2546 – 2553

- Purring C., Zou H., Wang X., McLendon G. (1999): Stoichiometry, free energy, and kinetic aspects of cytochrome c:Apaf-1 binding in apoptosis. *Journal of the american chemical society* 121, 7435 – 7436
- Puthalakath H., Huang D. C. S., O'Reilly L. A., King S. M., Strasser A. (1999): The proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell* 3, 287 – 296
- Rastogi R.P., Sinha R., Sinha R.P. (2009): Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI journal* 8, 155 - 181
- Richard F. J., Tsafiriri A., Conti M. (2001): Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biology of reproduction* 65 (5), 1444 - 1451
- Riedl S. J., Shi Y. (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 897–907
- Rose P., Moore P. K., Ming S. H., Nam O. Ch., Armstrong J. S., Whiteman M. (2005): Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent b-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis. *World Journal of Gastroenterology* 11 (26), 3990 - 3997
- Roy N., Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. (1997): The c-IAP-1 and c-IaP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO Journal* 16, 6914 – 6925
- Sagata N., Watanabe N., Vandewoude G. F., Ikawa Y. (1989): The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs *Nature* 342, 512 – 551
- Salustri A., Yanagishita M., Underhill C. B., Laurent T. C., Hascall V. C. (1992): Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cell of the preovulatory follicle. *Developmental biology* 151, 541 - 551
- Sattler M., Liang H., Nettessheim D., Meadows R. P., Harlan J. E., Eberstadt M., Yoon H. S., Shuker S. B., Chang B. S. Minn A. J., Thompson C. B, Fesik S. W. (1997): Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275 (5302), 983 - 986
- Schoenfelder M., Einspanier R.(2003): Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biology of Reproduction* 69, 269 – 277
- Screatton G., Xu X. N. (2000): T cell life and death signalling via TNF-receptor family

- members. *Current opinion in immunology* 12(3), 316 – 322
- Sela-Abramovich S., Edry I., Galiani D., Nevo N., Dekel N. (2006): Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* 147 (5), 2280 - 2286
 - Senbon S., Hirao Y., Miyano T. (2003): Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from *in vitro* culture. *Journal of reproduction and development* 49 (4), 259 - 269
 - Shan X., Kruger W. D. (1998) Correction of disease-causing CBS mutation in yeast. *Nature Genetics* 19, 91 – 93
 - Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., and Kimura, H. (2009b) Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of Biochemistry* 146, 623 - 626
 - Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., and Kimura, H. (2009a) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 703 - 714
 - Shigenaga M. K., Hagen T. M., Ames B. N. (1994): Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10771 – 10778
 - Sorensen R. A., Wassarman P. M. (1976): Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental biology* 50, 531 – 536
 - Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E. S. (1998): Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization *Molecular Cell* 1, 949 – 957
 - Stárka L. (2009): Sulfan - další plynný hormon? *Chemické Listy* 103, 28 – 31
 - Stennicke H. R., Deveraux Q. L., Humke E. W., Reed J. C., Dixit V. M., Slavesen G. S. (1999): Caspase 9 can be activated without proteolytic processing. *The journal of biological chemistry* 274, 8359 – 8362
 - Suzuki H., Takashima Y., Toyokawa K. (2002): Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. *Journal of reproduction and development* 48 (3), 293 – 301
 - Swain J., Ding J., Wu J., Smith G. D. (2008): *Molecular human reproduction* 14 (5), 291 – 299
 - Szczepkowski T. W., Wood J. L. (1967): The cystathionase-rhodanese system. *Biochimica et Biophysica Acta* 139, 469 – 478

