

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

*Katedra veterinárních disciplín*

**Vliv sulfanu na pro-apoptické faktory  
během stárnutí prasečích oocytů *in vitro***

Diplomová práce

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

**Autor práce:** Lenka Jarošová

2012

### **Prohlášení**

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

V Praze dne: .....

Podpis autora práce: .....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Tereze Krejčové, mému příteli a mamince, za jejich pomoc a trpělivost při psaní této diplomové práce. V neposlední řadě také děkuji celému kolektivu katedry veterinárních disciplín za ochotu a vstřícné jednání.

## Souhrn

Současný rozvoj a zdokonalování reprodukčních biotechnologií s sebou přináší vyšší nároky na kvalitu a kvantitu savčích oocytů. V mnoha studiích, zabývajících se průběhem *in vitro* maturace a fertilizace, jsou hojně využívány zejména oocyty izolované z prasečích ovariálních folikulů, a to z důvodu jejich snadného získávání a ekonomické dostupnosti. Avšak při využívání těchto oocytů v *in vitro* podmínkách dochází k výskytu řady problémů, týkajících se snížené kvality oocytů a jejich narušené vývojové kompetence.

Snížená kvalita oocytů, potažmo i jejich fertilizační schopnost, může být ovlivněna i procesem stárnutí, kterému oocyty podléhají několik hodin po dosažení metafáze druhého meiotického dělení. Podstatným projevem stárnutí oocytů je fragmentace, ke které dochází po indukci programované buněčné smrti tj. apoptóze. Mezi důležité regulátory apoptotického procesu patří proteiny z rodiny Bcl-2, jejíž součástí jsou antiapoptotické a proapoptotické faktory. V indukci apoptózy u oocytů hraje zásadní roli zejména proapoptotický faktor Bax, jehož exprese byla prokázána i u oocytů, které podléhají stárnutí. Regulace apoptózy může být ovlivněna mnoha faktory, avšak mechanismus jejich účinků není dosud přesně znám.

Z fyziologického hlediska by mohla mít na regulaci apoptózy stárnoucích oocytů vliv i endogenní produkce sulfanu. Sulfan patří k důležitým signálními molekulám stejně jako oxid dusnatý či oxid uhelnatý. Sulfan se v organismu podílí na regulaci mnoha fyziologických a patologických procesů. Jeho endogenní produkce byla již potvrzena i v reprodukčních tkáních, kde je sulfan schopen ovlivňovat průběh oogeneze, folikulogeneze i gravidity.

Hypotézou této diplomové práce je, že je sulfan aktivně zapojen do regulace exprese a intracelulární lokalizace proapoptotického faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů.

Prvním dílčím cílem této diplomové práce bylo prokázat, zda-li v průběhu stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách dochází k expresi enzymů, které katalyzují endogenní syntézu sulfanu (3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy, cystathionin- $\gamma$ -lyázy a cystathionin- $\beta$ -syntázy). Druhý dílčí cíl byl zaměřen na sledování exprese a lokalizace proapoptotického faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů. Posledním a stěžejním cílem bylo potvrdit hypotézu, že je sulfan schopen, během stárnutí prasečích oocytů, ovlivnit expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax.

Expresi a intracelulární lokalizace proapoptotického faktoru Bax a enzymů 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy, cystathionin- $\gamma$ -lyázy a cystathionin- $\beta$ -syntázy, byla

stanovována imunocytochemickou metodou u oocytů, jež byly vystaveny prodloužené kultivaci (stárnutí) po dobu 1, 2 a 3 dnů.

Bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů dochází k expresi enzymů 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy a cystathionin- $\gamma$ -lyázy. Expresie cystathionin- $\beta$ -syntázy během stárnutí prasečích oocytů prokázána nebyla. 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza byla detekována během všech hodnocených dnů prodloužené kultivace, kdy byla v oocytech lokalizována v jednotlivých ložiscích v oblasti prvojádra, v cytoplazmě a v korové vrstvě. Cystathionin- $\gamma$ -lyáza byla taktéž detekována v průběhu všech dnů prodloužené kultivace, ale v oocytech byla lokalizována jen slabě v ložiscích v cytoplazmě.

Dále bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů dochází k expresi proapoptotického faktoru Bax. Přítomnost tohoto faktoru byla detekována v průběhu všech hodnocených dnů prodloužené kultivace. Během těchto dnů byl v oocytech faktor Bax lokalizován v oblasti prvojádra, v cytoplazmě a v korové vrstvě. Intenzita signálu faktoru Bax se v průběhu hodnocených dnů prodloužené kultivace měnila. Zvýšení intenzity signálu faktoru Bax bylo detekováno u oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace, kdy došlo ke zvýšení této intenzity ve všech sledovaných oblastech. Nejvyšší intenzita signálu faktoru Bax byla u těchto oocytů naměřena v oblasti prvojádra, kde docházelo ke kumulaci jeho ložisek. U oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace však následně došlo k poklesu intenzity signálu faktoru Bax ve všech sledovaných oblastech.

Hypotézu, zda-li se sulfan během stárnutí prasečích oocytů aktivně zapojuje do regulace exprese a intracelulární lokalizace proapoptotického faktoru Bax, se prokázat nepodařilo. Avšak je možné, že sulfan ovlivňuje funkci tohoto faktoru jiným mechanismem, například prostřednictvím regulace jeho aktivity, podobně jako u jiných faktorů. Aktivita faktoru Bax však našimi experimenty sledována nebyla.

Klíčová slova: oocyt, prase, stárnutí, sulfan, apoptóza, faktor Bax, 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza, cystathionin- $\gamma$ -lyáza., cystathionin- $\beta$ -syntáza

## Summary

Current development and improvement of reproductive biotechnology brings with it higher demands on quality and quantity of mammalian oocytes. In many studies, dealing with the process of *in vitro* maturation and fertilization, are widely used especially oocytes isolated from pig ovarian follicles, because of their ease of acquisition and economic accessibility. However, the use of these oocytes *in vitro* conditions leads to the occurrence of many problems related to reduced quality of oocytes and impaired developmental competence.

Reduced quality of oocytes, by extension their fertilizing ability, may be influenced by the aging process, which the oocytes are subject to a few hours after attainment of the second meiotic metaphase. An essential manifestation of the aging of oocytes is the fragmentation of oocytes that occurs after induction of programmed cell death, i.e. apoptosis. Among the important regulators of apoptotic process include proteins of the Bcl-2 family, which includes antiapoptotic and proapoptotic factors. The induction of apoptosis in oocytes plays a crucial role particularly proapoptotic factor Bax, whose expression has been demonstrated even in oocytes that are subject to aging. The regulation of apoptosis may be influenced by many factors, but the mechanism of their effects is not yet precisely known.

From a physiological point of view, the endogenous production of hydrogen sulphide could have an influence on the apoptosis regulation of aging oocytes. Hydrogen sulfide belongs to the important signal molecules same like nitric oxide and carbon monoxide. Hydrogen sulfide participates in the organism in the regulation of many physiological and pathological processes. Its endogenous production has been confirmed in reproductive tissues, where sulphide is able to influence the process of oogenesis, folliculogenesis and gravidity.

The hypothesis of this thesis is that the sulphide is actively involved in the regulation of expression and intracellular localization of proapoptotic factor Bax during aging of pig oocytes.

The first sub-goal of this thesis was to demonstrate whether during aging of pig oocytes *in vitro* conditions realize to the expression of enzymes that catalyze the endogenous synthesis of hydrogen sulfide (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, cystathionine- $\gamma$ -lyase and cystathionine- $\beta$ -synthase). The second sub-goal was focused on monitoring of the expression and localization of proapoptotic factor Bax during aging of pig oocytes. The last

and key goal was to confirm the hypothesis that sulphide is able to affect, during aging of pig oocytes, expression and intracellular localization of proapoptotic factor Bax.

Expression and intracellular localization of proapoptotic factor Bax and enzymes 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, cystathionine- $\gamma$ -lyase and cystathionine- $\beta$ -synthase, was determined by immunocytochemistry method in oocytes that were exposed to prolonged cultivation (aging) for 1, 2 and 3 days.

It has been shown that during aging of pig oocytes there is expression of enzymes 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and cystathionine- $\gamma$ -lyase. Expression of cystathionine- $\beta$ -synthase during aging of pig oocytes has not been shown. 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase was detected in all evaluated days of prolonged cultivation, which was localized in oocytes in individual deposits in the pronuclei area, cytoplasm and in the cortical layer. Cystathionine- $\gamma$ -lyase was also detected during prolonged cultivation of all days, but the oocytes were located only in isolated deposits in the cytoplasm.

Furthermore, it has been shown that during aging of pig oocytes there is expression of proapoptotic factor Bax. The presence of this factor was detected in all evaluated days during prolonged cultivation. During those days factor Bax in oocytes was located in the pronuclei area, cytoplasm and in the cortical layer. Signal intensity of factor Bax was changing during evaluated days during prolonged cultivation. Increasing of this intensity was detected in oocytes after 2 day of prolonged cultivation, which increased the intensity in all measured areas. The highest signal intensity was then in these oocytes measured in the pronuclei area, where there was a deposit accumulation of the factor. Consequently there was a decrease of the intensity in all measured areas at the oocytes after 3 day of prolonged cultivation.

The hypothesis of whether the hydrogen sulfide during aging of pig oocytes actively involved in the regulation of expression and intracellular localization proapoptotic factor Bax has not been proved. However, it is possible that sulphide affects the function of this factor by another mechanism, such as through regulation of its activity, like any other factors. Factor Bax activity in our experiments were not monitored.

Key words: oocyte, pig, aging, sulphide, apoptosis, factor Bax, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, cystathionine- $\gamma$ -lyase, cystathionine- $\beta$ -synthase

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	10
<b>2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE</b> .....	11
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	12
<b>3. 1. Oogeneze a folikulogeneze</b> .....	12
3. 1. 1. Stádium primordiálních zárodečných buněk .....	12
3. 1. 2. Stádium vývoje a množení oogonií .....	13
3. 1. 3. Stádium růstu.....	13
3. 1. 4. Stádium zrání.....	17
3. 1. 4. 2. Jaderné zrání .....	18
3. 1. 4. 3. Cytoplazmatické zrání .....	19
3. 1. 5. Stádium stárnutí.....	20
<b>3. 2. Apoptóza</b> .....	23
3. 2. 1. Význam apoptózy .....	23
3. 2. 2. Charakteristické znaky apoptózy.....	24
3. 2. 3. Signální dráhy apoptózy .....	24
3. 2. 3. 1. Vnější signální dráha apoptózy .....	25
3. 2. 3. 2. Vnitřní signální dráha .....	26
3. 2. 4. Proteiny Bcl-2 rodiny .....	27
3. 2. 4. 1. Skupina antiapoptotických proteinů .....	28
3. 2. 4. 2. Skupina proapoptotických BH3-only proteinů .....	29
3. 2. 4. 2. 1. Protein Bid .....	30
3. 2. 4. 2. 2. Protein Bim .....	30
3. 2. 4. 2. 3. Protein Bmf .....	31
3. 2. 4. 2. 4. Proteiny Bad a Bik .....	31
3. 2. 4. 2. 5. Proteiny Puma a Noxa.....	31



3. 2. 4. 3. Skupina proapoptotických proteinů – multidoménové proteiny.....	31
3. 2. 4. 3. 1. Protein Bak.....	32
3. 2. 4. 3. 2. Protein Bok.....	33
3. 2. 4. 3. 3. Protein Bax.....	33
<b>3. 3. Sulfan.....</b>	<b>35</b>
3. 3. 1. Biosyntéza sulfanu v organismu .....	36
3. 3. 2. Katabolismus sulfanu v organismu .....	37
3. 3. 3. Vliv sulfanu na kardiovaskulární systém .....	38
3. 3. 4. Vliv sulfanu na centrální nervový systém .....	39
3. 4. 5. Vliv sulfanu na samičí a samčí reprodukční systém .....	40
<b>4. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>42</b>
4. 1. Získávání a selekce oocytů pro experimentální účely.....	42
4. 2. Postup kultivace oocytů .....	42
4. 3. Postup prodloužené kultivace oocytů.....	42
4. 4. Posouzení a vyhodnocení kultivace oocytů .....	43
4. 5. Postup lokalizace proapoptotického faktoru Bax a enzymů, katalyzujících syntézu sulfanu v oocytech .....	43
4. 6. Statistická analýza.....	44
4. 7. Experimentální schéma .....	44
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>46</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>69</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>73</b>

# 1. ÚVOD

Pro biotechnologické účely jsou důležitým zdrojem kvalitních tj. vývojově kompetentních oocytů, oocyty dozrálé v *in vitro* podmínkách. Tyto oocyty jsou však mnohdy vystaveny prodloužené kultivaci, během níž u oocytů dochází k procesu stárnutí.

Proces stárnutí zahrnuje řadu buněčných a molekulárních změn, které u oocytů negativně ovlivňují vývojovou kompetenci. Probíhající intracelulární změny v oocytech vedou posléze k indukci jejich programované buněčné smrti tj. apoptóze.

Apoptotický zánik buněk hraje významnou roli v morfogenezi tkání, v regulaci homeostázy a je součástí regulace imunitního systému. Důležitými regulátory apoptózy jsou proteiny z rodiny Bcl-2, která zahrnuje proapoptotické a antipoptotické faktory. Proapoptotické faktory navozují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, čímž umožňují uvolnění dalších proapoptotických molekul z intermembránového prostoru do cytoplazmy a dojde k aktivaci degradujících kaspáz. U oocytů je apoptotický proces regulován i proapoptotickým faktorem Bax, který byl detekován i u oocytů, které podléhaly stárnutí. Na regulaci apoptózy může mít vliv mnoho faktorů, jejichž mechanismus účinku není dosud zcela objasněn.

U stárnoucích oocytů by mohl ovlivňovat regulaci apoptózy i endogenně produkováný sulfan. Sulfan se podílí jako signální molekula na regulaci řady fyziologických a patologických procesů. V reprodukčním systému je schopen svými účinky ovlivňovat průběh oogeneze, folikulogeneze a gravidity. Vliv sulfanu na regulaci apoptózy byl zatím sledován pouze u somatických buněk, kde vykazoval jak proapoptotické, tak antipoptotické účinky.

Tato diplomová práce je zaměřena na potvrzení hypotézy, že je sulfan schopen během stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách ovlivnit expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax.

## 2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Hypotézou této diplomové práce je, že je sulfan aktivně zapojen do regulace exprese a intracelulární lokalizace proapoptotického faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů.

K ověření stanovené hypotézy bylo stanoveno několik dílčích cílů. Prvním dílčím cílem bylo prokázat, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách dochází k expresi enzymů, které katalyzují endogenní syntézu sulfanu (3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy, cystathionin- $\gamma$ -lyázy a cystathionin- $\beta$ -syntázy). Druhým dílčím cílem bylo prokázat, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů dochází k expresi proapoptotického faktoru Bax. Posledním a stěžejním cílem bylo potvrdit hypotézu, že je sulfan schopen, během stárnutí prasečích oocytů, ovlivnit expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3. 1. Oogeneze a folikulogeneze

Oocyty se vyvíjí a získávají fertilizační schopnost během dlouhého a periodicky řízeného procesu tzv. oogeneze. Celý proces vývoje oocytů zahrnuje několik fází, při kterých jsou syntetizovány cytoplazmatické komponenty a je redukován počet chromozómů (Grødahl, 2008). V *in vivo* podmínkách dochází k vývoji a dozrávání oocytů uvnitř ovariálních folikulů, které jsou považovány za základní funkční jednotku samičího reprodukčního systému (McGee *et* Hsueh, 2000). Vzájemná koordinace oocytů s folikulárními buňkami umožňuje dozrávání a ovulaci oplození schopných oocytů (Adhikari *et* Liu, 2009).

#### 3. 1. 1. Stádium primordiálních zárodečných buněk

Oogenetický vývoj je započat vznikem tzv. primordiálních zárodečných buněk (PGC) (Wassarman, 1988). Ty představují malé buněčné populace, objevující se v rané fázi embryonálního vývoje (Machev *et al.*, 2004), kdy dochází k jejich odlišení od somatických buněk (Edson *et al.*, 2009).

K jejich vzniku dochází v proximálním epiblastu v blízkosti extraembryonálního ektodermu. Poté se aktivně améboidním pohybem šíří do posterální části primitivního proužku, kde se diferencují. Posléze nastává migrace do oblasti báze alantois, extraembryonálního a entodermálního epitelu (Anderson *et al.*, 2000). Z extraembryonální oblasti migrují přes mezoderm zadního střeva, kolem coelomické dutiny, laterálním směrem k vznikajícím genitálním lištám (Buehr, 1997).

U prasečích embryí se PGC v oblasti genitálních lišt objevují již 18. den po syngamii, kdy ještě nedošlo ke vzniku pohlavních gonád. Ty jsou pozorovatelné až kolem 25. dne (Black *et* Erickson, 1968). Primordiální zárodečné buňky se dělí běžným mitotickým dělením, přičemž tato aktivita je patrná už kolem 13. dne. Následkem rychlé mitotické aktivity se jejich počet cca 20. den pohybuje kolem 5000 a 50. den je to až 110 000, poté nastává jejich redukce (Hunter, 2000). Tvorba PGC pravděpodobně ustává při vzniku primárních oocytů, které vstoupily do profáze prvního meiotického dělení (Edson *et al.*, 2009). Tato teorie však byla v roce 2004 zpochybněna studií Johnsona *et al.*, podle nichž se tyto PGC tvoří i postnatálně (Johnson *et al.*, 2004).

### 3. 1. 2. Stádium vývoje a množení oogonií

Primordiální zárodečné buňky se po kolonizaci ovariální tkáně začínají diferenciovat v tzv. oogonie (Pepling, 2006). K rozvoji a diferenciaci oogonií dochází v korové oblasti ovarií (Guraya, 2008). Oogonie podstupují intenzivní mitotická dělení (Wassarman, 1988), při nichž probíhá neúplná cytokineze a dceřinné buňky tak zůstávají spojeny mezibuněčnými spoji, kterými spolu komunikují (Edson *et al.*, 2009). Zároveň se oogonie začínají obklopotvat jednou vrstvou folikulárních buněk tzv. pregranulózních, které jsou nezbytné k jejich dalšímu vývoji (Vanderhyden, 2002).

Počet oogonií se mitotickým dělením zvýší na několik set tisíc. Podstatná část oogonií však během dalšího vývoje zaniká programovanou buněčnou smrtí tzv. apoptózou nebo nekrózou. Proces množení bývá zpravidla do porodu ukončen (Hunter, 2000).

### 3. 1. 3. Stádium růstu

Během preleptotene, tj. interfáze posledního mitotického dělení oogonií, probíhá poslední chromozomální replikace, která signalizuje přeměnu oogonií v primární oocyty (Wassarman, 1988).

Množství primárních oocytů je dáno předchozím dělením oogonií, primární oocyty se mitoticky množit nedokáží (Austin, 1962). U prasniček se počet primárních oocytů při narození odhaduje na cca 210 000 (Prather *et Day*, 1998). Primární oocyty obklopené jednou vrstvou pregranulózních buněk jsou schopny následně zahájit první meiotické dělení. Bez těchto buněk primární oocyty zanikají. Komplex primárních oocytů spolu s pregranulózními buňkami tvoří tzv. primordiální folikul (Vanderhyden, 2002).

Meiotický proces je u primárních oocytů zahájen ještě během prenatalního období. Po narození je vývoj téměř všech primárních oocytů zastaven na konci profáze prvního meiotického dělení, konkrétně ve stádiu dictyotene (1. meiotický blok) (Chaube, 2001).

Za zablokování primárních oocytů v profázi I jsou odpovědné látky, produkované folikulárními buňkami, mezi které patří cAMP (cyclic Adenosine Monophosphate), polypeptid OMI (Oocyte Maturation Inhibitor) a purinové či pyrimidinové nukleotidy (Wassarman, 1988).

Oocyt ve stádiu dictyotene zůstává, dokud nedojde k endokrinní stimulaci resp. preovulačnímu nárůstu luteinizačního hormonu (LH) v období nástupu puberty (Mehlmann, 2005). Tyto malé nerostoucí oocyty zastavené v profázi I by měly být jediným

zdrojem neoplozených vajíček u pohlavně dospělého jedince (Wassarman, 1988), což ale, jak bylo uvedeno v kapitole 1. 1., nemusí být pravda.

Mechanismus vstupu do meiotického dělení je dodnes předmětem výzkumu. Dříve se předpokládalo, že se tak děje nezávisle na jakékoli endokrinní stimulaci. Posléze bylo zjištěno, že je meiotické dělení indukováno faktorem identifikovaným ve folikulární tekutině preovulačních folikulů tzv. MIS (Meiotic Inducing Substance), jež je uvolňován buňkami *rete ovarii* (Westergaard *et al.*, 1985). Tato indukce je však závislá na poměru s faktorem inhibujícím meiotické dělení MPS (Meiosis Preventing Substance) (Grinstead *et Byskov*, 1981). Kromě těchto faktorů byly uvnitř preovulačních folikulů identifikovány steroly MAS (Meiosis Activating Sterols), které jsou meziproduktem tvorby cholesterolu. Tyto steroly se podílejí na zahájení meiotického dělení (Byskov *et al.*, 1995), ale jsou schopny ovlivnit i pozdější meiotické zrání oocytů (Grødahl, 2008).

Se vstupem do meiotického dělení se začínají intenzivně dělit pregranulózní buňky a primární oocyt se obklopuje granulózními buňkami. Dříve primordiální folikul se tak mění ve folikul primární (Sládeček, 1986). Primární folikuly zůstávají v nezměněném stavu tzv. klidové fázi, dokud nedojde k stimulaci jejich růstu tzv. initial recruitment. Tato stimulace je zprostředkována již před nástupem puberty intraovariálními či jinými vlivy, které nebyly ještě přesně objasněny (McGee *et Hsueh*, 2000). Současně s růstem primárních folikulů začínají růst i v nich uložené primární oocyty. O iniciaci růstu těchto oocytů rozhodují taktéž různé intraovariální stimuly, avšak rozhodující vliv mohou mít samy oocyty (Eppig, 2001).

Ovariální folikuly, spolu s primárními oocyty, rostou koordinovaným způsobem a navzájem se ovlivňují. Komunikace mezi granulózními buňkami a primárním oocytem probíhá na úrovni mezibuněčných spojů *gap junctions*. Obousměrná komunikace slouží během růstu oocytů k výměně základních komponentů, nezbytných pro jejich energetický metabolismus (Guraya, 2008). Kromě mezibuněčných interakcí, zprostředkovaných přes *gap junctions*, je vývoj oocytu řízen i granulózními parakrinními signály (Hunter, 2000).

Granulózní buňky ovlivňují jak celkový růst primárního oocytu, tak regulaci meiotického zrání. Zároveň jsou také schopny modulovat expresi proteinů a transkripční aktivitu oocytů (Vanderhyden, 2002). V *in vitro* podmínkách nejsou oocyty bez přítomnosti granulózních buněk schopné růstu, ačkoli pokud jsou ke kultivaci použity parakrinní faktory těchto buněk, růst oocytů nemusí být ovlivněn (Hunter, 2000).

Oocyt ovlivňuje již počáteční tvorbu folikulů. V období časného vývoje jsou folikuly závislé na oocyt-specifických látkách, zahrnujících rodinu transformujícího růstového faktoru

$\beta$  (TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ ) (Dong *et al.*, 1996). Zejména v primárním stádiu tvorby folikulů jsou z této rodiny pro jejich vývoj zásadní zejména faktory GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9) a BMP-15 (Bone Morphogenic Protein-15) (Eppig, 2001). Později jsou oocyty schopny ovlivnit proliferaci a diferenciaci granulózniích buněk či tvorbu steroidních hormonů (Vanderhyden, 2002).

Během růstu podstupují oocyty a folikuly řadu morfologických změn (Wassarman, 1988). Růst je rozdělen na dvě odlišné fáze. První fáze zahrnuje růst jak oocytů, tak folikulů. V druhé fázi zůstává velikost oocytů konstantní a folikuly v růstu pokračují do preovulační velikosti (Hunter, 2000).

V rámci první fáze získávají oocyty tzv. meiotickou kompetenci. Získání této kompetence je druhově specifické a úzce souvisí jak s konečnou velikostí oocytů, tak s velikostí folikulů (Guraya, 2008). Malé nekompetentní oocyty nemají schopnost podstoupit fázi zrání, z důvodu neschopnosti aktivovat faktor MPF (Maturation Promoting Factor) a protein-kinázu MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), které jsou nutné pro přechod do této fáze. Schopnost aktivovat tyto proteinové kinázy získávají oocyty až v průběhu závěrečné fáze růstu (Miyano *et Manabe*, 2007).