- Szybek K. (1972): *In vitro* maturation of oocytes from sexually immature mice. *Journal of endocrinology* 54, 527 – 528
- Taieb F., Chartrain I., Chevalier S., Haccard O., Jesus, C. (1997): Cyclin D2 arrests *Xenopus* early embryonic cell cycles. *Experimental Cell Research* 237, 338 – 346
- Tamm, I., Wan Y. t, Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T., Reed J.C. (1998): IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* 59, 5315 – 5320
- Tian C., Lv D., Qiao H., Zhang J., Yin Y.-H., Qian X.-P., Wang Y.-P., Zhang Y., Chen W.-F. (2007): TFDP3 inhibits E2F1-induced, p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 20 - 25
- Tsujimoto Y., Shimizu S. (2000): VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death and Differentiation* 7, 1174 – 1181
- Van Blerkom J., Davis P., Mathwig V., Alexander S. (2002): *Human reproduction* 17 (2), 393 – 406
- van den Hurk R., Bevers M. M., Beckers J. F. (1997): *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology* 47, 73 – 82
- Vanderhyden B. (2002): Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* 7, 2006 – 2022
- Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L. (2000): Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 102, 43 - 53
- Verlhac M.-H., Kubiak J. Z., Clarke H. J., Maro, B. (1994): Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120, 1017 – 1025
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307 - 310.
- Vousden K. H., Lu X. (2002): Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594 - 604.
- Wang R. (2002): Two's company, three's a crowd - Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal* 16, 1792-1798
- Wang R., Tang G., Wu L. (2010): Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 37, 753 – 763
- Wassarman P.M. (1988): *The Mammalian Ovum In: The Physiology of Reproduction.*

eds. Knobil E. and Neill J., Raven Press Ltd., New York, 69 – 102

- Wilding M., Dale B., Marino M., di Matteo L., Alviggi, Pisaturo L., Lombardi L., De Placido G. (2001): Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human reproduction* 16 (5), 909 – 917
- Winston N.J. (1997): Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biology of the Cell* 89, 211 – 219
- Winston N. J., Braude P. R., Johnson M. H. (1993): Are failed-fertilized human oocytes useful? *Human Reproduction* 8, 503 - 507
- Wolter K. G., Hsu Y. T., Smith, C. L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 139, 1281 – 1292
- Wyllie A. H. (1987): Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *Journal of pathology* 153, 313 – 316
- Xu Z., Abbott A., Kopf G. S., Schultz R. M., Ducibella T. (1997): Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction* 57, 743 – 750
- Yamamoto T. M., Iwabuchi M., Ohsumi K., Kishimoto T. (2005): APC/CCdc20-mediated degradation of cyclin B participates in CSF arrest in unfertilized *Xenopus* eggs. *Developmental Biology* 279, 345 - 355.
- Yang G., Sun X., Wang R. (2004): Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal* 18 (14), 1782 - 1784
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80 (2), 285 - 291
- Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A.K., Mu W., Zhang S., Snyder S.H., Wang R. (2008): H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine c-lyase. *Science* 322, 587 – 590
- Yang X., Khosravi-Far R., Chang H. Y, Baltimore D. (1997): Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067 - 1107
- Ye J., Flint A. P. F., Luck M. R., Campbell H. S. (2003): Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction* 125, 645 - 656

- Yin X. M., Oltvai Z. N., Korsmeyer S. J. (1994): BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369 (6478), 321 - 323
- Ying Y., Qi X., Zhao G. (2002): Induction of Primordial Germ Cells from Pluripotent Epiblast. *The Scientific World JOURNAL* 2, 801 - 810
- You X.-J., Xu C., Lu J.-Q., Zhu X.-Y., Gao L. , Cui X. -R., Li Y., Gu H., Ni X. (2011): Expression of Cystathionine b-synthase and Cystathionine c-lyase in Human Pregnant Myometrium and Their Roles in the Control of Uterine Contractility. *PLoS ONE* 6(8), e23788
- Youle R. J., Strasser A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1), 47 – 59
- Zha H., Aimé-Sempé C., Sato T., Reed J. C. (1996a): Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *The journal of biological chemistry* 271 (13), 7440 - 7444
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. (1996b): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4), 619 – 628
- Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. (2001): The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO Journal* 20, 6008 - 6016
- Zou H., Henzel W. J., Liu X. S., Lutschg A., Wang X. D. (1997): Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405 – 413
- Zuccotti M., Piccinelli A., Rossi P. G., Garagna S., Redi C. A. (1995): Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Molecular reproduction and development* 41, 479 – 485