U hlodavců jsou oocyty kompetentní již ve stádiu antrálních folikulů, kdežto u prasat či krav se kompetentní oocyty objevují až u zralých antrálních tj. Graafových folikulů (Guraya, 2008). Oocyty prasat a krav izolované z malých antrálních folikulů jsou schopné projít rozpadem zárodečného váčku (GVBD, Germinal Vesicle Break-Down) a dosáhnout stádia metafáze 1. meiotického dělení, ale další vývoj je zablokovan (Eppig, 2001). Pro *in vitro* zrání se používají oocyty izolované z folikulů o velikosti větší než 3 mm (Hunter, 2000).

Růst primárních oocytů je charakterizován zvětšováním jádra, které má podobu zárodečného váčku (GV – Germinal Vesicle) (Brunet *et Maro*, 2007). Významná změna je patrná na jaderném chromatinu, kdy se v počátečním stádiu nachází v difúzním stavu, ovšem se zvětšující se velikostí oocytu pak získává kompaktní strukturu. Jadérka mění svou prostorovou konfiguraci z difúzní přes fibrogranulózní až na výhradně fibrilární (Fulka *et al.*, 1998). Tyto změny odrážejí stav intenzivní syntézy ribonukleových kyselin a proteinů (Guraya, 2008), která s růstem oocytů postupně ustává. Cytoplazmatické změny se týkají morfologických změn a zvyšování počtu mitochondrií, ultrastrukturálních změn Golgiho komplexů, dále pak kumulace kortikálních zrn, lipidových granul, vakuol, žloutkových granulí a v neposlední řadě ribosomů (Osuchowska, 2006). U rostoucích oocytů je viditelná

i reorganizace cytoplazmatických mikrotubulů (MTOC), které se shlukují v perinukleární oblasti (Wickramasinghe *et al.*, 1993). Celkový růst primárních oocytů trvá u prasat cca 80 dní (Morbeck *et al.*, 1992) a průměrná velikost se zvětší z původních 30  $\mu\text{m}$  na 120  $\mu\text{m}$  (Miyano *et al.*, 2007).

Růst folikulů probíhá lineárně spolu s oocyty (Hunter, 2000). Primární folikuly se po iniciaci růstu mění v důsledku proliferace folikulárních buněk do podoby sekundárních tj. preantrálních folikulů. Tyto folikuly zahrnují početnou a různorodou skupinu, jejímiž hlavními znaky jsou vícevrstevné uspořádání folikulárních buněk kolem oocytů (Erickson, 1986), tvorba glykoproteinové vrstvy *zóny pellucidy* (Guraya, 2008) a vazivového obalu *theca folliculi* (McGee *et al.*, 2000). Postupně dochází k tvorbě dutinek vyplněných tekutinou, které posléze splývají a vzniká *antrum folliculi*. Následně vznikají terciární tj. antrální folikuly, kdy přibývá folikulární tekutiny a *antrum folliculi* se zvětšuje (Youngt *et al.*, 2010). Tyto folikuly jsou charakteristické vznikem *membrany granulosa, cumulu oophoru*, obklopujícího oocyt a rozdělením *theca folliculi* na vnější a vnitřní vrstvu (Eppig, 2001).

K tomu, aby mohly antrální folikuly pokračovat ve vývoji, je třeba v období puberty endokrinní stimulace v podobě folikulo-stimulačního hormonu (FSH) (Hunter *et al.*, 2004). V důsledku této stimulace dochází k jejich tzv. „cyclic recruitment“ (McGee *et al.*, 2000). Na základě této stimulace se antrální folikuly vyvinou do stádia zralosti, kdy jsou nazývány jako Graafovy folikuly. V těchto folikulech je již kolem oocytů vytvořena vrstva kumulárních buněk označovaná jako *corona radiata*. Tyto folikuly jsou také nazývány jako preovulační. V reakci na preovulační nárůst LH generují tyto folikuly signály potřebné pro vstup do fáze zrání a dokončení prvního meiotického dělení oocytů (Hunter, 2000).

Jen malá část z rostoucích folikulů je schopna dorůst do konečných rozměrů a zovulovat. Více než 99% z těchto folikulů prochází v průběhu reprodukčního života degenerativním procesem tzv. atrezií, jejímž základním mechanismem je apoptóza (Fortune, 1994). U prasat se počet rostoucích folikulů, schopných dosáhnout ovulace, pohybuje v jednom říjovém cyklu v rozmezí od 14 do 20 folikulů (Foxcroft *et al.*, 1985). Apoptotický zánik folikulů resp. granulózních buněk je možné z části ovlivnit růstovými faktory, jako jsou např. TGF- $\beta$ , které jsou produkovány buňkami *theca folliculi* (Skinner *et al.*, 1987; Tajima *et al.*, 2002).



### 3. 1. 4. Stádium zrání

Meiotické zrání oocytů je posledním krokem oogeneze, při němž oocyt získává fertilizační schopnost. Během tohoto stádia oocyt prochází změnami jak jadernými, tak cytoplazmatickými, které probíhají paralelně (Eppig, 1996).

K tomu, aby mohl oocyt podstoupit stádium zrání, musí dojít k získání již zmíněné meiotické kompetence. To probíhá ve dvou krocích, kdy rostoucí oocyty nejprve získávají schopnost podstoupit rozpad zárodečného váčku (GVBD) a posléze následuje získání schopnosti pokročit do metafáze I, vydělit 1. pólóvé tělísko a dosáhnout metafáze II (Wassarman, 1988).

U kompetentních oocytů patří k podnětům, které vyvolávají aktivaci zrání tzv. M fázi, faktor MPF (Maturation-Promoting Factor), jež je hlavním regulátorem přechodu G2/M v eukaryotických buňkách. Tento faktor má heterodimerní strukturu skládající se z cyclin-dependentní protein-kinázy p34cdc2 a cyklinu B (Nurse, 1990).

Malé nekompetentní oocyty obsahují MPF v neaktivní formě (pre-MPF) (Dunphy *et* Newport, 1989). Aktivita MPF je blokována fosforylací tyrosinu (Tyr-15) a threoninu (Thr-14) p34cdc2 kinázy. K aktivaci MPF dochází v důsledku preovulačního nárůstu LH (Strauss *et* Barbieri, 2009). K aktivaci je však také nutná přítomnost cyclin-dependentní kinázy Cdc25, která umožní odstranění inhibiční fosforylace (Gautier *et al.*, 1991).

Aktivní MPF následně aktivuje GVBD, kondenzaci chromozómů a formování dělicího vřeténka (Masui *et* Clarke, 1979). Její činnost klesá na přechodu metafáze I/anafáze I, což umožňuje pokračování meiotického dělení (Gerhart *et al.*, 1984). Tento pokles je způsoben degradací cyklinu B pomocí ubiquitin ligázy a proteasomu (Irniger, 2006).

Dalším faktorem odpovědným za aktivaci GVBD a zrání je protein-kináza MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Ye *et al.*, 2003). Aktivace MAPK je iniciována kinázou Mos prostřednictvím MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) (Tunguist *et* Maler, 2003). Aktivita MAPK zůstává vysoká po celou dobu zrání (Strauss *et* Barbieri, 2009). Její zodpovědnost spočívá v udržení kondenzace chromozómů, v potlačení S fáze mezi děleními a podílí se na udržení 2. meiotického bloku v metafázi II (Whitaker, 1996).

Protein-kináza MAPK se zdá být nezbytně nutná pro aktivaci GVBD a zrání u domácích zvířat. A to z toho důvodu, že bylo zjištěno, že inhibice MAPK brání GVBD (Whitaker, 1996). Avšak např. u myši tomu tak není, protože přítomnost MAPK pro GVBD není potřebná (Yamashita *et al.*, 2000). Nicméně, stále není jasné, kdy dochází k její aktivaci

a jakou souvislost má s MPF. U oocytů skotu je MAPK aktivována ve stejné době jako MPF, tudíž by se pravděpodobně mohla spolupodílet na aktivaci GVBD (Motlík *et al.*, 1998). Avšak u oocytů koz je MAPK aktivována až po aktivaci MPF a GVBD (Dedieu *et al.*, 1996). V oblasti studií MAPK u prasečích oocytů jsou výsledky různorodé. Inoue *et al.* (1995) ve své studii uvádí, že aktivace probíhá po aktivaci MPF a GVBD. Lee *et al.* (2000) dospěli k výsledkům, že se tak děje během GVBD a Sugiura *et al.* (2002) uvádějí aktivaci před aktivací MPF a GVBD.

K tomu, aby mohlo dojít k prolomení 1. meiotického bloku, však není dostačující jen získání meiotické kompetence s možností aktivace proteinových kináz, ale je zde důležitá i hladina cAMP (cyclic Adenosine Monophosphate). Aby mohl oocyt podstoupit zrání, musí dojít k poklesu hladiny cAMP (Tunguist *et al.*, 2003). Existuje několik cest, jak k tomu může docházet. Např. po endokrinní stimulaci LH a FSH se hladina cAMP v kumulárních buňkách přechodně zvýší, čímž dochází k expanzi kumulárních buněk a hromadění kyseliny hyaluronové (Brackett, 1985). To způsobí oddálení kumulárních buněk od oocytů a nastává narušení komunikace *gap junction*, což pak vede k snížení hladiny cAMP v oocytech (Dekel *et al.*, 1988). Jiná možná cesta je snížení oocytárního cAMP přes aktivitu cAMP-fosfodiesterázy (cAMP-PDE), která je produkována samotnými oocyty (Chaube, 2001). Aktivita této fosfodiesterázy může být regulována zvýšenou hladinou  $Ca^{2+}$  iontů (Bornslaeger *et al.*, 1984).

### **3. 1. 4. 2. Jaderné zrání**

Podstatou jaderného zrání je redukce genetické informace. Během jaderného zrání dochází k mnoha jaderným změnám v podobě GVBD, kondenzace chromozómů, vzniku dělicího vřeténka (Miyano *et al.*, 2007), oddělení homologních chromozómů v anafázi I a vydělení prvního pólového tělíska v telofázi I. Posléze pak navazuje druhé meiotické dělení, které je zastaveno v metafázi II (2. meiotický blok) (Cooper, 2000).

Zárodečný váček nezralých oocytů podléhá GVBD krátce po aktivaci MPF, kdy dochází k narušení a destrukci jaderné laminy a kondenzaci chromozómů (Strauss *et al.*, 2009). Destrukce laminy způsobí mísení nukleoplazmy s cytoplazmou (Iwashita *et al.*, 1998) a následně mizí i jádérko (Wassarman, 1988).

Schopnost aktivace GVBD v *in vitro* prostředí je u prasat možná izolací oocytů z folikulů a stimulací pomocí gonadotropních hormonů či růstových faktorů, jako je např.

EGF (Epidermal Growth Factor) (Ding *et Foxcroft*, 1994). V *in vitro* podmínkách dochází u prasečích oocytů k GVBD po 16 hodinách jejich kultivace (Brackett, 1985).

Po GVBD nastává metafáze I (Cooper, 2000). Této fáze prasečí oocyt v *in vitro* podmínkách dosáhne po 20 až 24 hodinách kultivace (Brackett, 1985). Následuje anafáze I a posléze telofáze I, při níž dochází k důležitému vydělení 1. pólového tělíska a k redukci počtu chromozómů. Hlavním rysem tohoto procesu je asymetrie, kdy má pólové tělísko mnohem menší rozměry než oocyt obsahující většinu cytoplazmy (Brunet *et Maro*, 2007).

Po vydělení pólového tělíska a vstupu do druhého meiotického dělení dochází k opětovnému nárůstu hladiny MPF. Největší nárůst je patrný v metafázi II, kdy jsou vysoké hladiny MPF zodpovědné za zastavení druhého meiotického dělení právě v metafázi II (Irniger, 2006). V udržování vysoké hladiny MPF hraje roli dostatečná syntéza cyklinu B a cytostatický faktor CSF, který má za úkol tento cyklin stabilizovat (Cooper, 2000). V *in vitro* podmínkách je u prasečích oocytů schopnost dosažení metafáze II časově variabilní, podstatné jsou zde především podmínky kultivace. V průměru dosahují prasečí oocyty metafáze II po 42 hodinách kultivace (Abeydeera *et al.*, 1998).

Protože během přechodu z metafáze I do metafáze II nepodléhá díky MAP kináze deoxyribonukleová kyselina (DNA) syntetickému procesu, nedochází tak k žádné nukleární reformaci. Obsah GV zůstává rozdělen v cytoplasmě v celém průběhu zrání (Iwashita *et al.*, 1998).

### **3. 1. 4. 3. Cytoplazmatické zrání**

Cytoplazmatické zrání je spolu s jaderným zráním důležité pro dosažení vývojové kompetence oocytů, jež je nezbytná pro jejich fertilizační schopnost a později pro jejich embryonální vývoj před implantací (Calarco, 1995).

V *in vivo* podmínkách je pro získání vývojové kompetence stěžejní komunikace oocytu s kumulárními buňkami a jejich expanze. Nepřítomnost či malý počet buněk má nepříznivý vliv na embryonální vývoj (Blondin *et Sirard*, 1995). Pokud jsou oocyty *in vitro* podmínkách kultivovány bez kumulárních buněk, může to negativně ovlivnit jejich fertilizační schopnost a další vývoj (Zhang *et al.*, 1995).

Vzhledem k tomu, že jaderné a cytoplazmatické zrání probíhá současně, změny v cytoplasmě souvisejí i se změnami v jádře. Na ultrastrukturální úrovni dochází ke změnám v dynamice cytoskeletu a endoplazmatického retikula (ER), probíhá agregace mitochondrií při

zahájení GVBD a v metafázi II (Thibault *et al.*, 1987). Dále dochází ke změnám lokalizace ER, mitochondrií, perinukleárních jednotek Golgiho komplexu či kortikálních granulí směrem k plazmatické membráně (Strauss *et Barbieri*, 2009). Zejména lokalizace kortikálních granulí je důležitá pro normální průběh oplození (Hyttel *et Madsen*, 1987), kdy po oscilaci  $Ca^{2+}$  iontů probíhá uvolnění kortikálních granulí do perivitelinního prostoru, a tím jsou navozeny změny fyzikálních a chemických vlastností zony *pellucida* (Kruip *et al.*, 1983).

Na molekulární úrovni je pak cytoplazmatické zrání doprovázeno translační aktivitou, kdy dochází k proteosyntéze např. tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA), inositol trifosfátu (IP3) a kinázy Mos, která má rozhodující vliv pro aktivaci proteinů buněčného cyklu potřebných pro jaderné zrání (Strauss *et Barbieri*, 2009).

Hodnocení cytoplazmatického zrání se provádí nepřímo a zpětně u zralého oocyty, kdy se se posuzuje normální fertilizační schopnost oocyty, následné rýhování a tvorba blastocysty. Případně mohou být hodnoceny morfologické parametry v podobě expanze kumulárních buněk, vydělení prvního pólového tělíska a průběžné zvětšování perivitelinního prostoru (Kruip *et al.*, 1983).

### **3. 1. 5. Stádium stárnutí**

Pokud dospějí oocyty do metafáze II, ať už v *in vivo* či *in vitro* podmínkách, mají jen omezenou dobu, po kterou si zachovávají si schopnost prostupnosti pro spermie, aktivace a vývojové kompetence. Tato doba se pohybuje v řádech hodin (Fissore *et al.*, 2002). Po uplynutí této doby podléhají oocyty tzv. stárnutí, při němž se snižuje jejich celková fertilizační schopnost. Stárnutí oocytů jako takové může vést k jejich partenogenetické aktivaci, apoptóze resp. fragmentaci (Miao *et al.*, 2009a) či jejich lýze (Lodish *et al.*, 2003).

V průběhu stárnutí oocytů dochází k řadě buněčných a molekulárních změn, které narušují vývojovou kompetenci oocytů, a tím i pozdější normální embryonální vývoj (Fissore *et al.*, 2002).

Oocyty jsou v metafázi II udržovány díky vysoké aktivitě MPF a MAPK. V souvislosti se stárnutím však dochází k poklesu jejich aktivity. Pokles a inaktivace MPF jsou způsobeny fosforylací p34cdc2 a degradací cyklinu B prostřednictvím ubiquitin ligázy a proteasomu. To následně vede k prolomení 2. meiotického bloku a oocyty tak mohou pokračovat v průběhu meiotického dělení a dokončit jej. (Kikuchi *et al.*, 2000). K inaktivaci a poklesu hladiny MAPK podle některých studií nedochází současně s poklesem aktivity MPF. Podle Tatemoto *et al.* (2001) dochází k její inaktivaci opožděně, a to z tohoto důvodu, že

MAPK hraje klíčovou úlohu při vydělení 2. pólového tělíska v telofázi II. Následný pokles její hladiny v oocytech může být způsoben např. PKC (Protein Kinase C) (Fan *et al.*, 2004).

Pokles MPF a MAPK pak vyvolává následné morfologické změny (Fissore *et al.*, 2002), které se týkají především narušení dynamiky cytoskeletu a MTOC resp. centrosomu, s čímž pak souvisí remodelace a prodlužování dělicího vřeténka (Miao *et al.*, 2009b). Cytoskeletární mikrotubuly a mikrofilamenta se v důsledku depolymerizace shlukují. Taktéž u mikrotubulů dělicího vřeténka dochází k destabilizaci a následně se tak mění uspořádání chromozómů (Suzuki *et al.*, 2002). Rozptýlené chromozomy se nacházejí kolem dezintegrovaného dělicího vřeténka a dochází k jejich dekonduzaci a hydrataci (Steuerwald *et al.*, 2005).

V průběhu stárnutí oocytů může docházet k agregaci a morfologickým změnám mitochondrií (Hao *et al.*, 2009). Následně pak dochází k narušení jejich membránového potenciálu a změnám v mitochondriální matrix, následkem čehož dochází k narušení syntézy ATP (Adenosine Triphosphate). Snížená syntéza ATP pak může souviset s poklesem hladiny  $Ca^{2+}$  iontů v hladkém endoplazmatickém retikulu a sníženou syntézou proteinů (Fissore *et al.*, 2002).

Změny *zony pellucidy* v průběhu stárnutí oocytů se týkají shlukování jejího granulofibrilárního materiálu. Povrch *zony pellucidy* tak mění svůj charakter a ztrácí svou flexibilitu (Miao *et al.*, 2009a).

Tím, že v průběhu stárnutí oocytů probíhá depolymerizace mikrofilament, dochází také ke strukturálním a početním změnám *mikrovilli* na povrchu plazmatické membrány (Kim *et al.*, 1996). Tyto změny pak vedou k znesnadnění počátečního kontaktu plazmatické membrány oocytů se spermii (Runge *et al.*, 2007).

Kortikální granula, která se vyskytují v korové části pod plazmatickou membránou, jsou v průběhu stárnutí oocytů lokalizována nad chromozomální oblastí. Oscilace  $Ca^{2+}$  iontů, ke které dochází, aniž by proběhlo oplození, pak vyvolává jejich částečnou exocytózu, což při případném oplození negativně ovlivní související fyzikální a chemické změny *zony pellucidy*, bránící polyspermickému oplození (Miao *et al.*, 2009a).

S oscilací  $Ca^{2+}$  iontů (Fissore *et al.*, 2002), s narušením dynamiky cytoskeletu a jeho následnou depolymerizací, pak dochází k iniciaci apoptotické fragmentace oocytů (Suzuki *et al.*, 2002). V tomto případě pokles aktivity MPF a MAPK způsobuje inaktivaci a degradaci antiapoptotických faktorů, které by případně mohly zamezit fragmentaci oocytů (Boucher *et al.*, 2000). Zároveň může tento pokles regulovat i aktivaci proapoptotických faktorů, čímž

ovlivňuje vnitřní mitochondriální dráhu apoptotické dráhy (Fissore *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2003). Pokles aktivity MAPK může být také zodpovědný za přímou aktivaci efektorové kaspázy 3 a narušení cytoplazmatické membrány, čímž je iniciován vznik apoptotických tělísek (Sakasi *et al.*, 2004).

Na stárnutí oocytů v *in vivo* či *in vitro* podmínkách může mít vliv řada faktorů včetně podmínek prostředí, interakcí oocytů s kumulárními buňkami a chemických látek. Jedním z důležitých faktorů vnějších podmínek je teplota (Miao *et al.*, 2009a). K tomu, aby došlo k zachování vývojové kompetence oocytů, je zapotřebí fyziologická teplota 39 °C. Pokud jsou např. oocyty vystaveny chladovému šoku, může dojít k aktivaci Ca<sup>2+</sup> iontů, které aktivují kaspázu 3 a dochází k fragmentaci oocytů (Barboni *et al.*, 2003). Stárnutí oocytů může být také ovlivněno výskytem reaktivních forem kyslíku tzv. ROS (Reactive Oxygen Species), kdy při jejich akumulaci dochází k urychlení tohoto stárnutí (Goud *et al.*, 2008).

Oddálení procesu stárnutí oocytů je v *in vivo* podmínkách regulováno růstovými hormony, růstovými faktory, hladinami FSH, LH či progesteronu aj. Mnohdy jsou tyto látky využívány i k ochraně oocytů a embryí v *in vitro* podmínkách (Petrová *et al.*, 2005). V souvislosti se stárnutím oocytů bylo provedeno mnoho studií, které se zaměřovaly na chemické látky, ovlivňující průběh tohoto stárnutí. Např. Goud *et al.* (2005) testoval možnosti působení oxidu dusnatého (NO) na stárnutí oocytů a zjistil, že přítomnost NO je schopna tento proces zpomalit. Předtím Kikuchi *et al.* v roce 2000 testoval působení kofeinu na stárnutí oocytů a výsledky vedly k závěru, že přítomnost kofeinu v kultivačním prostředí byla schopna stárnutí oocytů dokonce inhibovat (Kikuchi *et al.*, 2000).

## 3. 2. Apoptóza

V životním cyklu organismů je smrt jeho nedílnou součástí. Apoptotický způsob smrti je fyziologický a geneticky programovaný proces. Avšak k indukci apoptózy může přispívat velké množství exogenních či endogenních faktorů např. ionizující záření, kortikoidy, oxidativní stres, protilátky, hypoxie, deprivace růstových faktorů, hormonální dysbalance aj. (Morita *et Tilly*, 1999; Neuwirtová, 2001). Tyto faktory jsou zodpovědné za dysregulaci tohoto procesu a v této situaci se apoptóza stává dějem patologickým, jež může vést k řadě maligních, autonomních či degenerativních onemocnění (Thompson, 1995).

### 3. 2. 1. Význam apoptózy

Apoptóza hraje významnou roli v regulaci morfogeneze tkání během prenatálního a postnatálního vývoje (Andreu-Vieyra *et Habibi*, 2000). Dále se pak podílí na regulaci tkáňové homeostázy (Saran, 2000) a je součástí regulace imunitního systému (Koopman *et al.*, 1994).

Apoptóza se uplatňuje již od raného vývoje embrya, kdy je nezbytná pro vývoj tkání, orgánových soustav či např. separaci prstů končetin (Abud, 2004). V postnatálním období se apoptóza uplatňuje zejména v tkáních, ve kterých dochází k aktivní diferenciaci buněk např. intestinální, testikulární, ovariální tkáň či hemopoetický systém (Andreu-Vieyra *et Habibi*, 2000). Apoptózou tak umožňuje řadu procesů jako je remodelace kostí, involuce mléčné žlázy, atrézie folikulů, luteolýza, hematopoéza, lymfopoéza aj. (Abud, 2004).

Mechanismus regulace tkáňové homeostázy spočívá v udržování konstantního počtu buněk. To znamená, že při vzniku nových buněk jsou eliminovány buňky přebytečné a nefunkční (Koopman *et al.*, 1994). Apoptózou však mohou být eliminovány také buňky aberantní, vzniklé poškozením deoxyribonukleové kyseliny (DNA) nebo buňky infikované virovými patogeny (Jin *et El-Deiry*, 2005).

V rámci imunitního systému se apoptóza účastní selekce dozrávajících T-lymfocytů, tato selekce je zaměřena na efektivní reaktivitu těchto buněk vůči cizím antigenům, a zároveň probíhá selekce autoreaktivních klonů, jež imunitně reagují na buňky vlastního těla (Feig *et Peter*, 2007).

### 3. 2. 2. Charakteristické znaky apoptózy

Buňky, jež jsou určeny k apoptotickému způsobu smrti, podléhají charakteristickým změnám. Strukturální změny pozorovatelné v elektronovém mikroskopu můžeme rozdělit do dvou samostatných fází, kde první fáze zahrnuje tvorbu apoptotických tělísek a druhá fáze spočívá v jejich fagocytóze a degradaci (Kerr *et al.* 1972).

Morfologické změny jsou charakterizovány ztrátou buněčného objemu v důsledku dehydratace, zvýšenou denzitou cytoplasmy, shlukováním organel, kondenzací jaderného chromatinu, fragmentací DNA, zvlněním membrány, tvorbou povrchových puchýřků tzv. blebs a posléze dochází k rozpadu buňky na tzv. apoptotická tělíška (Zheng *et al.*, 1991; Tilly, 1996; Saran, 2000; Warzych *et Lechniak*, 2005). U apoptotických tělísek nedochází k porušení membránové integrity (Kerr *et al.*, 1972). Na základě toho se buněčný obsah nedostane do kontaktu s extracelulárním prostředím a nedochází tak k poškození okolních buněk a zánětlivým procesům, což je důležitým znakem odlišujícím apoptózu od nekrotického způsobu smrti (Koopman, 1994, Jin *et El-Deiry*, 2005). Dalšími podstatnými faktory, zda-li buňka zahyne apoptózou či nekrózou, jsou především typ buňky (Andreu-Vieyra *et Habibi*, 2000), energetická rovnováha a schopnost daných buněk syntetizovat novou energii v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Neprobíhá-li syntéza této energie, buňky podléhají nekrotickým změnám (Nicotera *et al.*, 1998).

K metabolickým změnám buněčné apoptózy patří např. mobilizace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (Orrenius *et al.*, 2003) či aktivace transglutaminázy, která interaguje s cytoplazmatickými proteiny. Následuje destrukce buněčného cytoskeletu, což způsobuje asymetrii cytoplazmatické membrány (Akkoyunlu *et al.*, 2007).

Následkem všech těchto změn dochází k tomu, že buňky podléhají fagocytóze a degradaci prostřednictvím makrofágů či okolních buněk (Rich *et al.*, 1999).

### 3. 2. 3. Signální dráhy apoptózy

Regulace apoptózy zahrnuje velmi složité mechanismy, které jsou geneticky kódovány na několika úrovních, kdy dochází k expresi řady genů, které kódují cytoplazmatické a membránové proteiny (Zakeri *et al.*, 1995). Apoptóza je zahájena tzv. iniciační neboli signální fází. Tato fáze je zprostředkována dvěma hlavními cestami, zahrnujícími vnější a vnitřní signální dráhu (Ashkenazi, 2002). Tyto dráhy mohou být aktivovány celou řadou exogenních či endogenních podnětů. Druhá fáze je fáze tzv. efektorová tj. ireverzibilní, při níž



jsou postupně aktivovány proteolytické enzymy, jež umožňují štěpení specifických proteinových substrátů (Scaffidy, 1998).

U savců se na molekulární úrovni v průběhu apoptózy uplatňují zejména čtyři hlavní skupiny proteinů, jež jsou zodpovědné za uskutečnění proapoptotických a antiapoptotických procesů, jsou to, proteiny TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) rodiny, adaptorové proteiny, proteiny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) rodiny a kaspázy (Guthrie *et* Garrett, 1999).

### **3. 2. 3. 1. Vnější signální dráha apoptózy**

Vnější signální dráha je zahájena aktivací buněčných membránových receptorů tzv. „receptorů smrti“. Tato aktivace je zprostředkována jejich ligandy, které fungují jako extracelulární signál. Následně je tento signál převeden do intracelulárního prostředí a dochází k aktivaci iniciačních a efektorových kaspáz (Hussein, 2005).

Smrt indukující specifické receptory patří do rodiny TNF/NGF (Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor) (Zangemeister-Wittke *et* Simon, 2001; Parrino *et al.*, 2007). Mezi hlavní zástupce můžeme zařadit TNF receptory, Fas receptory (známé také jako APO-1, Apoptosis antigen 1) a TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) receptory (Ashkenazi, 2002; Hussein, 2005). Jednotlivé signální dráhy těchto receptorů se v určitých aspektech liší, je však možné určit prvky, jež je sjednocují.

V případě, že je ligand navázán na příslušné receptory, dochází k trimerizaci těchto receptorů a jsou aktivovány jejich specifické cytoplazmatické proteiny (Nagata, 1994), jež obsahují tzv. „doménu smrti“, kterými jsou např. TRADD (TNFR typ 1 - Associated Death Domain Protein) a FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) (Huang *et al.*, 1996). Cytoplazmatické proteiny posléze interagují s adaptorovými proteiny. Tato interakce navozuje vznik signalizačního komplexu DISC (Death-Inducing Signaling Complex) a aktivaci prokaspáz, zejména prokaspázy 8 a 10 (Villa *et al.*, 1997; Warzych *et* Lechniak, 2005). V DISC komplexu se uskutečňuje dimerizace prokaspáz, což má za následek jejich aktivaci a autokatalytické uvolňování do cytoplazmy (Jin *et* Deiry, 2005). Tyto kaspázy poté způsobují aktivaci vlastních efektorových kaspáz včetně kaspázy 3, 6, 7, které posléze proteolyticky degradují specifické proteinové substráty a dochází k zániku buněk (Scaffidy, 1998; Askenazi *et* Dixit, 1998).

K substrátům efektorových kaspáz patří proteiny, které se spolupodílí na zachování genomové integrity, např. PAKs 1-3 (p21-Activated Kinases 1-3) (Bokoch, 2003) či ICAD (Inhibitor Caspase-Activated DNase) (Enari *et al.*, 1998).

Kaspázová aktivita, potažmo i apoptóza, může být inhibována např. prostřednictvím proteinů z rodiny IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein). Jedná se antiapoptotické proteiny vážící se na kaspázy 3, 7, 9. (Shi, 2002). Tyto kaspázy jsou inhibovány především hlavním zástupcem této rodiny, a to proteinem XIAP (X – linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Eckelman *et al.*, 2006). Kaspázy 3 a 7 mohou pak být inhibovány i jinými proteiny jako jsou c-IAP1, c-IAP2 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 and 2) a NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein) (Roy *et al.*, 1997). Inhibice kaspáz se však liší v závislosti typu kaspáz, zdali jsou to efektorové či iniciační kaspázy (Huang *et al.*, 2001).

Indukce apoptózy prostřednictvím receptorů smrti může pak být inhibována virovými či buněčnými proteiny tzv. FLIP proteiny (FADD-Like Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme-Inhibitory Proteins). Tyto proteiny obsahují dvě efektorové domény smrti (DED, Death Effector Domain) a vykazují podobnost s prokaspázou 8, avšak na rozdíl od ní postrádají enzymaticky aktivní místo. FLIP proteiny se váží na FADD proteiny, což má za následek inhibici vazby prokaspázy 8 a tím je znemožněna její aktivace a iniciace apoptózy (Kreuger *et al.*, 2001). Jiným stejně kompetentním inhibitorem je např. ARC protein (Apoptosis Repressor with Caspase Recruitment Domain) (Neuss *et al.*, 2001).

### **3. 2. 3. 2. Vnitřní signální dráha**

Vnitřní signální dráha může být aktivována odpovědí na extracelulární podněty v podobě již zmíněného působení oxidativního stresu či stavu deprivace růstových faktorů aj. Centrem regulace této dráhy jsou však mitochondrie. Extracelulární podněty mohou způsobit permeabilizaci vnější a vnitřní mitochondriální membrány (Parrino *et al.*, 2007) či přímé poškození DNA (Bálint *et Vousden*, 2001).

Permeabilizace mitochondriální membrány je jedním z hlavních kontrolních bodů vedoucích k apoptóze. Permeabilizace membrány je charakterizována změnami v transmembránovém potenciálu, čímž dochází k destabilizaci mitochondriální membrány a k otevření membránových pórů (Parrino *et al.*, 2007). To umožní propustnost membrány pro Ca<sup>2+</sup> ionty (Guthrie *et Garrett*, 1999) a následně jsou z intermembránového prostoru mitochondrií do cytoplazmy uvolněny proapoptotické molekuly, a to především cytochrom c (Salvesen *et Ratus* 2002). Jeho uvolnění či uvolnění dalších proteinů např. AIF (Apoptosis Inducing Factor) či endonukleáz (Uren *et al.*, 2005) je regulováno

proapoptotickými faktory, patřícími do rodiny proteinů Bcl-2 (B cell lymphoma-2) (Kluck *et al.*, 1999, Hussein, 2005).

Cytochrom c posléze tvoří za přítomnosti ATP/dATP (Adenosine Triphosphate/Deoxyadenosine Triphosphate) komplex s Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) a prokaspázou 9 tzv. apoptozóm, v němž probíhá štěpení resp. aktivace kaspázy 9 (Enari *et al.*, 1998; Denault *et Salvesen* 2002). Iniciační kaspáza 9 a Apaf-1 dále pak proteolyticky aktivují efektorové prokaspázy 3, 6, 7, které mají stejnou úlohu jako v předešlé dráze, tedy proteolyticky degradovat specifické proteinové substráty (Earnshaw *et al.*, 1999).

Společně s cytochromem c či AIF, je také z mitochondrií do cytoplazmy uvolňována i další důležitá skupina proteinů tzv. IAP antagonistů, kteří se váží na již zmíněné IAP proteiny, čímž je blokováno vazebné místo pro kaspázy, což má za následek inaktivaci těchto IAP proteinů. Zástupcem těchto antagonistů je např. protein Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI (Guo *et al.*, 2002).

V případě poškození jaderné DNA a iniciace apoptózy je hlavním regulátorem gen p53 a jeho stejnojmenný protein (Jin *et El-Deiry*, 2005). Tento protein v závislosti na poškození a typu buněk je schopen blokovat průběh buněčného cyklu, aktivuje proteiny umožňující reparaci DNA a je schopen aktivovat sekvence navozující sebedestrukci nereparabilních buněk (Bálint *et Vousden*, 2001).

### **3. 2. 4. Proteiny Bcl-2 rodiny**

Rodina Bcl-2 proteinů hraje nezbytnou roli v regulaci apoptotického procesu. Rozdílná exprese členů této rodiny a jejich vazebných proteinů umožňuje regulaci apoptózy tím, že jsou schopny reagovat na různé extra a intracelulární signály (Hockenbery *et al.*, 1990). Tyto proteiny ovlivňují permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což má za následek uvolnění dalších mediátorů apoptózy do buněčné cytoplazmy (Youle *et Strasser*, 2008), mezi které patří právě cytochrom c, IAF, endonukleázy aj. (Uren *et al.*, 2005). Na druhou stranu však mohou naopak uvolnění mediátorů zablokovat a buňka tak apoptotickému zániku nepodléhá.

Rodina Bcl-2 proteinů se skládá z nejméně 24 členů. Na základě jejich strukturních a funkčních vlastností je možné jejich rozdělení na 3 skupiny, které obsahují alespoň jednu proteinovou Bcl-2 doménu (BH) (Hsu *et Hsueh* 2000). Někteří zástupci mohou navíc obsahovat ještě transmembránovou doménu, pomocí níž mohou být lokalizovány

v intracelulárních membránách (Jin *et al.*, 2005). Detailní trojrozměrná struktura rodiny Bcl-2 proteinů má pak u většiny těchto proteinů podobu dvou centrálních převážně hydrofóbních  $\alpha$ -helix řetězců, které jsou obklopeny šesti až sedmi amfipatickými  $\alpha$ -helix řetězci různé délky (Petros *et al.*, 2004).

Tyto podskupiny zahrnují jak proapoptotické, tak antiapoptotické proteiny, přičemž je v rámci aktivace či inhibice apoptózy důležitá jejich vzájemná rovnováha.

Proteiny Bcl-2 rodiny jsou lokalizovány především v intracelulárních membránách mitochondrií, endoplazmatického retikula (ER) a jádra (Hockenbery *et al.*, 1990).

### **3. 2. 4. 1. Skupina antiapoptotických proteinů**

První skupinou jsou antiapoptotické proteiny se čtyřmi BH doménami (BH1-BH4) a většina na svém C-terminálním konci má transmembránovou doménu, která jim umožňuje integraci do intracelulárních membrán (Adams *et al.*, 1998). Do této podskupiny náleží vlastní Bcl-2 protein a jemu strukturálně podobné proteiny např. Bcl-X<sub>L</sub> (Bcl-2-related gene X), Bcl-W (Bcl-2-like protein 2), Bcl-B (Bcl-2-like protein 10) a Mcl-1 (Myeloid cell leukaemia protein 1) (Danial *et al.*, 2004). Přičemž Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W a Mcl-1 se nacházejí v určitém množství i v buněčné cytoplazmě a do mitochondriální membrány jsou translokovány až po aktivaci apoptózy.

Tyto proteiny jsou multifunkčního charakteru, prostřednictvím domén BH1 – BH4 zajišťují zprostředkování interakce s jinými proteiny Bcl-2 rodiny a molekulami lokalizovanými vně intracelulárních membrán (Hsu, Y. T. *et al.*, 1997).

Jedním z možných mechanismů, kterými tato podskupina reguluje apoptózu, je homodimerizace a heterodimerizace s proteiny ve stejné rodině (Zha, H. *et al.*, 1996a). Na povrchu antiapoptotických proteinů vytvářejí receptorové domény BH1-BH3 hydrofobní oblast, která nekovalentně interaguje s BH3 doménou proapoptotických proteinů, která slouží jako ligand (Muchmore *et al.*, 1996), čímž dochází k heterodimerizaci. Tato reakce poté brání proapoptotickým proteinům oligomerizovat ve vnější mitochondriální membráně (Gross *et al.*, 1998). Tím je znemožněno narušení mitochondriální integrity, nejsou tak otevřeny membránové póry, není možné uvolnění cytochromu c do buněčné cytoplazmy a je zabráněno průběhu apoptózy. Vzájemná interakce ale může vyvolat i opačný efekt, kdy je neutralizován účinek antiapoptotických proteinů (Bouillet *et al.*, 1999).

Na svém N-terminálním konci mají antiapoptotické proteiny BH4 doménu, která má za úkol stabilizovat BH1 – BH3 hydrofobní oblast tím, že skryje jiné hydrofobní oblasti

(Wang *et al.*, 2007). BH4 doména je považována za nezbytně nutnou pro antiapoptotickou funkci těchto proteinů, protože interaguje s Apaf-1 a brání tak aktivaci kaspáz (Hsu *et Hsueh* 2000). Inaktivace antiapoptotických proteinů může být navozena fosforylací nestrukturované smyčky mezi doménami BH3 a BH4 (Chang *et al.*, 1997), nebo také kaspázovou proteolýzou BH4 domény (Jin *et El-Deiry*, 2005).

### **3. 2. 4. 2. Skupina proapoptotických BH3-only proteinů**

Druhou skupinou rodiny Bcl-2 proteinů jsou tzv. BH3-only proteiny. Hlavními zástupci této skupiny jsou proteiny Bid (BH3-interacting domain death agonist), Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death), Bik (Bcl-2-interacting killer), Bmf (Bcl-2-modifying factor), Noxa, také známý jako PMAIP1 (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1) a Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Danial, 2007).

Struktura těchto proteinů, až na výjimku v podobě proteinu Bid, se zcela odlišuje od ostatních proteinů Bcl-2 rodiny. Jediným důležitým pojítkem je jejich jediná doména, a to doména BH3 (Hsu *et Hsueh* 2000), která jim poskytuje možnost funkce ligandů pro ostatní proteiny Bcl-2 rodiny (Kelekar *et Thompson*, 1998).

Některé z BH3-only proteinů (Bid, Bim, Puma) jsou označovány jako aktivátory permeabilizace vnější mitochondriální membrány. Pro tuto funkci je u proteinů Bim a Puma nutná oligomerizace s proapoptotickými proteiny třetí skupiny Bax (Bcl-2 associated-x) a Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) (Kim *et al.*, 2006), což vede k jejich vzájemné aktivaci (Hussein *et al.* 2003). Jakým způsobem je ale tato aktivace navozena, zatím není zcela objasněno (Mérino *et al.*, 2009). Jiné proteiny z této skupiny (Bad, Noxa, Bmf) se označují jako solubilizátory, které podporují apoptózu vazbou na antiapoptotické proteiny, čímž inhibují jejich funkci (Billen *et al.*, 2009). Pro tuto vazbu jsou většinou upřednostňovány proteiny Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> (Scorrano *et Korsmeyer*, 2003). Podle článku Guthrieho a Garretta (1999) nejsou BH3-only proteiny schopné vzájemné mezi sebou oligomerizovat. Výjimku však tvoří opět protein Bid, který v aktivované formě (tBid) vytváří homodimery (Grinberg *et al.*, 2002).

### **3. 2. 4. 2. 1. Protein Bid**

Protein Bid je strukturálně nejbližší podobný proteinu Bax (Bcl-2 associated-x) ze třetí skupiny (Billen *et al.*, 2009). Podobným rysem je i výskyt N-terminální modifikované BH4 oblasti (Kvansakul *et al.*, 2008). Tady ovšem nemá za úkol napomáhat integraci, jako je tomu u proteinu Bax, ale naopak působí inhibičně a musí být pro aktivaci odštěpena. (Billen *et al.*, 2009). Od své skupiny se protein Bid odlišuje zejména samostatnou schopností homodimerizovat a permeabilizovat vnější mitochondriální membránu (Grinberg *et al.*, 2002).

Tento protein se nachází v cytoplazmě v inaktivní formě a jeho aktivace je navozena proteolytickým štěpením kaspázou 8, kdy dochází ke vzniku aktivní redukované formy tohoto proteinu tBid (truncated-Bid) (Luo *et al.*, 1998). Aktivovaný tBid je poté schopen translokace do mitochondriální membrány a zároveň dokáže usnadnit integraci a aktivaci Bax či Bak proteinu (Billen *et al.*, 2009). Ovšem takováto interakce je vyvolána, jen pokud je tBid v monomerní podobě. Tento protein vytváří ale i mutantní trimery, které samy indukují apoptózu, aniž by k tomu potřebovaly interakci s ostatními proapoptotickými proteiny (Grinberg *et al.*, 2002).

Vzhledem k tomu, že je protein Bid interaguje s kaspázou 8, která je součástí již zmíněné vnější signální dráhy, působí tento protein jako zprostředkovatel spojení mezi vnější a vnitřní apoptotickou dráhou (Li *et al.*, 1998; Parrino *et al.*, 2007).

### **3. 2. 4. 2. 2. Protein Bim**

Protein Bim je lokalizován v mikrotubulech, kde je vázán na jejich motorový protein dynein. Aktivace proteinu Bim je závislá na jeho uvolnění z tohoto motorového proteinu (Danial, 2007) popř. na jeho snížené úrovni fosforylace (Akiyama *et al.*, 2003). Podle studie O'Connora *et al.* (1998) se ve struktuře tohoto proteinu vyskytuje také C-terminální transmembránová doména, ale její přítomnost není pro funkci proteinu Bim nezbytně nutná.

Tento protein je schopen vázat antiapoptotické proteiny i bez integrace do mitochondriální membrány (Billen *et al.*, 2009). Při navázání na mitochondriální membránu pak blíže spolupracuje s VDAC kanálem (Voltage Dependent Anion Channel) a podporuje tím tak průběh apoptózy (Sugiyama *et al.*, 2002). Exprese proteinu Bim může být ovlivňována transkripčními faktory, jako je např. faktor FOXO3 (Forkhead box protein O3), který podněcuje transkripci při deprivaci růstových faktorů (Dijkers *et al.*, 2000).

### **3. 2. 4. 2. 3. Protein Bmf**

Protein Bmf je stejně jako Bim za běžných okolností vázán na řetězce motorového proteinu dyneinu. Uvolnění a aktivace je podněcována především působením ultrafialového záření (Huang and Strasser, 2000) nebo odbouráváním extracelulární matrix (Kirkin *et al.*, 2004). Po aktivaci se opět navazuje na antipoptotické proteiny a je podněcována apoptóza. Bmf protein se nejvíce uplatňuje v apoptóze, která je indukována oddělením buněk od okolní matrix (Hausmann *et al.*, 2011).

### **3. 2. 4. 2. 4. Proteiny Bad a Bik**

Protein Bad je aktivován v důsledku nízké hladiny růstových faktorů v okolním prostředí. Při zvýšení hladiny těchto faktorů dochází k fosforylaci proteinové BH3 domény, a na takto modifikovanou doménu se navazuje protein 14-3-3, čímž je protein Bad inaktivován (Zha, J. *et al.*, 1996; Masters *et al.*, 2001). Stejně jako protein Bim může protein Bad po aktivaci interagovat s antipoptotickými faktory a podporovat tak funkci ostatních proapoptotických proteinů, aniž by muselo dojít k jeho integraci do mitochondriální membrány (Kirkin *et al.*, 2004).

Protein Bik je taktéž inhibován fosforylací a účastní se zejména apoptózy, která je vyvolána inhibicí proteosyntézy (Shimatzu *et al.*, 2007). V jeho struktuře můžeme nalézt C-terminální doménu, usnadňující integraci do mitochondriální membrány (Hsu *et Hsueh* 2000).

### **3. 2. 4. 2. 5. Proteiny Puma a Noxa**

Proteiny Puma a Noxa mohou být aktivovány přímou transkripční regulací prostřednictvím proteinu p53 (Nakano *et Vousden*, 2001). Tato aktivace odpovídá jejich proapoptotickému působení při poškození DNA. Protein Puma může být ale také aktivován i v souvislosti s deprivací růstových faktorů či jiných podnětů (Ekoff *et al.*, 2007).

### **3. 2. 4. 3. Skupina proapoptotických proteinů – multidoménové proteiny**

Třetí skupinou rodiny Bcl – 2 jsou proapoptotické proteiny zahrnující proteiny Bax (Bcl-2 associated-x), Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) a Bok (Bcl-2-related ovarian killer), jež napomáhají k aktivaci kaspázové kaskády tím, že navozují ve vnější mitochondriální membráně změny vedoucí k uvolnění cytochromu c (Cory *et Adams*, 2002).

Tyto proteiny obsahují jen tři BH domény (BH1 – BH3) a C-terminální transmembránovou doménu (Zha, H. *et al.*, 1996a; Zong *et al.*, 2003). N-terminální doména BH4 jako taková, která je nutná pro inhibici apoptózy, zde chybí (Huang *et al.*, 1998). V nedávné době však bylo zjištěno, že se na N-terminálním konci u proteinů Bax a Bak vyskytuje redefinovaná BH4 oblast (Kvansakul *et al.*, 2008). Tato oblast se však u těchto proteinů po konformačních změnách podílí na translokaci a integraci do mitochondriální membrány (Billen *et al.*, 2009).

Expresce těchto proapoptotických proteinů je rozdílná. Vyšší exprese je patrná u proteinů Bax a Bak, a to z toho důvodu, že jsou nepostradatelné pro aktivaci apoptózy buněk u převážné většiny tkání. V rámci exprese proteinu Bok nebylo zatím provedeno dostatečné množství studií (Kelly *et al.*, 2011) a ty které jsou dostupné, poukazují na expresi tohoto proteinu zejména v reprodukčních tkáních (Hsu, S. Y. *et al.*, 1997). Expresce proteinu Bax je kromě řady různých podnětů, také aktivně ovlivňována proteinem p53, což mu umožňuje účastnit se i apoptózy indukované tímto proteinem (Miyashita *et al.*, 1995). Podobně je na tom i protein Bok s tím, že je podle Yakovleva *et al.* (2004), schopen plnohodnotně nahradit funkci proteinu Bax v takto indukované apoptóze.

### **3. 2. 4. 3. 1. Protein Bak**

Bak protein je v monomerní podobě převážně volně vázán na vnější mitochondriální membránu či membránu ER. V mitochondriální membráně pak podléhá stejným změnám a interakcím jako protein Bax (Korsmeyer *et al.*, 2000). Některé studie tvrdí, že interakce s antiapoptotickými proteiny je výhradně omezená na interakci s Mcl-1 a Bcl-X<sub>L</sub> (Willis *et al.*, 2005). Oligomerizace Bak proteinu může být inhibována jak právě tvorbou heterodimerů s Mcl-1 a Bcl-X<sub>L</sub>, tak navázáním VDAC kanálu na tento protein. Tato inhibice je pak narušena v případě, že dochází k degradaci antiapoptotických členů v průběhu apoptózy, nebo se na VDAC kanál naváží proteiny BH3 poskupiny, které tento kanál inaktivují (Kim *et al.*, 2006).

Vzhledem k tomu, že jsou proteiny Bax a Bak lokalizovány i v membráně ER, účastní se pravděpodobně i udržování homeostázy Ca<sup>2+</sup>. Mohou tak hrát roli v iniciaci uvolňování Ca<sup>2+</sup> z ER, jehož vysoké hladiny způsobí permeabilizaci mitochondriální membrány (Zong *et al.*, 2003).



### **3. 2. 4. 3. 2. Protein Bok**

Bok protein se podle různých studií vyskytuje v cytoplazmě, mitochondriální či jaderné membráně. Avšak přesnou intracelulární lokalizaci tohoto proteinu je třeba nadále objasnit. V mitochondriální membráně ho čeká stejný osud jako u předchozích dvou proteinů, přičemž při heterodimerizaci s antiapoptotickými proteiny interaguje výhradně jen s proteiny Mcl-1, BHRF-1 (Bam HI fragment H rightward open reading frame 1) a A1 (Bcl-2-related protein A1) (Hsu, S. Y. *et al.*, 1997). Zároveň je také možné, že i jeho schopnost oligomerizovat s ostatními proapoptotickými proteiny je omezená výlučně jen na proteiny BH3-only skupiny. Tato BH3-only skupina pak usnadňuje jeho integraci do mitochondriální membrány, čímž vlastně tento protein aktivují (Gao *et al.*, 2005). Mnohé studie také ukázaly, že je tento protein přítomen převážně v reprodukčních tkáních včetně vaječníku, varlat a dělohy. V souvislosti s jeho distribucí a heterodimerizačními vlastnostmi, by mohli být objasněny mechanismy apoptózy v těchto tkáních (Hsu, S. Y. *et al.*, 1997).

### **3. 2. 4. 3. 3. Protein Bax**

Bax protein je převážně detekován v cytoplazmě v podobě monomeru. Po indukci apoptózy však tento protein prochází konformační změnou a probíhá jeho translokace do vnější mitochondriální membrány (Hsu, Y. T. *et al.*, 1997, Er *et al.*, 2006). Nepatrnou část Bax proteinu je však možné identifikovat v mitochondriální membráně, aniž by došlo k indukci apoptózy (Kirkin *et al.*, 2004). V membráně se Bax protein stává integrálním proteinem, kde může homodimerizovat se sebou samým v oligomery Bax/Bax, nebo může heterodimerizovat jak s ostatními proteiny této skupiny, tak i s proteiny antiapoptotickými (Korsmeyer *et al.*, 2000). Homodimerizace či heterodimerizace s ostatními proapoptotickými proteiny je nezbytná pro navození permeabilizace této membrány a pro spuštění dalších kroků vedoucích k apoptóze. Heterodimerizace s antiapoptotickými proteiny pak brání jeho oligomerizaci s proapoptotickými proteiny, čímž může být apoptóza potlačena. (Zha, H. *et al.*, 1996b).

Protein Bax hraje důležitou roli v indukci apoptózy v ovariální tkáni. Zvýšená exprese proteinu Bax byla *in vitro* i *in vivo* detekována u myšších oocytů, které podstupují přechod z fáze pachytene do fáze diplotene. Protein Bax v tomto přechodu zprostředkovává apoptózu u oocytů, u nichž vnitřní meiotické kontrolní body zaznamenaly nenormální rekombinaci DNA při crossing overu (Felici *et al.*, 1999). Zároveň Bax protein indukuje apoptózu

ve folikulárních buňkách v embryonálním a postnatálním období, čímž ovlivňuje celkový počet ovulovaných oocytů (Greenfeld *et al.*, 2007). Narušení genu *bax* či jeho exprese vede k rozvoji patologických folikulů, které obsahují oocyty neschopné oplození (Tilly, 1996).

### 3. 3. Sulfan

Sulfan ( $\text{H}_2\text{S}$ , Hydrogen Sulfide) je bezbarvý, hořlavý plyn s nepříjemným charakteristickým zápachem (Szabó, 2007). Toxicita tohoto plynu se projevuje postižením očních sliznic, respiračního a centrálního systému, kdy může docházet až k edému plic či respirační paralýze (WHO, 2003).

Sulfan může vznikat exogenní cestou přirozeně či v důsledku lidské činnosti (Steuder *et Peterson*, 1984). Přírodní zdroje tvoří 90 % z celkového množství emisí  $\text{H}_2\text{S}$  v atmosféře. Koncentrace  $\text{H}_2\text{S}$  v ovzduší z těchto zdrojů se odhaduje na hodnotu 0,14 – 0,4  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (WHO, 2003).

Podstatným a stěžejním zjištěním bylo, že produkce  $\text{H}_2\text{S}$  je možná i endogenní cestou. Tato cesta spočívá ve vzniku sulfanu jakožto produktu savčího metabolismu (Szabó, 2007). V metabolismu  $\text{H}_2\text{S}$  funguje jako důležitá signální molekula, spolu s dalšími dvěma v současné době známými plynnými mediátory, nazývanými gasotransmitery, oxidem dusnatým (NO) a oxidem uhelnatým (CO) (Mancardi *et al.*, 2009). Poprvé byla endogenní produkce  $\text{H}_2\text{S}$  popsána v roce 1982, a to Stipanukem a Beckem v jaterní tkáni (Stipanuk *et Beck*, 1982).

Stejně jako NO a CO, se  $\text{H}_2\text{S}$  v organismu v plynném skupenství nevyskytuje. Ve vodě a krevní plazmě se  $\text{H}_2\text{S}$  nachází v podobě slabé kyseliny disociující na kation  $\text{H}^+$  a hydrosulfidový anion  $\text{HS}^-$ , který se pak dále disociuje při vyšším pH na  $\text{H}^+$  a  $\text{S}^{2-}$  (Webb, 2007). Sulfidový anion za fyziologických podmínek v organismu, tj. pH kolem 7,4 prakticky není přítomen (Caliendo *et al.*, 2010).

Ačkoli je  $\text{H}_2\text{S}$  ve vodném roztoku rozpustný, přibližně jedna třetina zůstává v roztoku při pH 7,4 v nedisociované formě. V lipofilním prostředí je však jeho rozpustnost až pětkrát vyšší (Wang, 2002), jako je tomu i u NO a CO. Tato schopnost umožňuje prostup plazmatickou membránou, avšak z důvodu částečné disociace je jeho permeabilita vzhledem k NO a CO o něco nižší (Stárka, 2009).

Fyziologická koncentrace  $\text{H}_2\text{S}$  v krevním séru a plazmě je závislá na druhové příslušnosti. U potkanů se hodnoty  $\text{H}_2\text{S}$  v krevním séru pohybují v rozmezí 30 – 51  $\mu\text{M}$ , u myši jsou to hodnoty mezi 11 - 35  $\mu\text{M}$  a v lidském séru mezi 36 - 42  $\mu\text{M}$  (Zhi *et al.*, 2007). Plazmatické hodnoty se u potkanů pohybují kolem 10  $\mu\text{M}$ , a u člověka se uvádějí hodnoty od 10 – 100  $\mu\text{M}$ . (Elseley *et al.*, 2010).

Nedávné studie potvrdily, že endogenní produkce H<sub>2</sub>S hraje důležitou roli v mnoha fyziologických i patologických procesech. Sulfan je schopen ovlivnit kontraktilitu cév či modulovat procesy v nervové tkáni (Zhi *et al.*, 2007). Kromě toho může ovlivnit kontraktilitu střev (Teague *et al.*, 2002), meiotické zrání oocytů (Rong *et al.*, 2007), vykazuje pro- (Li *et al.*, 2009) i antiapoptotické účinky (Wagner, 2009), nebo se uplatňuje v pro- i protizánětlivých reakcích či jako cytoprotektivum při ochraně buněk před oxidativním stresem (Kimura, 2011).

### 3. 3. 1. Biosyntéza sulfanu v organismu

Endogenní syntéza H<sub>2</sub>S v organismu je umožněna prostřednictvím enzymatických a neenzymatických reakcí. Primárně je sulfan syntetizován ze sirné aminokyseliny L-cysteinu pomocí dvou enzymů cystathionin- $\gamma$ -lyázy (CSE) a cystathionin- $\beta$ -syntázy (CBS) (Chen *et al.*, 2004). V nedávné době byly objeveny další možné enzymy podílející se na endogenní produkci H<sub>2</sub>S, k nimž patří 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MST), jejímž substrátem je 3-merkaptopyruvát, a dále pak cystein aminotransferáza (CAT), jejímž substrátem je L-cystein (Kimura, 2010).

Sulfan může vznikat i cestou konverze z polysulfidů v erythrocytech, za předpokladu že je v cytosolu přítomna aktivní (oxidovaná) forma glutathionu (Lefer, 2007), jejíž aktivace či inaktivace je závislá na schopnosti glutathionu reagovat s proteiny a na degradaci thiolových protonů (z L-cysteinu) v těsné blízkosti membrány těchto erythrocytů (Wagner, 2009).

Další možnost, která vede k uvolnění H<sub>2</sub>S, je zastoupena desulfohydratační reakcí, kdy dochází k odstranění atomu síry z L-cysteinu bez jeho oxidace, přičemž může být tato reakce katalyzována i CBS a CSE (Levonen *et al.*, 2000).

Cystathionin- $\beta$ -syntáza (CBS) a cystathionin- $\gamma$ -lyáza (CSE) jsou enzymy závislé na pyridoxal - 5'-fosfátu (PLP) (Stipanuk *et Beck*, 1982) a jejich exprese vykazuje tkáňovou specifitu (Zhao *et al.*, 2001). Rozdíly mezi nimi jsou závislé na jejich mechanismu působení (Caliendo *et al.*, 2010) a jejich vlastní syntéza je uskutečňována zejména v cytoplazmě (Kamoun, 2004). V některých tkáních jsou pro syntézu H<sub>2</sub>S nezbytné oba dva enzymy, zatímco v jiných tkáních postačuje pro tuto syntézu jen jeden z těchto enzymů (Wang, 2002). Cystathionin- $\beta$ -syntáza je hlavním enzymem, který se podílí na tvorbě H<sub>2</sub>S v centrálním

nervovém systému, kdežto v kardiovaskulárním systému tuto funkci zaujímá CSE (Moore *et al.*, 2003).

Cystathionin- $\beta$ -syntáza (CBS) je hlavní enzym kontrolující metabolismus methioninu (Webb, 2007). Obecně katalyzuje substituční reakce mezi L-serinem, L-cysteinem, thioetery cysteinu a dalšími  $\beta$ -substituovanými L-aminokyselinami a některými merkaptany (Braunstein *et al.*, 1971). K produkci sulfanu pak dochází při kondenzaci homocysteinu s cysteinem za vzniku cystathionu (Szabó, 2007). Cystathionin- $\beta$ -syntáza je multidoméno­vý enzym složený z N-terminální enzymatické domény a dvou CBS domén (Meier *et al.*, 2001) tj. je to tetramer obsahující 551 aminokyselin, hem a již zmíněný kofaktor PLP (Banerjee *et Zou*, 2005). Podjednotky vytváří vazbu se substráty v podobě homocysteinu a serinu (Patel *et al.*, 2009). Při narušení činnosti CBS popř. genovém knockoutu nedochází k odbourání homocysteinu na cystein a následná kumulace tohoto intermediátu v organismu působí cytotoxicky (Rong *et al.*, 2007).

Cystathionin- $\gamma$ -lyáza (CSE), také známý jako cystathionáza (CTH), je enzym, který štěpí cystathionin na cystein, ale je také schopen katalyzovat degradační reakce L-homoserinu, L-cystinu a L-cysteinu (Stárka, 2009), kdy vzniká např.  $\alpha$ -ketobuty­rát, thiocystein, pyruvát a amoniak (Galiendo *et al.*, 2010). Thiocystein pak může reagovat s cysteinem nebo jinými thioly za vzniku  $H_2S$  (Szabó, 2007). Cystathionin- $\gamma$ -lyáza je protein složený ze 405 aminokyselin, jedná se o tetramer tvořený dvěma homodimery (Braunstein *et al.*, 1971). Narušení funkce CSE či knockout jejího genu ale na rozdíl od CBS na buněčné struktury toxicky nepůsobí (Galiendo *et al.*, 2010).

Činnost těchto enzymů může být regulována např. hormonální hladinou, signálními molekulami NO, CO a cAMP (Szabó, 2007), dále pak „kosubstráty“ (Abe *et Kimura*, 1996) či dokonce bakteriálními toxiny. Na hormonální regulaci CSE a CBS se podílejí např. glukokortikoidy ((Łowicka *et Bełtowski*, 2007). Z řady „kosubstrátů“ patří k inhibitorům CBS např. hydroxylamin a amino-oxyacetát. A k aktivátorům můžeme zařadit S-adenosyl-L-methionin (Abe *et Kimura*, 1996).

### **3. 3. 2. Katabolismus sulfanu v organismu**

Sulfan je v organismu metabolizován prostřednictvím oxidačního procesu, který probíhá převážně v mitochondriích, kde je  $H_2S$  oxidován nejprve na thiosulfát a následně na sulfit a sulfát (Caliendo *et al.*, 2010). Při oxidaci na thiosulfát není zapotřebí přítomnost

enzymů, avšak aby mohla být uskutečněna, je nutná přítomnost glutathionu (Stárka, 2009). Při konverzi thiosulfátu na sulfit či sulfát je již nutný enzym thiosulfát-kyanid sulfurtransferáza, který umožní rychlou oxidaci i sulfitu na sulfát a ten je za fyziologických podmínek hlavním konečným produktem metabolismu  $H_2S$ . Nicméně thiosulfát detekovaný v moči je považován za nespecifický marker produkce  $H_2S$  v celém těle (Belardinelli *et al.*, 2002).

Další možnou cestou katabolismu  $H_2S$  představuje metylace, která je zprostředkována thiol-S-methyltransferázou. Tato reakce probíhá zejména v cytoplasmě, kde je  $H_2S$  konvertován na méně toxické látky jako je methylmerkaptan a dimethylsulfát (Picton *et al.*, 2002). Tyto metabolity jsou do 24 hodin vyloučeny ledvinami, gastrointestinálním traktem či plícemi. Na základě toho se endogenně produkovaný  $H_2S$  neakumuluje v organismu v takové množství, která by mohla být pro buňky toxická (Stárka, 2009).

V neposlední řadě je tu možnost eliminace sulfanu prostřednictvím vazby na hemoglobin za vzniku sulfhemoglobinu (Triapirux *et al.*, 2008).

### 3. 3. 3. Vliv sulfanu na kardiovaskulární systém

Jak už bylo zmíněno, předním enzymem podílejícím se na syntéze  $H_2S$  v kardiovaskulárním systému je enzym CSE (Szabo *et al.*, 2011). Produkce  $H_2S$  resp. katalyzující činnost CSE je stimulována formací kalmodulin inositol -1, 4, 5- trisfosfát (IP<sub>3</sub>), která navozuje zvýšení intracelulárního  $Ca^{2+}$  (Wagner, 2009). Jiná možnost stimulace pak zahrnuje působení vasorelaxačního neurotransmiteru acetylcholinu (Szabo *et al.*, 2011).

Endogenní produkce  $H_2S$  byla řadou studií potvrzena v myokardu, aortálních, pulmonálních, mezenterických arteriích, dále pak v *arteria mammaria*, *vena saphena magna* a *arteria coronaria* (Bhatia, 2005). V těchto cévách byl  $H_2S$  ve vysokých koncentracích pozorován v zejména endoteliových buňkách (Wagner, 2009), kde sulfan svými účinky neovlivňuje funkci těchto buněk, ale působí na vaskulární hladkosvalové buňky (Łowicka *et Beltowski*, 2007).

Přítomnost  $H_2S$  v kardiovaskulárním systému navozuje relaxaci cévní hladké svaloviny a to tím, že aktivuje ATP-dependentní  $K^+$  kanály ( $K^+ATP$ ) (Chen *et al.*, 2007; Kreuger *et al.*, 2010). K aktivaci  $K^+ATP$  kanálů může dojít prostřednictvím poklesu intracelulární koncentrace ATP, který je způsoben inhibicí cytochrom oxidázy (Zhao *et al.*, 2001). Otevřením  $K^+ATP$  kanálů buněk hladkého svalstva dochází k hyperpolarizaci membrány, a tím sulfan omezuje vstup  $Ca^{2+}$  iontů a dochází k relaxaci (Stárka, 2009).

Vasorelaxace cév může ovlivněna i jinými faktory např. NO a CO, jejichž mechanismus spočívá v zapojení cGMP (cyclic Guanosine Monophosphate) signalizační dráhy (Zhao *et al.*, 2001). Sulfan je však schopen synergicky působit s NO, čímž může zvýšit jeho vasorelaxační účinek (Kimura, 2010). Avšak Ali *et al.* (2006) ve své práci uvádí, že H<sub>2</sub>S umožňuje i inaktivaci NO, kdy při jejich interakci vzniká nitrosothiol, který již není vasoaktivní.

Sulfan je schopen i inhibice proliferační schopnosti a apoptózy hladkosvalových buněk prostřednictvím mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a kinázy 3 (Li *et al.*, 2011). Všechny uvedené funkce H<sub>2</sub>S jsou pak důležité pro regulaci krevního tlaku a remodelaci cév (Chen *et al.*, 2007).

Studie Szabó *et al.* (2011) pak poukazuje na další účinky H<sub>2</sub>S, které se týkají kardioprotekce. Kardioprotektivní působení H<sub>2</sub>S je rozličné a zahrnuje aktivaci K<sup>+</sup>ATP kanálů, regulaci mitochondriální respirace a regulaci cytoprotektivních genů. Kardioprotektivní účinky H<sub>2</sub>S je možné využívat k terapeutickým účelům při ischemické chorobě srdeční, septickém šoku či endotoxemii (Chen *et al.*, 2007).

### **3. 3. 4. Vliv sulfanu na centrální nervový systém**

V centrálním nervovém systému (CNS) je produkce sulfanu řízena především enzymem CBS (Austgen *et al.*, 2011).

Syntéza sulfanu v centrálním nervovém systému je navozena reakcí na nervové podráždění. Tato reakce je závislá na aktivaci dráhy Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin, konkrétně na transportu Ca<sup>2+</sup> přes NMDA receptory (N-Methyl-D-aspartate receptors). Aktivace této dráhy poté vyvolává syntézu CBS a CSE, a tím i produkci H<sub>2</sub>S (Kimura, 2010).

Produkce sulfanu v centrálním nervovém systému byla poprvé prokázána koncem 80. let (Warenycia, 1989). Od té doby byla prováděna řada studií zabývajících se produkcí sulfanu a intenzitou exprese CBS v různých částech mozkové tkáně. Přítomnost CBS byla zjištěna v hipokampu, mozečku, mozkové kůře či mozkovém kmeni (Awata *et al.*, 1995). V rámci studie Abe *et al.* (1996) byly vysoké koncentrace sulfanu prokázány především v hipokampu a mozkové kůře. Podle práce Łowicka *et al.* (2007) se pak nejvyšší koncentrace H<sub>2</sub>S nacházejí v tkáni mozečku.

V centrálním nervovém systému je H<sub>2</sub>S schopen zaujímat funkci neuromodulátoru či intracelulárního posla (Abe *et al.*, 1996). Neuromodulační schopnosti spočívají ve zvyšování aktivity N-metyl-D-aspartát receptorů (NMDA) a usnadnění navození dlouhodobé

potenciace, sloužící jako synaptický model paměti a učení (Kimura, 2010). Řízení tohoto procesu spočívá v selektivním zvyšování odpovědi NMDA receptorů v neuronech na neurotransmitter glutamát (Abe *et al.*, 1996) nebo je sulfan schopen vyvolat  $\text{Ca}^{2+}$  vlny v astrocytech (Nagai *et al.*, 2004). Tan *et al.*, 2009 ve své studii uvádějí, že k tomu aby se uskutečnilo vyplavení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, musí dojít k aktivaci cAMP/PKA (cyclic Adenosine Monophosphate/Protein-kinase A) dráhy, která podporuje stimulaci NMDA receptorů.

Kromě neuromodulace je schopen  $\text{H}_2\text{S}$  i v CNS působit protektivně, kdy chrání buňky před oxidativním stresem (Chen *et al.*, 2007). Podle Whitemana, *et al.* (2004) může být sulfan přímo zodpovědný za redukci volného radikálu peroxynitritu. Dále byl prokázán ochranný vliv sulfanu na CNS prostřednictvím aktivace  $\text{Cl}^-$  iontů a  $\text{K}^+$ ATP kanálů, které stabilizují membránové potenciály a chrání před exocytotoxickým působením (Kimura, 2010).

Sulfan je také zkoumán v souvislosti s řadou onemocnění týkajících se nervového systému, kdy dochází ke snížené či zvýšené expresi CBS, a tím je ovlivněna i syntéza  $\text{H}_2\text{S}$ . Snížená syntéza sulfanu byla pozorována v mozkové tkáni u lidí trpících Alzheimerovou chorobou (Eto *et al.*, 2002) a naopak zvýšená syntéza sulfanu se objevuje v případě Downova syndromu tzv. trisomie 21. chromosomu, jež patří ke genomovým mutacím (Kamoun, 2004).

### **3. 4. 5. Vliv sulfanu na samičí a samčí reprodukční systém**

V reprodukčním systému samic se může endogenně produkováný  $\text{H}_2\text{S}$  podílet např. na regulaci oogeneze, folikulogeneze, říjového cyklu a gravidity. V *in vitro* podmínkách byla zjištěna produkce  $\text{H}_2\text{S}$  v gestační tkáni včetně gravidní i negravidní dělohy, ovarií, pochvy, placenty, plodových obalů, a to jak u lidí, tak i u potkanů (Patel *et al.*, 2009). Výsledky některých studií poukázaly na to, že u krys je  $\text{H}_2\text{S}$  schopen inhibovat kontrakce dělohy (Carson *et al.*, 2010), tím že ovlivňuje citlivost dělohy na oxytocin (Hayden *et al.*, 1989).

V ovariální tkáni je především distribuován enzym CBS. Nejvyšší koncentrace tohoto enzymu byly detekovány v buňkách *membrana granulosa*. Detekován byl ve všech fázích folikulogeneze, ale výrazně vysoké množství bylo zjištěno v pozdních antrálních folikulech, a to ve folikulárních buňkách v blízkosti antra a v buňkách *corona radiata*, které obklopují oocyt. Avšak v oocytech přítomnost tohoto enzymu zatím prokázána nebyla. Enzym CBS zaujímá funkci prostředníka v interakci mezi oocyty a buňkami *membrana granulosa* (Rong *et al.*, 2006). V roce 2007 zjistil Rong *et al.*, že na základě toho je CBS při oogenezi schopna nepřímo se podílet na zrání oocytů, především jako důležitý zprostředkovatel procesu rozpadu zárodečného váčku (Rong *et al.*, 2007).



Narušení funkce CBS může vést k hyperhomocysteinémii, což je onemocnění způsobené kumulací intermediátu homocysteinu. Tato kumulace, stejně jako nízká koncentrace methioninu, může ovlivnit kvalitu či interferenci oocyty při oogenezi (Steegers-Theunissen *et al.*, 1993). Jiné možné cytotoxické dopady kumulace homocysteinu spočívají např. v ovlivnění velikosti vrhu, implantace embrya, ve vzniku *abrupto placentae*, abortů či kongenitálních defektů fétu (Rong *et al.*, 2007).

Při studiích genového knockoutu u myši, bylo prokázáno, že CSE-knockout nenarušuje reprodukci, ani průběh gravidity (Yang *et al.*, 2008), avšak CBS-knockout zapříčiňuje u samic sníženou plodnost (Wanatabe *et al.*, 1995).

U samců může mít endogenně produkovaný H<sub>2</sub>S v reprodukčním systému potencionální roli v podpoře erekce či v ovlivnění funkce varlat (Zhu *et al.*, 2011).

Enzymy důležité pro jeho syntézu byly zjištěny v testikulární tkáni krysa (Sugiura *et al.*, 2005), kde byl enzym CSE detekován v Sertoliho buňkách, ale také v buňkách zárodečných, zahrnujících spermatogonie. Enzym CBS pak byl u těchto zvířat detekován jak v Sertoliho buňkách, spermatogoniích, tak navíc i v Leydigových buňkách (Oi *et al.*, 2001). U člověka byl enzym CSE v reprodukčním systému nalezen v trabekulární svalové tkáni, hladkých svalech cév a periferních nervech. A enzym CBS byl detekován především v trabekulární svalové tkáni (Zhu *et al.*, 2011).

V roce 2006, studie Srilathy *et al.*, jako první prokázala, že po aplikaci intrakavernózní injekce donoru sulfanu hydrogensulfidu sodného (NaHS, Sodium Hydrosulfide) dochází u primátů ke zlepšení prokrvení *corpora cavernosa* resp. ke zvýšení intrakavernózního tlaku. Tato proerectilní funkce NaHS byla později potvrzena při studii *corpora cavernosa* králíků (Srilatha *et al.*, 2007).

To, že by sulfan mohl hrát roli i v regulaci funkce varlat, bylo podníceno experimenty se směsí těkavých sloučenin obsahujících síru tzv. DADS (Diallyl Disulfide), které jsou obsaženy v česneku (*Allium sativum*). Při těchto experimentech byl pozorován pozitivní vliv této směsi na zvýšení produkce testosteronu u krysa v testikulární tkáni, kde je tato směs schopna ovlivnit vylučování luteinizačního hormonu z hypofýzy (Oi *et al.*, 2001).

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4. 1. Získávání a selekce oocytů pro experimentální účely**

Pro experimenty této diplomové práce jsme použili oocyty odebrané z ovariálních folikulů prasnic, které byly poraženy v různém stádiu pohlavního cyklu. Poté, co byla ovaria odebrána, byla ihned transportována v termoskách, obsahujících fyziologický roztok (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C, do laboratoře KVD. Z ovaríí byly oocyty získávány aspirací folikulární tekutiny pomocí jehly 20G (Sterican, Braun Melsungen, Německo). Poté byly oocyty z folikulární tekutiny odsávány prostřednictvím tenké skleněné kapiláry pod binokulární lupou. V této fázi byla prováděna selekce oocytů zaměřená na celistvost jejich cytoplazmy a kompaktnost obalu kumulárních buněk.

### **4. 2. Postup kultivace oocytů**

Před umístěním do kultivačních podmínek byly oocyty třikrát za sebou promývány v modifikovaném kultivačním médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Médium obsahovalo 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, Germany, Lot No. 40F2190F) a 13, 5 IU eCG: 6,6 hCG/ml (P.G. 600, Intervet, Boxmeer, Holand). Po promytí byla provedena vlastní kultivace, kdy byly oocyty kultivovány v Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Denmark) ve 3ml kultivačního média při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO<sub>2</sub> se vzduchem po dobu 48 hodin do stádia metafáze 2. meiotického dělení.

### **4. 3. Postup prodloužené kultivace oocytů**

Oocyty, které dosáhly metafáze 2. meiotického dělení, byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk pomocí tenkostěnné skleněné pipety. Následně byly oocyty dále kultivovány po dobu 1, 2 a 3 dnů v modifikovaném médiu M199 bez přísady P. G. 600. Kultivace oocytů probíhala v Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Denmark) ve 3ml kultivačního média při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO<sub>2</sub> se vzduchem.

#### **4. 4. Posouzení a vyhodnocení kultivace oocytů**

Ke zhodnocení průběhu meiotického zrání oocytů byla část oocytů zbavena kumulárních buněk a fixována v roztoku ethanol : kyselina octová (3 : 1). Fixace probíhala 48 hodin. Poté byly fixované preparáty barveny 1 % roztokem orceinu a následně byly oocyty posuzovány pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Pro hodnocení experimentů byly použity jen ty skupiny oocytů, u kterých dosáhlo více než 85 % oocytů metafáze 2. meiotického dělení po 48 hodinách kultivace.

#### **4. 5. Postup lokalizace proapoptotického faktoru Bax a enzymů, katalyzujících syntézu sulfanu v oocytech**

Po ukončení příslušné doby prodloužené kultivace byla z oocytů odstraněna *zona pellucida*, k čemuž bylo použito médium M199 s přídavkem 0,1 % pronázy. Následně byly oocyty omyty ve třech kapkách 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin) v PBS a fixovány v 2,5 % (w/v) paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě 39 °C. Po uplynutí 30 minut byl fixační roztok vyměněn a fixace probíhala dalších 30 minut. Takto fixované oocyty byly ošetřeny 0,5 % (v/v) Tritonem X-100 v PBS při laboratorní teplotě, který byl několikrát vyměněn. Po uplynutí 2 hodin byly oocyty omyty v 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS. Posléze byly oocyty inkubovány přes noc ve vlhkém prostředí za teplotních podmínek 4 °C, a to v inkubačním médiu (0,1 % (w/v) BSA a 0,01 % (v/v) Tween 20 v PBS s primární protilátkou specifickou pro daný enzym (anti-3MST, anti-CBS, anti-CSE; Sigma-Aldrich) nebo pro proapoptotický faktor Bax (Sigma-Aldrich), ředěnou v poměru 1 : 100. Následně byly oocyty třikrát promývány po 10 minutách v roztoku 0,1 % (v/v) Tween 20 v PBS při laboratorní teplotě. Protilátky, u kterých nedošlo ke specifickému navázání, byly promýváním oocytů odstraněny. Dále byly oocyty inkubovány po dobu jedné hodiny bez přístupu světla spolu s příslušnými sekundárními protilátkami anti-králičí nebo anti-myší IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC; Jackson ImmunoResearch). Po této inkubaci byly oocyty třikrát promyty v roztoku 0,1 % (v/v) Tween 20 v PBS a po dobu 10 minut byly ponechány v roztoku 0,1 % (w/v) BSA v PBS. Aby došlo k vizualizaci chromatinu, musely být oocyty inkubovány po dobu 15 minut v barvivu Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Po inkubaci byly oocyty omyty v ekvilibračním pufru a přeneseny v kapce glycerolu s PBS na podložní sklíčko. Takto připravené preparáty byly snímány při zvětšení

400x na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu (Leica SPE, Německo). Pro kvantitativní zhodnocení intenzity signálu a lokalizace bylo použito analýzy obrazu NIS Elements 2.30.

#### **4. 6. Statistická analýza**

Každý experiment byl minimálně 3x opakován. Výsledky experimentů, týkající se proapoptického faktoru Bax, byly statisticky analyzovány. Ke zhodnocení statisticky významných rozdílů byla použita metoda analýzy rozptylu ANOVA a dvouvýběrový t-test v programu STATISTICA 9.0. Za statisticky významný rozdíl byla brána hodnota P menší než 0,05.

#### **4. 7. Experimentální schéma**

K jednotlivým experimentům byla provedena kontrola zrání oocytů. Pro konečné hodnocení byly použity pouze ty výsledky experimentů, ve kterých více než 85 % oocytů dosáhlo metafáze 2. meiotického dělení po 48 hodinách kultivace.

Ke každému experimentu byla vždy prováděna negativní kontrola. Kontrolní skupiny oocytů byly inkubovány pouze se sekundárními protilátkami k vyloučení jejich nespecifické vazby v oocytech. Pro hodnocení byly použity experimenty, kde nebyl detekován žádný signál v negativní kontrole.

#### **Experiment 1: Detekce a intracelulární lokalizace enzymů, katalyzujících endogenní syntézu sulfanu, během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

Tento experiment sloužil k prokázání přítomnosti enzymů, zodpovědných za endogenní produkci  $H_2S$ , 3-merkaptopyruvat sulfurtransferázy (3-MST), cystathionin- $\gamma$ -lyázy (CSE) a cystathionin- $\beta$ -syntázy (CBS). Expres těchto enzymů a jejich intracelulární lokalizace byla sledována u oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení a u oocytů, které byly vystaveny prodloužené kultivaci po dobu 1, 2 a 3 dnů. Kultivace těchto oocytů probíhala v čistém modifikovaném médiu M199. Po uplynutí příslušné doby kultivace byly enzymy lokalizovány imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metodika 4. 5.).

## **Experiment 2: Detekce a intracelulární lokalizace proapoptického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

Tento experiment sloužil k prokázání, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů dochází k expresi proapoptického faktoru Bax. Přítomnost tohoto faktoru byla sledována u kontrolních skupin oocytů, dosahujících metafáze 2. meiotického dělení a dále u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 1, 2 a 3 dnů. Kultivace oocytů probíhala v čistém modifikovaném médiu M199. Po uplynutí příslušné doby kultivace byl faktor Bax lokalizován imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metodika 4. 5.).

## **Experiment 3: Vliv donoru sulfanu Na<sub>2</sub>S na expresi a intracelulární lokalizaci proapoptického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

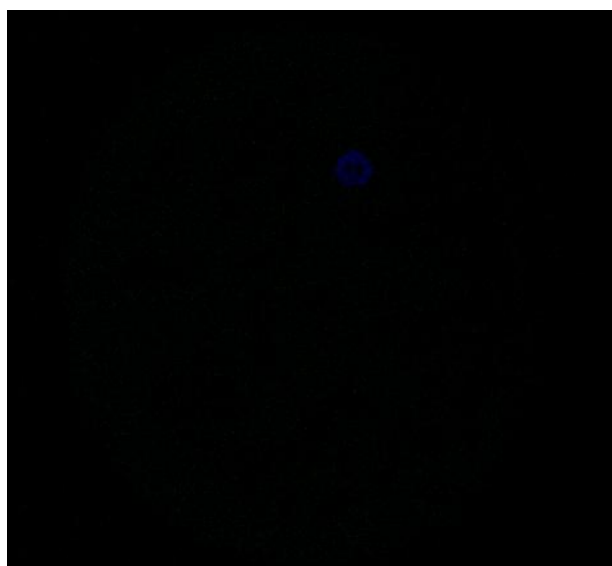
Tento experiment sloužil k prokázání, že je donor sulfanu Na<sub>2</sub>S schopen v průběhu stárnutí prasečích oocytů ovlivnit expresi a intracelulární lokalizaci proapoptického faktoru Bax. Vliv tohoto donoru na expresi a intracelulární lokalizaci faktoru Bax byl sledován u oocytů, vystavených prodloužené kultivaci po dobu 1, 2 a 3 dnů. Oocyty byly nejprve kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu M199 do stádia metafáze 2. meiotického dělení. Následně byly tyto oocyty zbaveny kumulárních buněk a kultivovány po dobu 1, 2 a 3 dnů v modifikovaném kultivačním médiu M199, obohaceném o donor sulfanu Na<sub>2</sub>S v koncentraci 300 μM. Po uplynutí příslušné doby kultivace byla u těchto oocytů sledována lokalizace proapoptického faktoru Bax pomocí imunocytochemické metody (viz metodika podkapitola 4. 5.). Po vyhodnocení byly výsledky lokalizace u těchto oocytů porovnány s výsledky lokalizace proapoptického faktoru Bax u oocytů, hodnocených v předchozím experimentu.

## 5. VÝSLEDKY

### **Experiment 1: Detekce a intracelulární lokalizace enzymů, katalyzujících endogenní syntézu sulfanu, během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy v kontrolní skupině byly oocyty inkubovány pouze se specifickou sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC. Tato kontrola sloužila k vyloučení její nespecifické vazby v oocytech. Do konečného hodnocení byly zahrnuty jen ty experimentální skupiny oocytů, u jejichž negativní kontroly nebyl detekován žádný signál. Příklad negativní kontroly znázorněn na obrázku č. 1

*Obr. č. 1. Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*

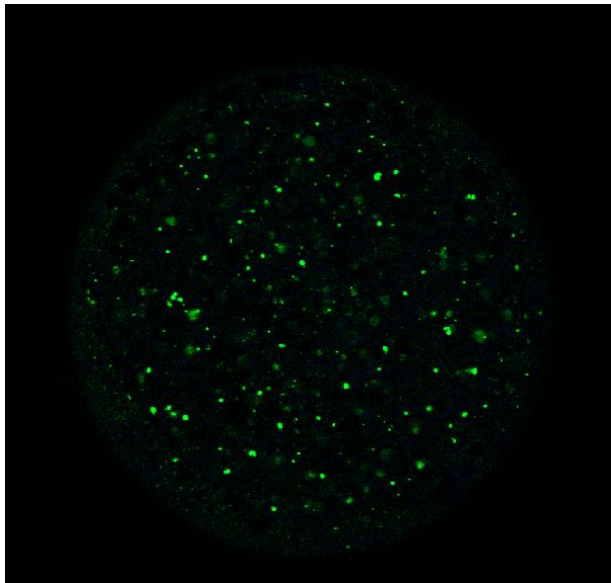


### Detekce a intracelulární lokalizace enzymu 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (3-MST) během prodloužené kultivace prasečích oocytů

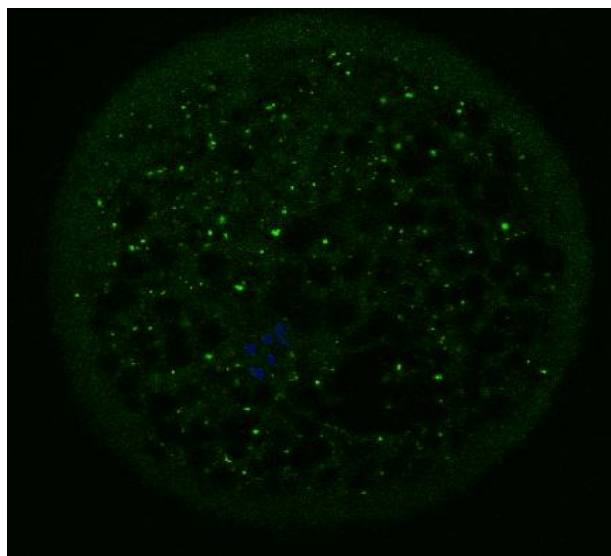
Přítomnost 3-MST byla prokázána v oocytech ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII) a dále pak v oocytech, vystavených 1, 2 a 3 dnům prodloužené kultivace. Při hodnocení lokalizace byla ložiska tohoto enzymu u všech hodnocených skupin oocytů detekována v oblasti jádra (u oocytů v MII fázi oblast dělicího vřeténka a chromatinu, u

aktivovaných oocytů – oblast prvojádra), v korové oblasti a v cytoplazmě. Signál 3-MST se v oocytech průběhu jednotlivých dnů prodloužené kultivace neměnil. Výsledky detekce a lokalizace 3-MST jsou znázorněny na obr. č. 2 – 5.

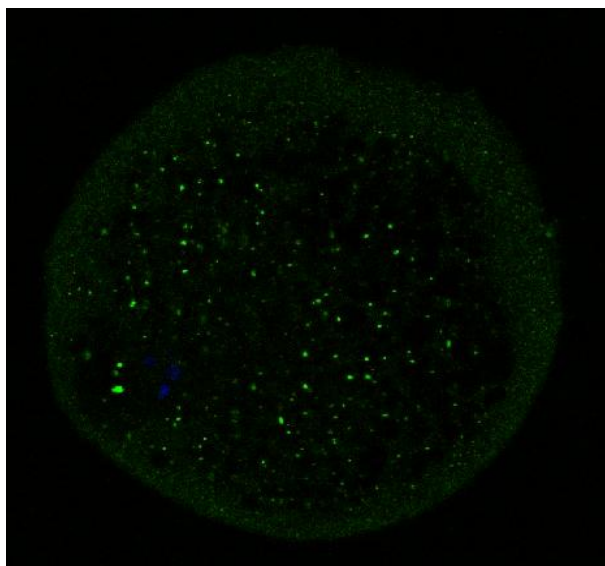
*Obr. č. 2. Detekce a lokalizace 3-MST u oocytu ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení, enzym 3-MST značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



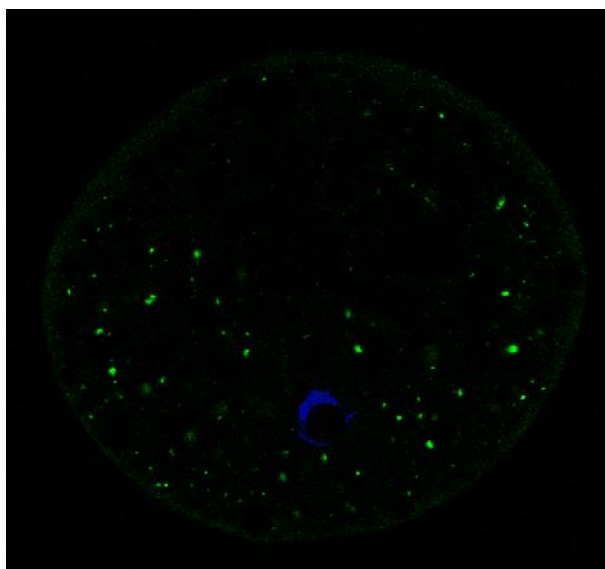
*Obr. č. 3. Detekce a lokalizace 3-MST u oocytu po 1 dnu prodloužené kultivace, enzym 3-MST značen zeleně (FITC), značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



*Obr. č. 4. Detekce a lokalizace 3-MST u oocyty po 2 dnech prodloužené kultivace, enzym 3-MST značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE,) zvětšeno 400x.*



*Obr. č. 5. Detekce a lokalizace 3-MST u oocyty po 3 dnech prodloužené kultivace, enzym 3-MST značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*

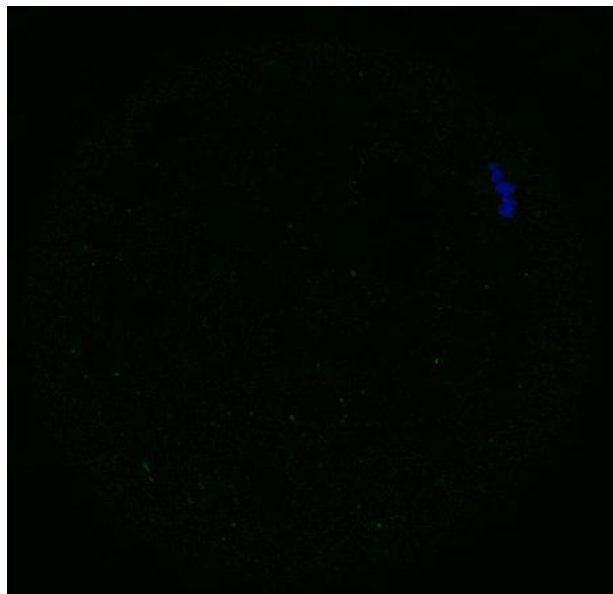




### Detekce a intracelulární lokalizace cystathionin- $\gamma$ -lyázy (CSE) během prodloužené kultivace prasečích oocytů

Přítomnost CSE byla prokázána u oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení a u oocytů, vystavených 1, 2 i 3 dnům prodloužené kultivace. Ložiska tohoto enzymu byla u všech hodnocených skupin oocytů detekována slabě pouze v cytoplazmě. Signál hodnoceného enzymu se v průběhu hodnocených dnů nelišil. Výsledek detekce a lokalizace CSE je znázorněn na obrázku č. 6.

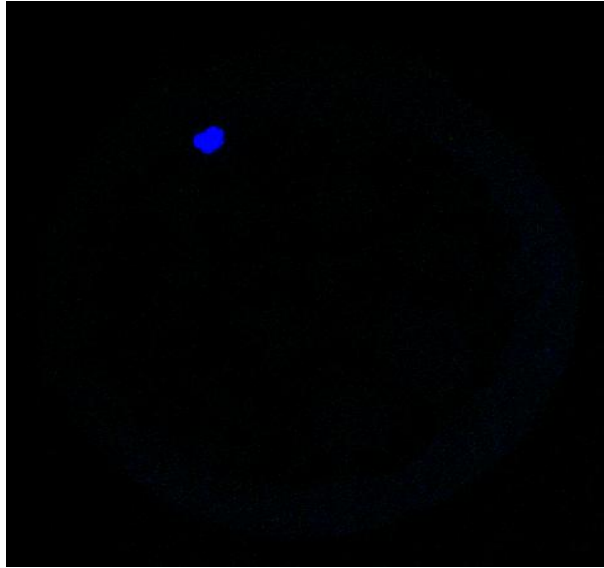
*Obr. č. 6. Detekce a lokalizace CSE u oocytu po 1 dnu prodloužené kultivace, enzym CSE značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



### Detekce a intracelulární lokalizace cystathionin- $\beta$ -syntázy (CBS) během prodloužené kultivace prasečích oocytů

Přítomnost CBS nebyla detekována u oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení a ani v oocytech, vystavených prodloužené kultivaci po dobu 1, 2 a 3 dnů. Výsledek detekce a lokalizace CBS je znázorněn na obrázku č. 7.

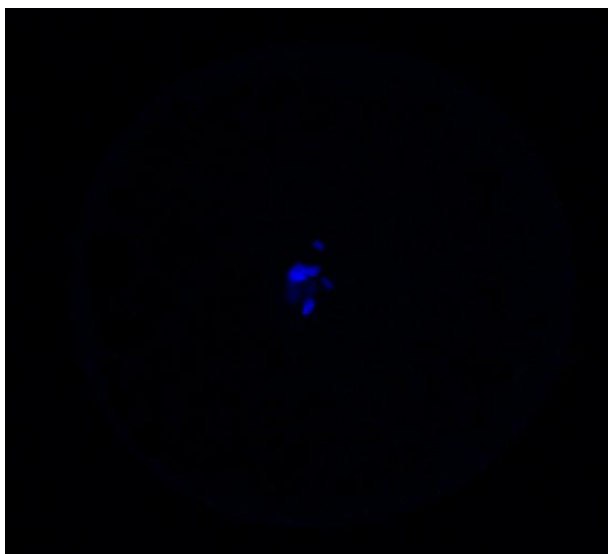
*Obr. č. 7. Detekce a lokalizace CBS u oocyty po 1 dnu prodloužené kultivace, enzym CBS značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



## **Experiment 2: Detekce a intracelulární lokalizace proapoptického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy v kontrolní skupině byly oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC. Tato kontrola sloužila k vyloučení její nespecifické vazby v oocytech. Do konečného hodnocení byly zahrnuty jen ty experimentální skupiny oocytů, u jejichž negativních kontrol nebyl detekován žádný signál. Výsledek negativní kontroly je znázorněn na obrázku č. 8.

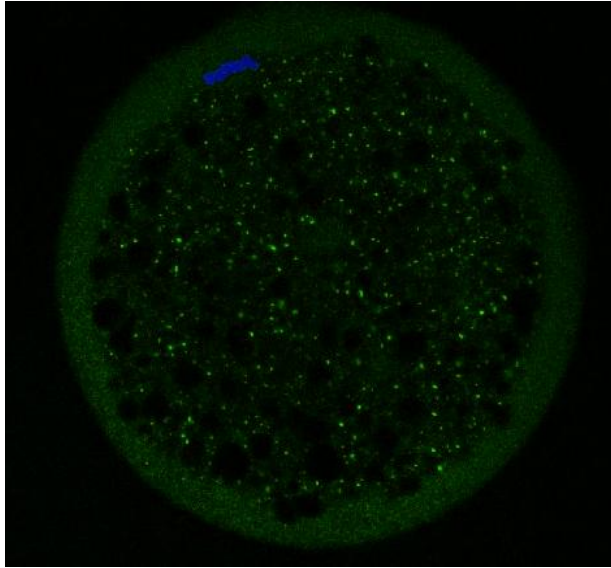
*Obr. č. 8. Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



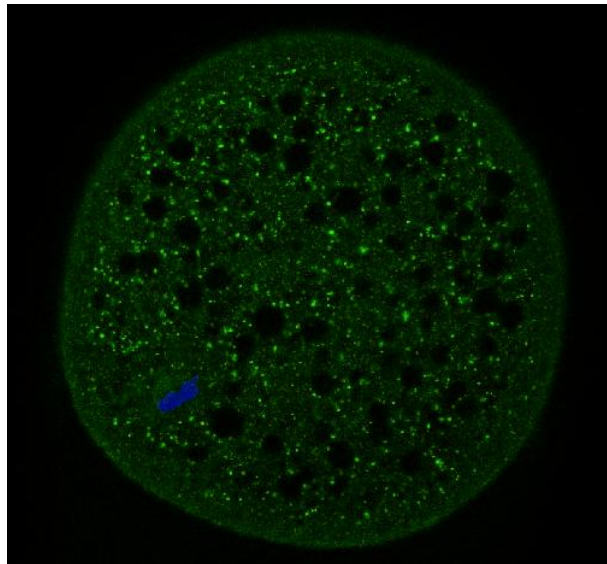
#### Detekce a intracelulární lokalizace proapoptického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů

Expres proapoptického faktoru Bax byla prokázána u oocytů, kultivovaných do stádia metafáze 2. meiotického dělení (MII) a u oocytů, vystavených všech 3 dnům prodloužené kultivace. Ložiska tohoto faktoru byla u všech hodnocených skupin oocytů detekována v oblasti jádra (u oocytů v MII fázi oblast dělicího vřeténka a chromatinu, u aktivovaných oocytů – oblast prvojádra), v korové oblasti a v cytoplazmě. U oocytů po 2 a 3 dnech prodloužené kultivace byla detekována kumulace ložisek faktoru Bax v cytoplazmě v blízkosti jádra, kde byl patrný i jeho nejsilnější signál. Detekce a lokalizace faktoru Bax je znázorněna na obrázcích č. 9 – 12.

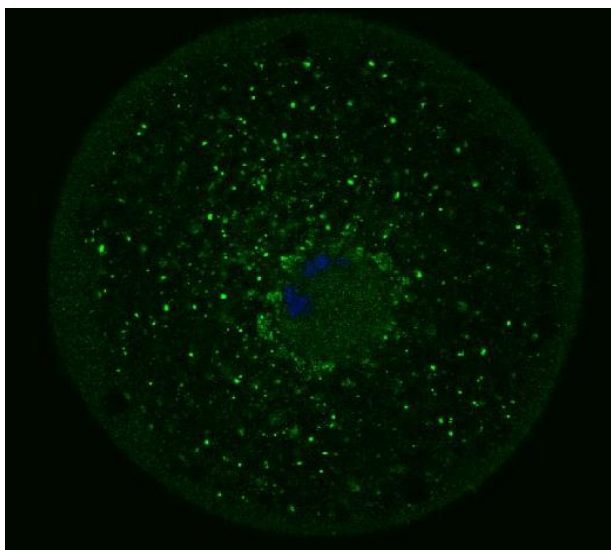
Obr. č. 9. Detekce a lokalizace faktoru Bax v oocytech kultivovaných do stádia metafáze 2. meiotického dělení, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



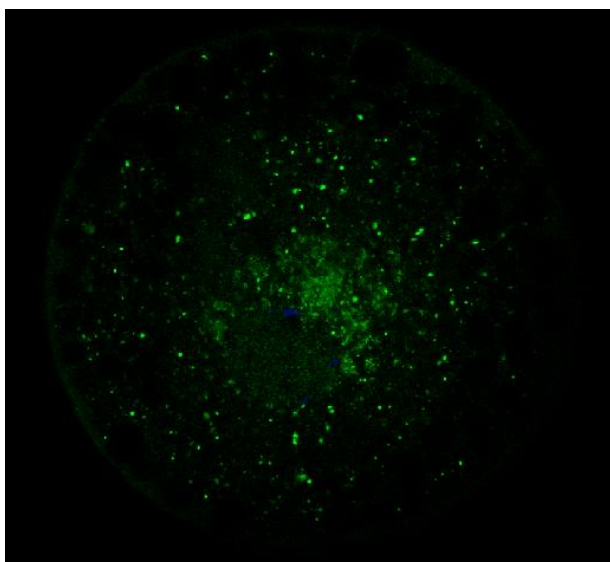
Obr. č. 10. Detekce a lokalizace faktoru Bax v oocytu po 1 dnu prodloužené kultivace, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



*Obr. č. 11. Detekce a lokalizace faktoru Bax v oocyty po 2 dnech prodloužené kultivace, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



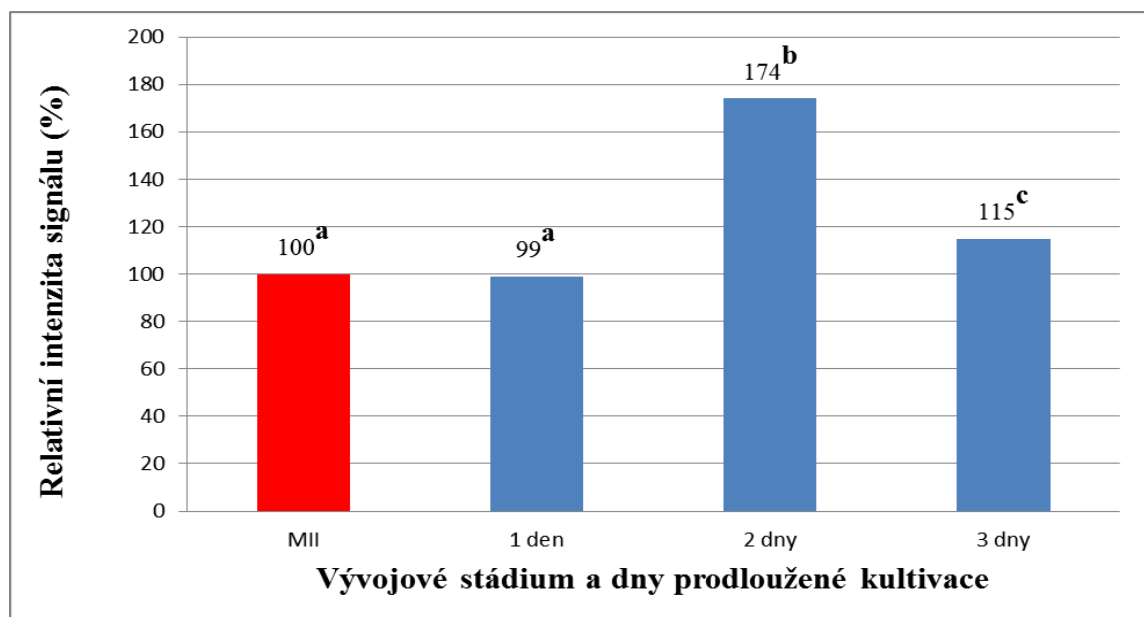
*Obr. č. 12. Detekce a lokalizace faktoru Bax v oocyty po 3 dnech prodloužené kultivace, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



## Hodnocení změn v intenzitě signálu proapoptického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů

Po zhodnocení detekce a lokalizace byly během prodloužené kultivace sledovány změny v intenzitě signálu faktoru Bax v jednotlivých oblastech oocytu. První oblastí, ve které byly změny intenzity signálu faktoru Bax sledovány, byla oblast jádra (u oocytů v MII fázi oblast dělicího vřeténka a chromatinu, u aktivovaných oocytů - oblast prvojádra). Výsledky hodnocení změn intenzity signálu faktoru Bax v této oblasti jsou graficky zpracovány v grafu č. 1.

*Graf č. 1: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v oblasti jádra oocytů mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaženy k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v oblasti jádra oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII)*



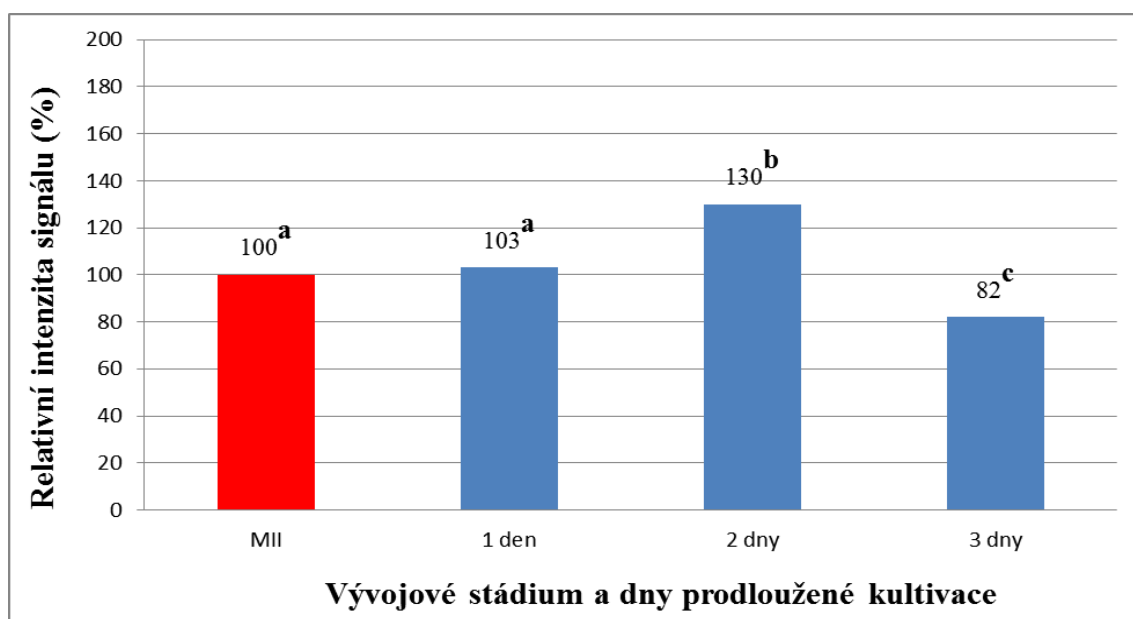
*<sup>a, b, c</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax mezi vývojovým stádiem oocytů a hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .*

Na grafu č. 1 je možné pozorovat, že mezi oocyty ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII fáze) a oocyty, vystavenými 1 dni prodloužené kultivace, nedocházelo v oblasti jádra v intenzitě signálu faktoru Bax ke statisticky významným rozdílům. Intenzita signálu se v jaderné oblasti u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace snížila a o pouhé 1 %. U oocytů po

2 dnech prodloužené kultivace došlo v jaderné oblasti ke statisticky významnému zvýšení intenzity signálu faktoru Bax, kdy se intenzita signálu zvýšila o 75 % oproti intenzitě signálu v jaderné oblasti oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace. U oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace došlo v jaderné oblasti ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu faktoru Bax ve srovnání s oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace, kdy byl rozdíl v intenzitě signálu faktoru Bax mezi těmito dny 59 %. Intenzita signálu faktoru Bax v jaderné oblasti u oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace se však také statisticky významně lišila resp. byla vyšší oproti intenzitě signálu faktoru Bax v jaderné oblasti oocytů v MII fázi, ale také oproti intenzitě signálu faktoru Bax v jaderné oblasti oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace. Rozdíl v intenzitě signálu faktoru Bax v této oblasti mezi oocytů v MII fázi a oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace činil 15 %. Rozdíl v intenzitě signálu faktoru Bax v jaderné oblasti mezi oocytů po 1 a 3 dnech prodloužené kultivace pak činil 16 %.

Další oblastí oocytů, ve které byly sledovány změny v intenzitě signálu faktoru Bax, byla korová oblast. Výsledky změn intenzity signálu faktoru Bax v korové oblasti jsou znázorněny v grafu č. 2

*Graf č. 2: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptotického faktoru Bax v korové oblasti oocytů mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaheny k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII).*



*a, b, c* Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax mezi vývojovým stádiem oocytů a hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

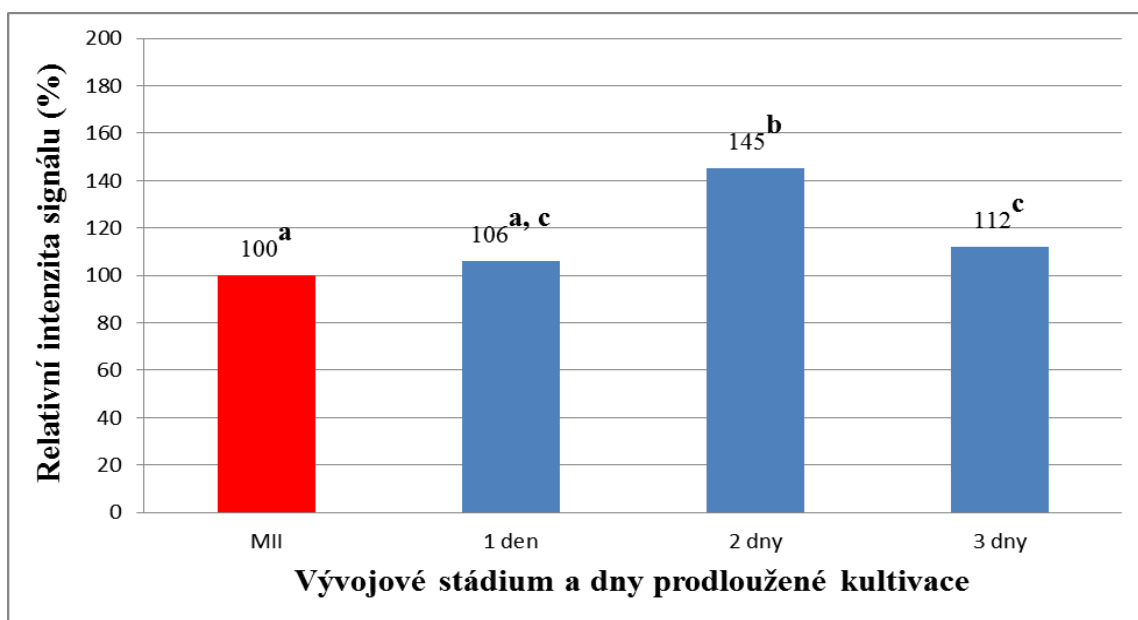
Na grafu č. 2 je možné pozorovat, že mezi oocyty v MII fázi a oocyty, vystavenými 1 dnu prodloužené kultivace, nebyly v hodnocené oblasti v intenzitě signálu faktoru Bax sledovány statisticky významné rozdíly. Po 1 dnu prodloužené kultivace došlo u oocytů v korové oblasti ke zvýšení intenzity signálu faktoru Bax jen o 3 %. Po 2 dnech prodloužené kultivace došlo u oocytů v korové oblasti ke statisticky významnému zvýšení intenzity signálu faktoru Bax při porovnání s intenzitou signálu faktoru Bax v korové oblasti u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace, kdy rozdíl mezi těmito intenzitami činil 27 %. Intenzita signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace v porovnání s intenzitou signálu faktoru Bax po 2 dnech prodloužené kultivace v téže oblasti statisticky významně klesla, a to o 48 %. Intenzita signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů,



vystavených 3 dnům prodloužené kultivace, byla však také statisticky významně nižší i při srovnání s intenzitou signálu faktoru Bax vyhodnocenou v téže oblasti u oocytů v MII fázi, kdy rozdíl činil 18 %. Při srovnání s intenzitou signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace, pak byla intenzita signálu nižší o 21 %.

Poslední oblastí oocytů, ve které byly sledovány změny v intenzitě signálu proapoptického faktoru Bax, byla cytoplazma. Výsledky změn intenzity signálu tohoto faktoru v cytoplazmě jsou znázorněny v grafu č. 3.

*Graf č. 3: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v cytoplazmě oocytů mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaženy k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v cytoplazmě oocytů ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII).*



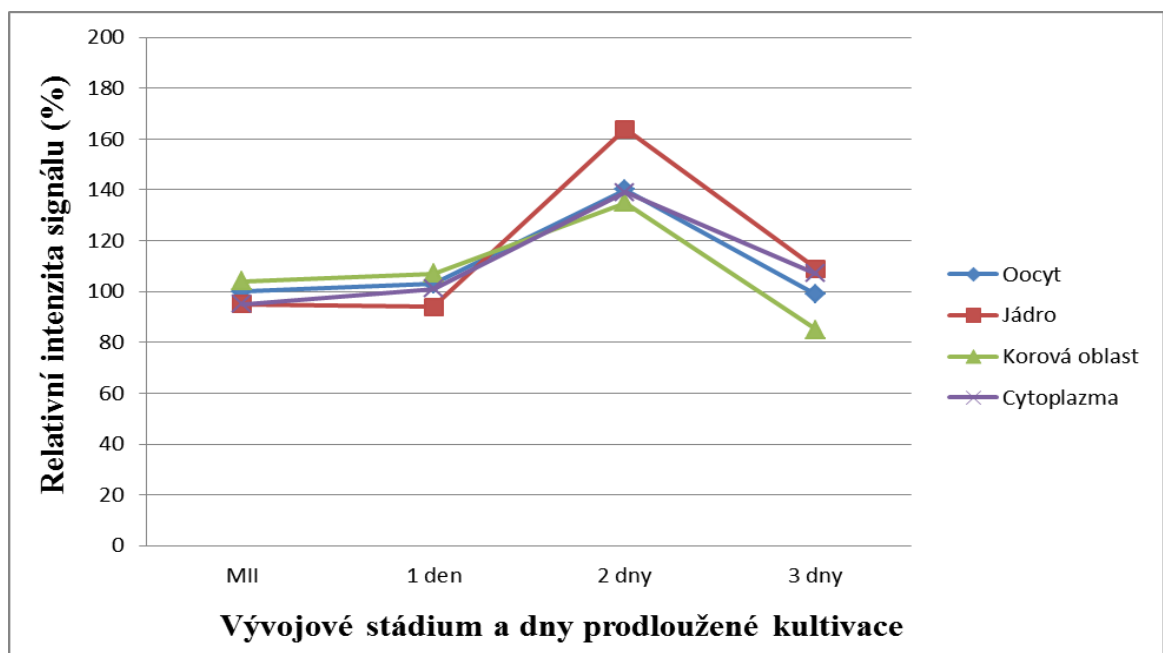
*a, b, c* Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax mezi vývojovým stádiem oocytů a hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Z grafu č. 3 je patrné, že mezi oocyty v MII fázi a oocyty, vystavenými 1 dni prodloužené kultivace, nebyl v dané oblasti v intenzitě signálu faktoru Bax sledován statisticky významný rozdíl. Po 1 dnu prodloužené kultivace došlo u oocytů v cytoplazmě ke zvýšení této intenzity o 6 %. U oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace došlo v cytoplazmě ke statisticky významnému zvýšení intenzity signálu faktoru Bax, která se zvýšila o 39 % oproti intenzitě signálu v téže oblasti u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace. Po 3 dnech

prodloužené kultivace došlo u oocytů v cytoplazmě ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu faktoru Bax o 33 %. Při srovnání intenzit signálu faktoru Bax v cytoplazmě mezi oocyty po 3 dnech prodloužené kultivace a oocyty v MII fázi byl mezi těmito intenzitami zjištěn statisticky významný rozdíl, kdy po 3 dnech prodloužené kultivace byla intenzita signálu faktoru Bax vyšší o 12 %. Při srovnání s intenzitou signálu faktoru Bax u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace byla intenzita signálu u oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace vyšší o 6 %, což nebylo vyhodnoceno jako statisticky významné.

Po zhodnocení průběhu změn intenzity signálu faktoru Bax v jednotlivých sledovaných oblastech oocytů a dnech prodloužené kultivace bylo provedeno srovnání všech sledovaných oblastí oocytů v daných dnech prodloužené kultivace. Toto srovnání je uvedeno v grafu č. 4.

*Graf č. 4: Souhrnné porovnání průběhu změn intenzit signálu proapoptického faktoru Bax, vyhodnocených v jednotlivých oblastech oocytů během prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty intenzit signálu Bax jsou vztaženy k celkové průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v oocytech ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení (MII).*



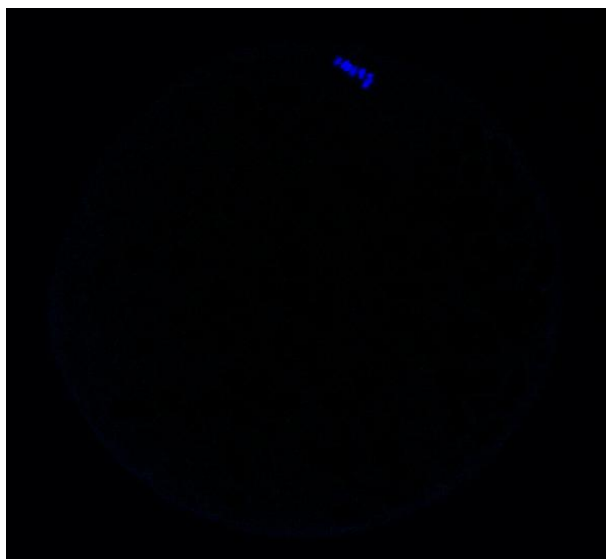
Na grafu č. 4 je možné pozorovat, že byla intenzita signálu faktoru Bax u oocytů v MII fázi a u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace přibližně na stejné úrovni ve všech sledovaných oblastech. U oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace došlo ve všech sledovaných oblastech ke zvýšení intenzity signálu faktoru Bax. Nejvyšší intenzita signálu

faktoru Bax byla sledována v oblasti jádra. Po 3 dnech prodloužené kultivace došlo u oocytů ke snížení intenzity signálu faktoru Bax ve všech sledovaných oblastech, a to zejména v oblasti kůry.

### **Experiment 3: Zhodnocení vlivu donoru sulfanu Na<sub>2</sub>S na expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů**

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy v kontrolní skupině byly oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC. Tato kontrola sloužila k vyloučení její nespecifické vazby v oocytech. Do konečného hodnocení byly zahrnuty jen ty experimentální skupiny oocytů, u jejichž negativní kontroly nebyl detekován žádný signál. Výsledek negativní kontroly znázorněn na obrázku č. 13.

*Obr. č. 13. Negativní kontrola: Oocyt po 1 dnu prodloužené kultivace, inkubovaný se sekundární protilátkou anti-králičí konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*

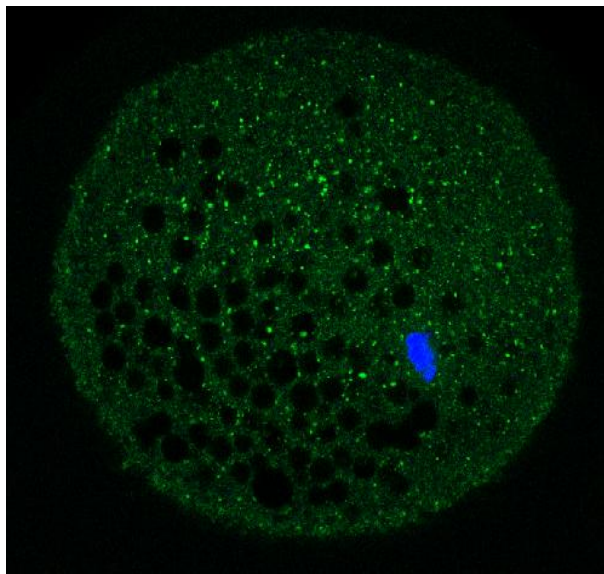


### Detekce a intracelulární lokalizace proapoptotického faktoru Bax při prodloužené kultivaci prasečích oocytů v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S

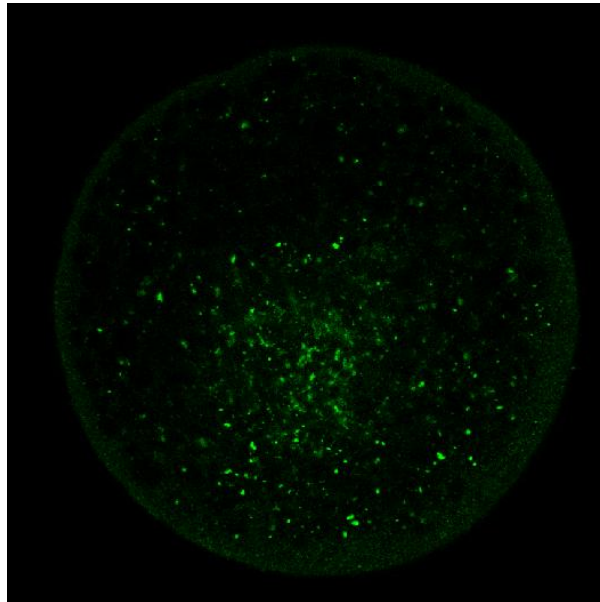
Expresí proapoptotického faktoru Bax byla u oocytů, kultivovaných v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S, prokázána v průběhu všech 3 dnů jejich prodloužené kultivace.

Ložiska tohoto faktoru byla u všech hodnocených skupin oocytů detekována v oblasti jádra, v korové oblasti a v cytoplazmě. U oocytů po 2 a 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  docházelo ke kumulaci ložisek faktoru Bax v oblasti jádra, kde byl také detekován jeho nejsilnější signál. Detekce a lokalizace faktoru Bax je znázorněna na obrázcích č. 14 – 16.

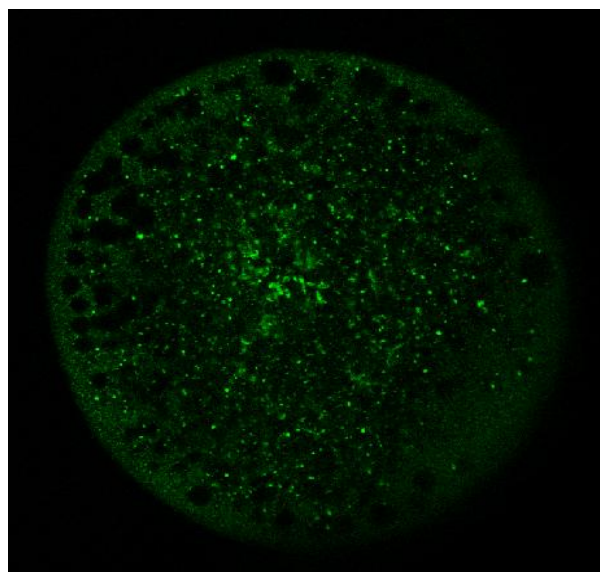
*Obr. č. 14. Detekce a lokalizace proapoptotického faktoru Bax v oocyty po 1 dnu prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



*Obr. č. 15. Detekce a lokalizace proapoptického faktoru Bax v oocyty po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



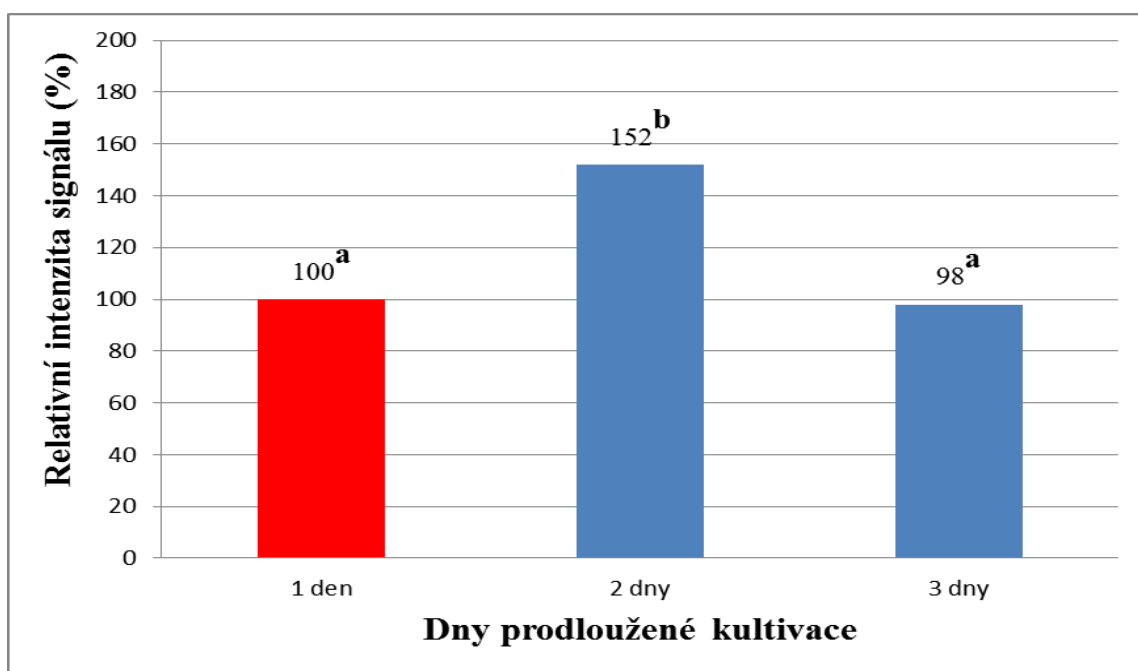
*Obr. č. 16. Detekce a lokalizace proapoptického faktoru Bax v oocyty po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu, faktor Bax značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.*



## Hodnocení změn v intenzitě signálu proapoptotického faktoru Bax při prodloužené kultivaci prasečích oocytů v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S

Po zhodnocení detekce a lokalizace byly, jako v předešlém experimentu, v průběhu prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S hodnoceny změny intenzity signálu proapoptotického faktoru Bax v jednotlivých oblastech oocytů. Jako první hodnocenou oblastí byla oblast jádra. Výsledky změn intenzity signálu faktoru Bax v oblasti jádra oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S jsou znázorněny v grafu č. 5.

*Graf č. 5: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptotického faktoru Bax v oblasti jádra oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S, mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaheny k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v oblasti jádra oocytů, vystavených 1 dni prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S.*



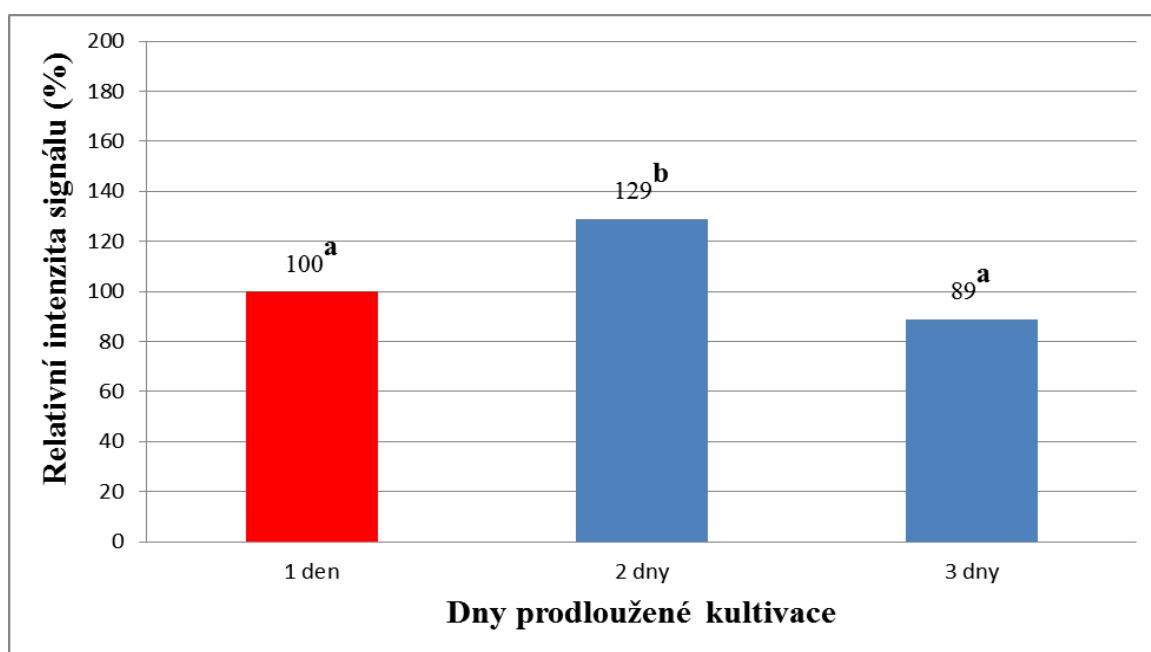
<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S mezi hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Z grafu č. 5 je patrné, že po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu Na<sub>2</sub>S docházelo u oocytů v jaderné oblasti ke statisticky významnému zvýšení intenzity

signálu faktoru Bax. Při srovnání s intenzitou signálu faktoru Bax zjištěnou u oocytů po 1 dnu prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  činil rozdíl 52 %. U oocytů po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  pak došlo ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu faktoru Bax. Rozdíl mezi intenzitami signálu faktoru Bax v jaderné oblasti oocytů po 2 a 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  činil 54 %. Rozdíl 2 % mezi intenzitami signálu faktoru Bax u oocytů po 1 a 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

Další oblastí oocytů, vystavených během prodloužené kultivace působení donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , ve které byly hodnoceny změny intenzity signálu faktoru Bax, byla korová oblast. Výsledky změn intenzity signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  jsou znázorněny v grafu č. 6.

*Graf č. 6: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v korové oblasti oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaheny k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v korové oblasti oocytů, vystavených 1 dni prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .*

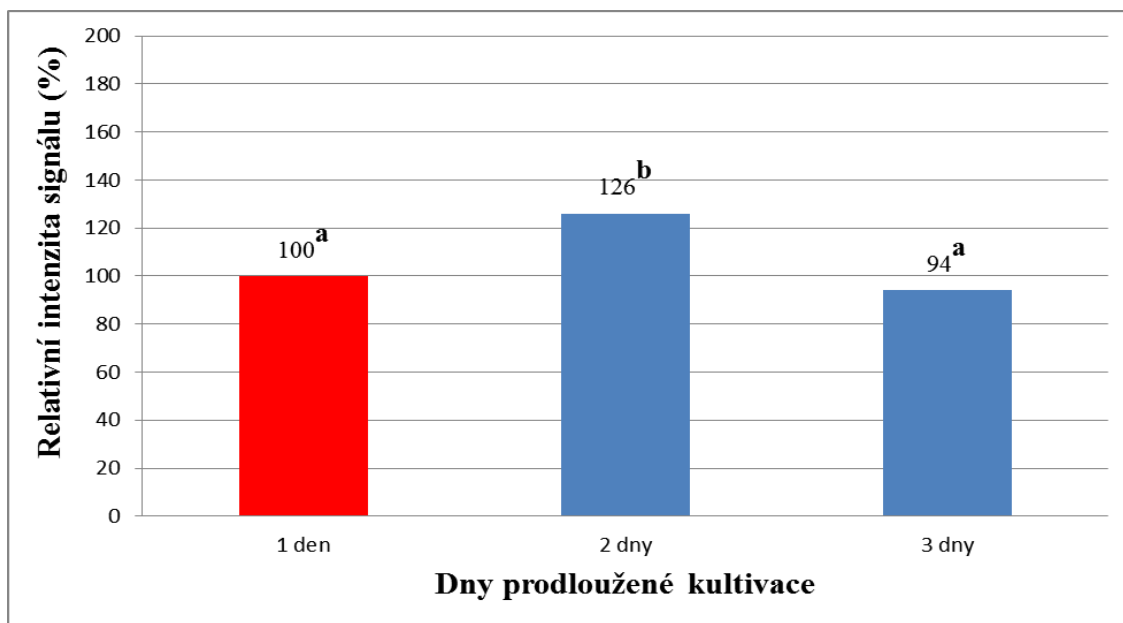


<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , mezi hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Na grafu č. 6 je možné pozorovat, že u oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  docházelo v korové oblasti ke statisticky významnému zvýšení intenzity signálu faktoru Bax o 29 %. Po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  však u oocytů v korové oblasti intenzita signálu faktoru Bax statisticky významně poklesla o 40 %. Rozdíl 1 % mezi intenzitami signálu faktoru Bax v oocytech po 1 a 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

Poslední oblastí oocytů, vystavených během prodloužené kultivace účinku donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , ve které byly hodnoceny změny intenzity faktoru Bax, byla cytoplazma. Výsledky změn intenzity signálu faktoru Bax v cytoplazmě oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  jsou znázorněny v grafu č. 7.

*Graf č. 7: Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v cytoplazmě oocytů, vystavených účinku donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , mezi jednotlivými dny prodloužené kultivace. Tyto průměrné hodnoty jsou vztaženy k průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v cytoplazmě oocytů, vystavených 1 dni prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .*



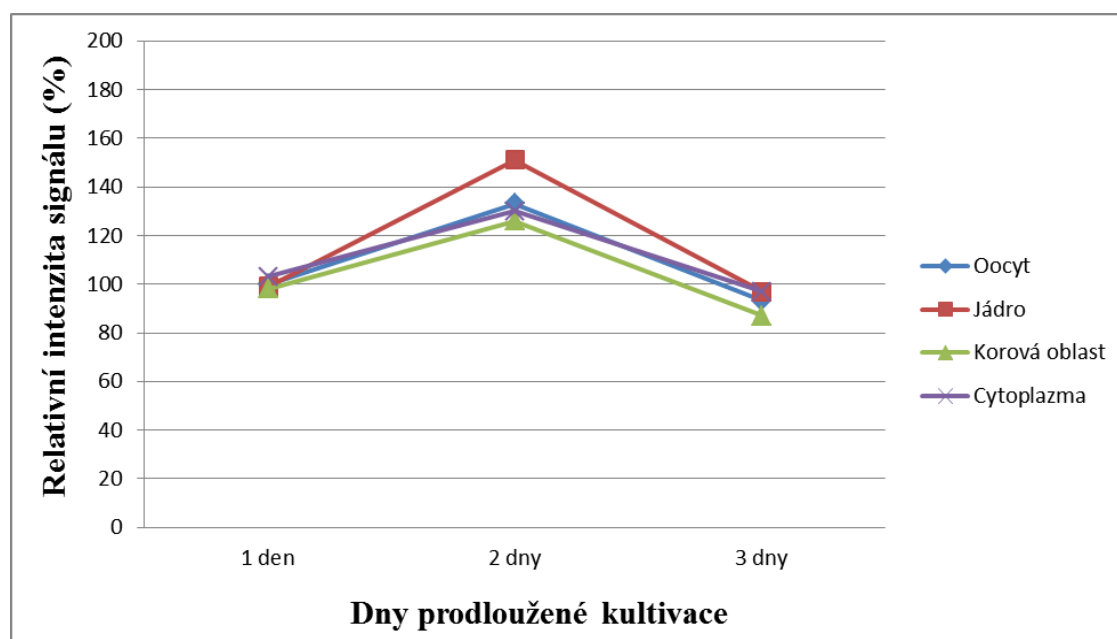
*<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , mezi hodnocenými dny prodloužené kultivace na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .*



Z grafu č. 7 je patrné, že se v cytoplazmě oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  intenzita signálu faktoru Bax statisticky významně zvýšila o 26 %. Po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  naopak v dané oblasti oocytů docházelo ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu faktoru Bax o 32 %. Rozdíl 6 % mezi intenzitami signálu faktoru Bax v cytoplazmě oocytů po 1 a 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

Po zhodnocení změn intenzity signálu faktoru Bax v jednotlivých oblastech oocytů, vystavených prodloužené kultivaci v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , bylo provedeno porovnání průběhu intenzit signálu faktoru Bax během všech dní prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  v hodnocených oblastech oocytů. Výsledek tohoto porovnání je uveden v grafu č. 8.

*Graf č. 8: Souhrnné porovnání průběhu změn intenzit signálu proapoptického faktoru Bax, vyhodnocených v jednotlivých oblastech oocytu během prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ . Průměrné hodnoty intenzit signálu Bax jsou vztaheny k celkové průměrné hodnotě intenzity signálu faktoru Bax v oocytech, vystavených 1 dni prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .*

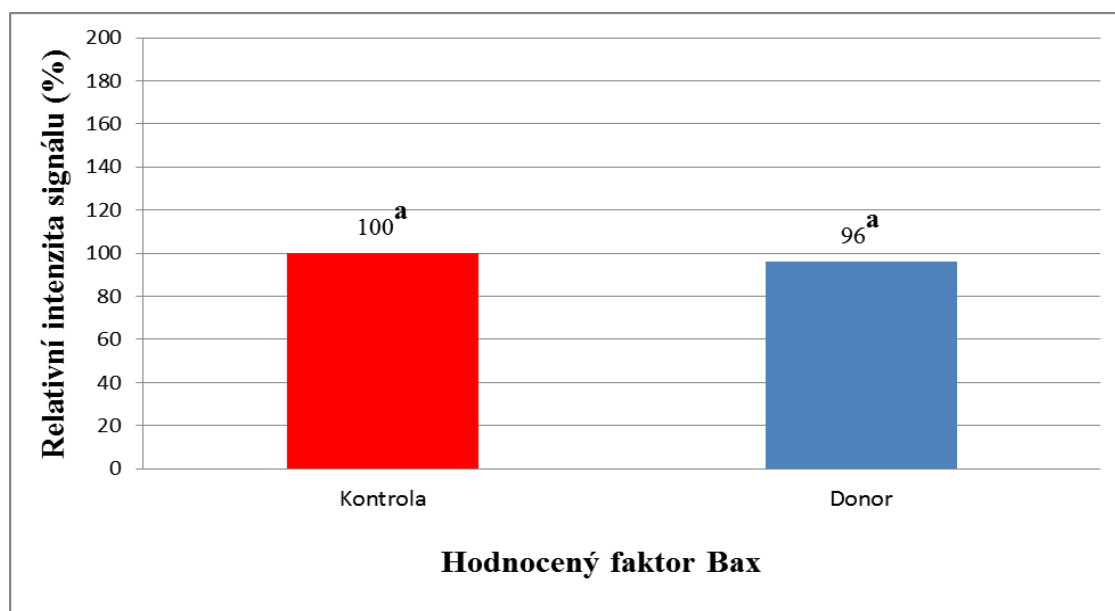


Na grafu č. 8 můžeme pozorovat, že po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  docházelo ke zvýšení intenzity signálu faktoru Bax ve všech hodnocených oblastech a nejvyšší intenzita signálu Bax byla detekována v oblasti jádra. Po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  pak docházelo ve všech hodnocených oblastech k poklesu intenzity signálu faktoru Bax.

#### Zhodnocení vlivu donoru sulfanu $\text{Na}_2\text{S}$ na expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů

Při statistické analýze, kdy byly porovnávány změny intenzity signálu faktoru Bax mezi oocyty, kultivovanými v médiu s donorem a bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , nebyly mezi těmito intenzitami zjištěny žádné statisticky významné rozdíly, a to ani při porovnání intenzit signálu faktoru Bax v jednotlivých oblastech oocytů. Pro názornost jsou zde uvedeny jen výsledky rozdílů průměrných hodnot intenzity signálu faktoru Bax v oocytech v průběhu jednotlivých dnů prodloužené kultivace. Tyto výsledky jsou znázorněny v grafech č. 9 – 11.

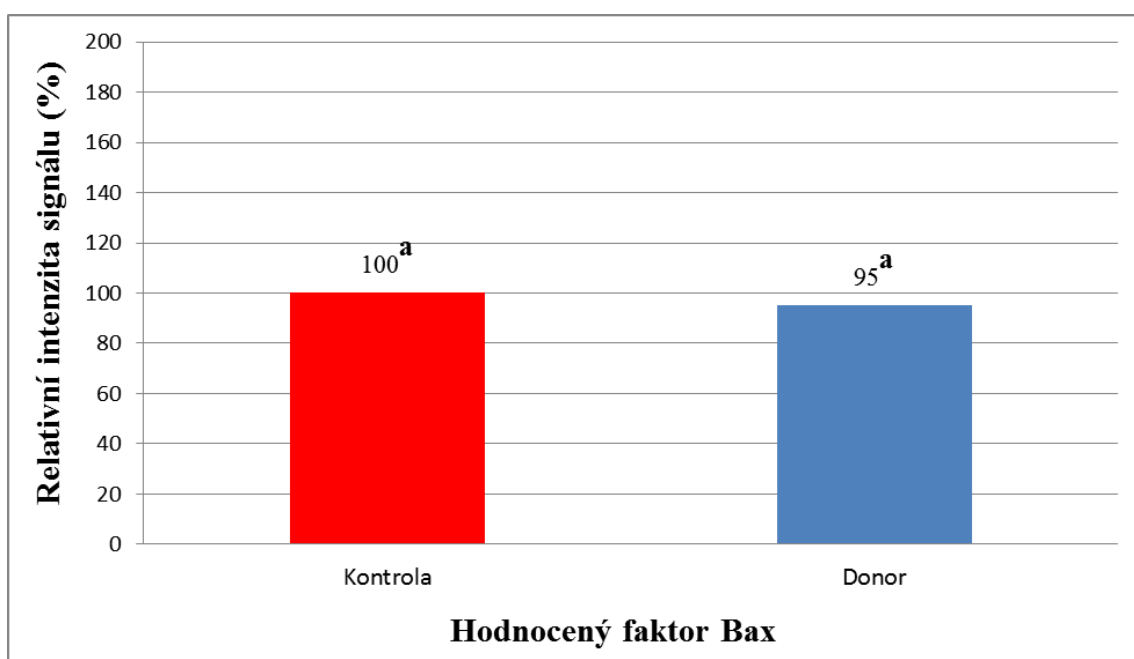
*Graf č. 9. Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptotického faktoru Bax v oocytech po 1 dnu prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , kdy jsou tyto průměrné hodnoty vztaheny k průměrným hodnotám intenzity signálu faktoru Bax v oocytech, kultivovaných stejnou dobu v médiu bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .*



<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, kultivovaných bez přítomnosti donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  a faktoru Bax u oocytů, kultivovaných v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Z grafu č. 9 je patrné, že u oocytů, kultivovaných s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 1 dne, byla intenzita signálu faktoru Bax o 4 % nižší než ve skupině oocytů, kultivovaných bez přítomnosti donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 1 dne. Při statistické analýze však tento rozdíl nebyl vyhodnocen jako statisticky průkazný.

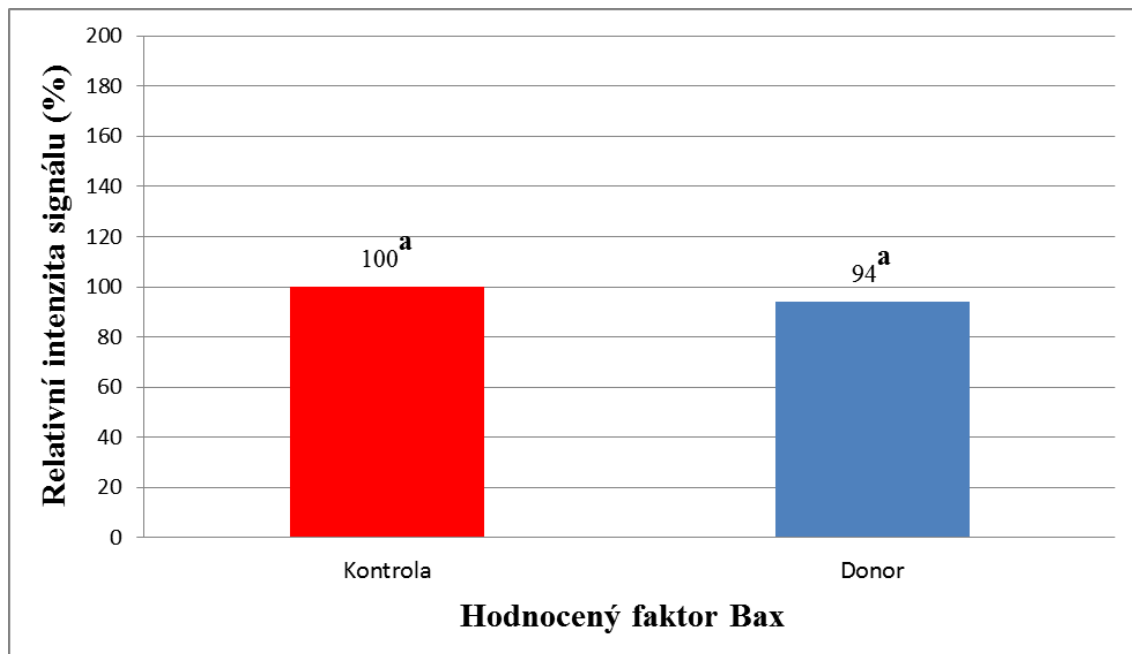
*Graf č. 10. Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v oocytech po 2 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , kdy jsou tyto průměrné hodnoty vztaženy k průměrným hodnotám intenzity signálu faktoru Bax v oocytech, kultivovaných stejnou dobu v médiu bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .*



<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, kultivovaných bez přítomnosti donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  a faktoru Bax u oocytů, kultivovaných v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Na grafu č. 10 můžeme pozorovat, že u oocytů, kultivovaných s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 2 dnů, byla intenzita signálu faktoru Bax o 5 % nižší než u oocytů, kultivovaných bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 2 dnů. Statistickou analýzou nebyl tento rozdíl vyhodnocen jako statisticky průkazný.

Graf č. 11. Porovnání průměrných hodnot intenzity signálu proapoptického faktoru Bax v oocyttech po 3 dnech prodloužené kultivace v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ , kdy jsou tyto průměrné hodnoty vztaheny k průměrným hodnotám intenzity signálu faktoru Bax v oocyttech, kultivovaných stejnou dobu v médiu bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$ .



<sup>a, b</sup> Rozdílné superskripty v grafu znázorňují statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu faktoru Bax u oocytů, kultivovaných bez přítomnosti donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  a faktoru Bax u oocytů, kultivovaných v médiu s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  na hladině významnosti  $\alpha < 0,05$ .

Z grafu č. 11 je patrné, že u oocytů, kultivovaných s donorem sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 3 dnů, byla intenzita signálu faktoru Bax o 6 % nižší než u oocytů, kultivovaných bez donoru sulfanu  $\text{Na}_2\text{S}$  po dobu 3 dnů. Při statistické analýze nebyl tento rozdíl vyhodnocen jako statisticky průkazný.

## 6. DISKUZE

Oocyty, vystavené prodloužené kultivaci, podléhají procesu stárnutí (Kichuchi *et al.*, 2000). Nejvýznamnějším projevem stárnutí oocytů je fragmentace, ke které dochází po indukci apoptózy (Jeřeta *et al.*, 2008). Apoptotický proces je regulován i proteiny z rodiny Bcl-2, která zahrnuje také proapoptotický faktor Bax. Bylo prokázáno, že proapoptotický faktor Bax hraje významnou roli v indukci apoptózy u myšších oocytů (Felici *et al.*, 1999). Přesné mechanismy regulace apoptózy u oocytů však nejsou doposud známy. U somatických buněk bylo sledováno, že do regulace apoptózy je zapojena i signální molekula sulfanu. Sulfan je v organismu syntetizován prostřednictvím enzymů cystathionin  $\beta$ -syntázy (CBS), cystathionin  $\gamma$ -lyázy (CSE) (Chen *et al.*, 2004) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy (3-MST) (Elsei *et al.*, 2010).

První experiment byl zaměřen na detekci CBS, CSE a 3-MST během prodloužené kultivace (stárnutí) prasečích oocytů.

Během stárnutí prasečích oocytů jsme prokázali expresi dvou enzymů, katalyzujících syntézu sulfanu, a to 3-MST a CSE. Exprese CBS zjištěna nebyla. Oba dva detekované enzymy byly v oocytech exprimovány po dobu 1, 2 a 3 dnů prodloužené kultivace. 3-MST byla lokalizována v ložiscích v oblasti prvojádra, v cytoplazmě a korové oblasti. CSE byla lokalizována slabě v ložiscích pouze v cytoplazmě.

Tyto výsledky naznačují, že by v produkci sulfanu ve stárnoucích prasečích oocytech mohla hrát zásadní roli 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza.

O roli 3-MST v reprodukčním systému zatím není v odborné literatuře mnoho informací. Exprese tohoto enzymu byla prokázána především v nervových buňkách a buňkách cévního endotelu, kde byl tento enzym lokalizován především v mitochondriích. Sulfan produkovaný enzymem 3-MST v těchto organelách je schopen redukovat vznikající reaktivní formy kyslíku (Kimura, 2011).

V samičím reprodukčním systému byly již detekovány enzymy CSE a CBS (Carson *et al.*, 2010). V lidském a potkaním reprodukčním systému byla produkce sulfanu prostřednictvím těchto enzymů, zjištěna v gravidní i negravidní děloze, v ovariích, v pochvě, v placentě a v plodových obalech (Patel *et al.*, 2009). Tyto enzymy jsou v buňkách lokalizovány v cytoplazmě, což bylo našimi experimenty potvrzeno pouze u CSE. Rong *et al.* (2006) ve své studii uvádějí, že v ovariální tkáni je za produkci sulfanu zodpovědný

především enzym CBS. Expres tohoto enzymu byla však detekována pouze v buňkách *membrana granulosa* a buňkách *corona radiata* nikoliv v oocytech.

Následující experiment byl zaměřen na detekci proapoptotického faktoru Bax během prodloužené kultivace (stárnutí) prasečích oocytů.

Bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí prasečích oocytů dochází k expresi proapoptotického faktoru Bax. Jeho exprese byla detekována u oocytů, vystavených 1, 2 a 3 dnům prodloužené kultivace. Ložiska faktoru Bax byla detekována oblasti prvojádra, v cytoplasmě a v korové vrstvě. Po 1 dnu prodloužené kultivace byl signál faktoru Bax rovnoměrně rozmístěn ve všech sledovaných oblastech. Po 2 dnech prodloužené kultivace došlo u oocytů ke zvýšení signálu faktoru Bax, a to zejména v blízkosti prvojádra oocytů, kde byla také detekována kumulace jeho ložisek. Po 3 dnech prodloužené kultivace signál faktoru Bax poklesl ve všech sledovaných oblastech, ale stále byl nejsilnější v blízkosti prvojádra.

Při studiích proapoptotického faktoru Bax bylo zjištěno, že je v buňkách lokalizován převážně v cytoplasmě v podobě inaktivního monomeru (Hsu, Y. T. *et al.*, 1997). Po indukci apoptózy extracelulárními či intracelulárními signály pak tento protein prochází konformační změnou a dochází k jeho translokaci do vnější mitochondriální membrány, kde vytváří oligomery a je aktivován, čímž iniciuje zahájení apoptózy (Er *et al.*, 2006). Lokalizace faktoru Bax spojená s jeho translokací může být ovlivněna řadou faktorů, mezi které můžeme zařadit např. změny intracelulárního pH, kdy hodnoty pH 6, 8 – 7, 8 u somatických buněk inhibují konformační změny a hodnoty pH < 6 a pH > 8 je naopak iniciují (Catron *et al.*, 2003). Dalším faktorem může být teplota prostředí, kdy při jejím zvýšení nad 42 °C dochází k iniciaci konformačních změn a dochází k translokaci faktoru Bax do mitochondrií (Bettaieb *et al.*, 2005). Rathmell *et al.* (2005) uvádějí, že konformační změny faktoru Bax mohou být ovlivněny i glukózovým metabolismem. Protein kináza B zapojená do regulace metabolismu glukózy patrně inhibuje konformační změny fosforylací faktoru Bax na serinu 184.

Během stárnutí prasečích oocytů jsme pozorovali kumulaci ložisek faktoru Bax v blízkosti prvojader, což je pravděpodobně spojeno s translokací faktoru Bax do mitochondrií. K ověření tohoto tvrzení je nezbytné realizovat experimenty zaměřené na sledování kolokalizace faktoru Bax a mitochondrií.

Další experiment byl zaměřen na sledování vlivu sulfanu na expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů. Vliv sulfanu na expresi a intracelulární lokalizaci faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů však

provedenými experimenty prokázán nebyl. Sulfan se pravděpodobně podílí na regulaci apoptózy u prasečích oocytů jiným mechanismem.

Bylo například zjištěno, že endogenně produkovaný sulfan hraje důležitou roli v modulaci buněčné apoptózy tím, že aktivuje MAPK dráhu. Fosforylací a aktivací MAPK dochází k transdukci apoptotického signálu vedoucí k aktivaci kaspázy 3 (Yang *et al.*, 2004).

Dále bylo zjištěno, že je sulfan schopen ovlivňovat apoptózu tím, že ovlivňuje činnost vápníkových kanálů (Wenner, 2010). Regulací činnosti vápníkových kanálů je pak možné indukovat apoptózu (Orrenius *et al.*, 2003).

Sulfan je také schopen indukovat apoptózu hladkosvalových buněk v pulmonální arterii při rozvoji plicní hypertenze prostřednictvím aktivace Fas dráhy a inhibicí Bcl-2 dráhy (Li *et al.*, 2009).

Zvýšená hladina sulfanu u lidských plicních fibroblastů vede ke snížení úrovně antiapoptotických faktorů, ale zároveň vede k indukci exprese apoptotického genu p53, vedoucí k translokaci proapoptotického faktoru Bax do mitochondrií (Baskar *et al.*, 2007). Zvýšení hladiny sulfanu ve stárnoucích prasečích oocytech nevedlo k žádné změně v lokalizaci proapoptotického faktoru Bax v našich experimentech. Cao *et al.* (2006) uvádí, že zvýšená hladina sulfanu je schopna navodit i apoptózu v exokrinních a endokrinních buňkách pankreatu, kdy u acinárních buněk po zvýšení hladiny sulfanu dochází k aktivaci iniciačních kaspáz 8 a 9, efektorové kaspázy 3, a zároveň dochází ke zvýšení exprese proapoptotického faktoru Bax a k poklesu exprese antiapoptotické proteinu FLIP.

Byly však popsány i antiapoptotické účinky sulfanu. Zvýšená hladina sulfanu u kardiomyocytů podle studie Shi *et al.* (2009). vede ke zvýšení exprese antiapoptotického faktoru Bcl-2. Antiapoptotické účinky sulfanu byly sledovány i při studii apoptózy hepatocytů, kdy po zvýšení hladiny sulfanu došlo ke zvýšení hladiny heat shock proteinů, sloužících k ochraně buněk před tepelným stresem (Jha *et al.*, 2008).

Sulfan má tedy na regulaci apoptózy duální efekt. Ve stárnoucích prasečích oocytech jeho přímé působení na expresi a intracelulární lokalizaci faktoru Bax vliv nemělo. Je však možné, že sulfan ovlivňuje funkci faktoru Bax jiným mechanismem, například regulací aktivity faktoru Bax prostřednictvím jeho sulfhydratace (Mustafa *et al.*, 2011). Aktivita faktoru Bax však našimi experimenty sledována nebyla.

## 7. ZÁVĚR

Produkce vývojově kompetentních oocytů v *in vitro* podmínkách je důležitá pro další rozvoj reprodukčních biotechnologií. Oocyty dozrálé v *in vitro* podmínkách však při jejich prodloužené kultivaci podléhají procesu stárnutí. Proces stárnutí zahrnuje řadu buněčných a molekulárních změn, které u oocytů negativně ovlivňují požadovanou vývojovou kompetenci. Tyto uvedené změny vedou posléze k indukci programované buněčné smrti tj. apoptóze. Mezi hlavní důležité regulátory apoptotického procesu v oocytech patří proapoptotický faktor Bax z rodiny Bcl-2. Do regulace apoptózy ve stárnoucích oocytech by mohl být zapojen i endogenně produkováný sulfan.

Výsledky našich experimentů prokázaly, že ve stárnoucích prasečích oocytech dochází k expresi enzymů, katalyzujících syntézu sulfanu, 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázy, cystathionin- $\gamma$ -lyázy, čímž bylo prokázáno, že v těchto oocytech syntéza sulfanu probíhá. 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza byla lokalizována u oocytů, stárnoucích po dobu 1, 2 a 3 dnů v oblasti prvojádra, v cytoplazmě a v korové oblasti. Cystathionin- $\gamma$ -lyáza byla lokalizována u oocytů, stárnoucích po dobu 1, 2 a 3 dnů pouze v cytoplazmě. Dále jsme prokázali, že ve stárnoucích prasečích oocytech dochází k expresi proapoptotického faktoru Bax, jež byl detekován po dobu 1, 2 a 3 dnů jejich prodloužené kultivace v oblasti prvojádra, v cytoplazmě a v korové oblasti. Intenzita signálu faktoru Bax se v průběhu sledovaných dnů měnila. Intenzita signálu faktoru Bax se zvýšila u oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace, u nichž byla nejvyšší hodnota tohoto signálu naměřena v oblasti prvojádra, kde docházelo ke kumulaci ložisek faktoru Bax. Při sledování vlivu sulfanu na expresi a intracelulární lokalizaci proapoptotického faktoru Bax během stárnutí prasečích oocytů nebylo prokázáno, že by sulfan byl schopen expresi a intracelulární lokalizaci faktoru Bax přímo ovlivnit. Je však možné, že je sulfan schopen ovlivnit funkci faktoru Bax například prostřednictvím regulace jeho aktivity sulfhydratací. Tato aktivita faktoru Bax v našem případě však sledována nebyla. Je tedy důležité dále pokračovat ve studiích vlivu sulfanu na proapoptotický faktor Bax, ale i jiné regulátory apoptotického procesu.



## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ❖ Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*. 16 (3). 1066 - 1071.
- ❖ Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Prather, R. S., Day, B. N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 58 (5). 1316 – 1320.
- ❖ Abud, H. E. 2004. Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 11 (8). 797 – 799.
- ❖ Adams, J. M., Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281 (5381). 1322 – 1326.
- ❖ Adhikari, D., Liu, K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*. 30 (5). 438 – 464.
- ❖ Akiyama, T., Bouillet, P., Miyazaki, T., Kadono, Y., Chikuda, H., Chung, U. I., Fukuda, A., Hikita, A., Seto, H., Okada, T., Inaba, T., Sanjay, A., Baron, R., Kawaguchi, H., Oda, H., Nakamura, K., Strasser, A., Tanaka, S. 2003. Regulation of osteoklast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *The EMBO Journal*. 22 (24). 6653 – 6664.
- ❖ Akkoyunlu, G., Ustünel, I., Demir, R. 2007. The distribution of transglutaminase in the rat oocyte and embryos. *Theriogenology*. 68 (6). 834 – 841.
- ❖ Ali, M. Y., Ping, C. Y., Mok, Y. Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., Moore, P. K. 2006. Regulation of vascular nitric oxide *in vitro* and *in vivo*; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *British Journal of Pharmacology*. 149 (6). 625 – 634.
- ❖ Anderson, R., Copeland, T. K., Schöler, H., Heasman, J., Wylie, Ch. 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanism of Development*. 91 (1–2). 61 – 6.
- ❖ Andreu-Vieyra, C. V., Habibi, H. R. 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 78 (12). 1003 – 1012.
- ❖ Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews: Cancer*. 2 (6). 420 – 430.

- ❖ Ashkenazi, A., Dixit, V. M. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*. 281 (5381). 1305 – 1308.
- ❖ Austgen, J. R., Hermann, G. E., Dantzler, H. A., Rogers, R. C., Kline, D. D. 2011. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) augments synaptic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract. *Journal of Neurophysiology*. 106 (4). 1822 - 1832.
- ❖ Austin C. R. 1962. *The mammalian egg*. Black Well Scientific Publications. London. p. 182.
- ❖ Awata, S., Nakayama, K., Suzuki, I., Sugahara, K., Kodama, H. 1995. Changes in cystathionine-γ-lyase in various regions of rat brain during development. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 35 (6). 1331 – 1338.
- ❖ Bálint, E. E., Vousden, K. H. 2001. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *British Journal of Cancer*. 85 (12). 1813 – 1823.
- ❖ Banerjee, R., Zou, C. G. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-β-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 433 (1). 144 – 156.
- ❖ Barboni, B., Mattioli, M., Gioia, L., Turriani, M., Capacchietti, G., Lucidi, P. 2003. Apoptosis in cooled porcine oocytes: Role of calcium (Ca<sup>2+</sup>) and Ca<sup>2+</sup> – dependent enzymes. *Veterinary Research Communications*. 27. 203 – 206.
- ❖ Baskar, R., Li, L., Moore, P. K 2007. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lungfibroblast cells. *FASEB Journal*. 21 (1). 247 – 255.
- ❖ Belardinelli, M. C., Chabli, A., Chadefaux-Vekemans, B., Kamoun, P. 2001. Urinary sulfur compounds in Down syndrome. *Clinical Chemistry*. 47 (8). 1500 – 1501.
- ❖ Bettaieb, A., Averill-Bates, D. A. 2005. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *The Journal of Cellular Physiology*. 205 (1). 47 – 57.
- ❖ Bhatia, M. 2005. Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life*. 57 (9). 603 – 606.
- ❖ Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: Ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6 (2). 161 – 193.

- ❖ Billen, L. P., Shamas-Din, A., Adrews, D. W. 2009. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*. 27 (1). S93 – S104.
- ❖ Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1). 45 – 55.
- ❖ Blondin, P., Sirard, M. A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristic for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 41 (1). 54 – 62.
- ❖ Bokoch, G. M. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annual Review of Biochemistry*. 72. 743 – 781.
- ❖ Bornslaeger, E. A., Wilde, M. W., Schultz, R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cAMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology*. 105 (2). 488 – 499.
- ❖ Boucher, M. J., Morisset, J., Vachon, P. H., Reed, J. C., Lainé, J., Rivard, N. 2000. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X (L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 79 (3). 355 – 369.
- ❖ Bouillet, P., Metcalf, D., Huang, D. C., Tarlinton, D. M., Kay, T. W., Köntgen, F., Adams, J. M., Strasser, A. 1999. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science*. 286 (5445). 1735 – 1738.
- ❖ Brackett, B. G. 1985. *In vitro* oocyte maturation and fertilization. *Journal of Animal Science*. 61 (3). 14 – 24.
- ❖ Braunstein, A. E., Goryanchenkova, E. V., Tolosa, E. A., Willhardt, I. H., Yefremova, L. L. 1971. Specificity and some other properties of liver serine sulphhydrase: evidence for its identity with cystathione-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 242 (1). 247 – 260.
- ❖ Brunet, S., Maro, B. 2007. Germinal vesicle position and meiotic maturation in mouse oocyte. *Reproduction*. 133 (6). 1069 – 1072.
- ❖ Buehr, M. 1997. The primordial germ cells of mammals: Some current perspectives. *Experimental Cell Research*. 232 (2). 194 – 207.

- ❖ Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Nordholm, L., Thøgersen, H., Xia, G., Wassmann O., Andersen, J. V., Guddal E., Roed, T. 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature*. 374 (6522). 559 – 562.
- ❖ Calarco, P. G. 1995. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Developmental Genetics*. 16 (1). 36 – 43.
- ❖ Caliendo, G., Cirino, G., Santaqada, V., Wallace, J. L. 2010. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): developmental of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53 (17). 6275 – 6286.
- ❖ 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 (3). C503 – C510.
- ❖ Carson, R. J., Konje, J. C. 2010. Role of hydrogen sulfide in the female reproductive tract. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 5 (2). 203 – 213.
- ❖ Cartron, P. F, Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S., Vallette, F. M. 2003. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *The Journal of Biochemical*. 278 (13). 11633 – 11641.
- ❖ Cooper, G. M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland. p. 689. ISBN: 0878931066.
- ❖ Cory, S., Adams, J. M. 2002. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer*. 2 (9). 647 – 656.
- ❖ Danial, N. N. 2007. Bcl-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research*. 13 (24). 7254 – 7263.
- ❖ Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116 (2). 205 – 219
- ❖ Dedieu, T., Gall, L., Crozet, N., Sevellec, C., Ruffini, S. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development*. 45 (3). 351 – 358.
- ❖ Dekel, N., Galiani, D., Sherizly, I. 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 56 (1 – 2). 115 – 121.

- ❖ Denault, J. B., Salvesen, G. S. 2002. Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*. 102 (12). 4489 – 4500.
- ❖ Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W. Koenderman, L., Coffey, P. J. 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology*. 10 (19). 1201 – 1204.
- ❖ Ding, J., Foxcroft, G. R. 1994. Epidermal growth factor enhances oocytes maturation in pigs. *Molecular Reproduction and Development*. 39 (1). 30 – 40.
- ❖ Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., Matzuk, M. M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383 (6600). 531 – 535.
- ❖ Dunphy, W. G., Newport, J. W. 1989. Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase. *Cell*. 58 (1). 181 – 191.
- ❖ Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*. 68. 383 – 424.
- ❖ Eckelman, B. P., Salvesen, G. S., Scott, F. L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Reports*. 7 (10): 988 – 994.
- ❖ Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6). 624 – 712.
- ❖ Ekoff, M., Kaufmann, T., Engström, M., Motoyama, N., Villunger, A., Jönsson, J. I., Strasser, A., Nilsson, G. 2007. The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells. *Blood*. 110 (9). 3209 – 3217
- ❖ Elsey, D. J., Fowkes, R. C. Baxter, G. F. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). *Cell Biochemistry and Function*. 28 (2). 95 – 106.
- ❖ Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. 1998. A caspases-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391 (6662). 43 – 50.
- ❖ Eppig, J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8 (4): 485 – 489.

- ❖ Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122 (6). 829 – 838.
- ❖ 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 and Biophysica Acta*. 1757 (9-10). 1301 – 1311.
- ❖ Erickson, G. F. 1986. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*. 4 (3). 233 – 254.
- ❖ Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T., Kimura, H. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*. 293 (5). 1485 – 1488.
- ❖ Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535 – 547.
- ❖ Feig, C., Peter, M. E. 2007. How apoptosis got the immune system in shape. *European Journal of Immunology*. 37 (1). S61 – S70.
- ❖ Felici, M. D. Carlo, A. D., Pesce, M., 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 (9). 908 – 915.
- ❖ Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124 (6). 745 – 754.
- ❖ Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50 (2). 225 – 232.
- ❖ Foxcroft, G. R., Hunter, M. G. 1985. Basic Physiology of maturation in the pig. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 33. 1 – 19.
- ❖ Fulka Jr., J., First, N. L., Moor, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41 – 49.
- ❖ Gao, S., Fu, W., Dürrenberger, M., De Gevter, C., Zhang, H. 2005. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62 (9). 1015 – 1024.

- ❖ Gautier, J., Solomon, M. J., Boother, R. N., Bazan, J. F., Kirschner, M. W. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 67 (1). 197 – 211.
- ❖ Gerhart, J., Wu, M., Kirschner, M. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmatic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *The Journal of Cell Biology*. 98 (4). 1247 – 1255.
- ❖ Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Gonik, B., Abu-Soud, H. M. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry*. 44 (34). 11361 – 11368.
- ❖ Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Gonik, B., Abu-Soud, H. M. 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 44 (7). 1295 – 1304.
- ❖ Greenfeld, C. R., Pepling, M. E., Babus, J. K., Furth, P. A., Falws, J. A. 2007. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*. 133 (5). 865 – 876.
- ❖ Grinberg, M., Sarig, R., Zaltsman, Y., Frumkin, D., Grammatikakis, N., Reuveny, E., Gross, A. 2002. tBID homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (14). 12237 – 12245.
- ❖ Grinsted, J., Byskov, A. G. 1981. Meiosis-inducing and meiosis-preventing substances in human male reproductive organs. *Fertility and Sterility*. 35 (2). 199 – 204.
- ❖ Grøndahl, G. 2008. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of *in vitro* maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Danish Medical Bulletin*. 55 (1). 1 – 16.
- ❖ Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J. 1998. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO Journal*. 17 (14). 3878 – 3885.
- ❖ Guo, F., Nimmanapalli, R., Paranawithana, S., Wittman, S., Griffin, D., Bali, P., O'Bryan, E., Fumero, C., Wang, H. G., Bhalla, K. 2002. Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood*. 99 (9). 3419 – 3426.

- ❖ Guraya, S. S. 2008. Cellular and molecular biology of human oogenesis, ovulation and early embryogenesis: fundamentals, biochemical and clinical implications in relation to infant disorder. New Age International Publisher. New Delhi. India. p. 142.
- ❖ Guthrie, H. D., Garrett, M. 1999. Factors regulating apoptosis during folliculogenesis in pigs. Proceedings of American Society of Animal Science. p. 15. Dostupné z: <<http://www.asas.org/symposia/9899proc/0933.pdf>>
- ❖ Hao, Z. D., Liu, S., Wu, Y., Wan, P. C., Cui, M. S., Chen, H., Zeng, S. M. 2009. Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca (2+) release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during in vitro ageing. *Reproduction, Fertility and Development*. 21 (2). 323 – 332.
- ❖ Hausmann, M., Leucht, K., Ploner, C., Kiessling, S., Villunger, A., Becker, H., Hofmann, C., Falk, W., Krebs, M., Kellermeier, S., Fried, M., Schölmerich, J., Obermeier, F., Rogler, G. 2011. Bcl-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (30). 26533 – 25540.
- ❖ Hayden, L. J., Goeden, H., Roth, S. H. 1990. Growth and development in the rat during sub-chronic exposure to low levels of hydrogen sulfide. *Toxicology and Industrial Health*. 6 (3-4). 389 – 401.
- ❖ Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliam, C., Schreiber, R. D., Korsmeyer, S. J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348 (62299). 334 – 336.
- ❖ Hsu, S. Y., Hsueh, A. J. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiological Reviews*. 80 (2). 593 – 614.
- ❖ Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A. J. 1997. Bok is a proapoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (23). 12401 – 12406.
- ❖ Hsu, Y. T., Wolter, K. G., Youle, R. J. 1997. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl-X (L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (8). 3668 – 3672.



- ❖ Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Fesik, S. W. 1996. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 384 (6610). 638 – 641.
- ❖ 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. *The EMBO Journal*. 17 (4). 1029 – 1039.
- ❖ Huang, D. C., Strasser, A. 2000. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 103 (6). 839 – 842.
- ❖ Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H. 2001. Structural basis of caspase by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell*. 104 (5). 781 – 790.
- ❖ Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 – 130.
- ❖ Hunter, M. G., Robinson, R. S., Webb, R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*. 82 (83). 461 – 477.
- ❖ Hussein, M. R. 2005. Apoptosis ovary: Molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*. 11 (2). 162 – 178.
- ❖ Hussein, M. R., Haemel, A. K., Wood, G. S. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*. 199 (3). 275 – 288.
- ❖ Hyttel, P., Madsen, I. 1987. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for transmission electron microscopy. *Acta Anatomica*. 129 (1). 12 – 14.
- ❖ Chang, B. S., Minn, A. J., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Thompson, C. B. 1997. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X<sub>L</sub> and Bcl-2. *The EMBO Journal*. 16 (5). 968 – 977.
- ❖ Chaube, S. K. 2001. Role of meiotic maturation regulatory factors in developmental competence of mammalian oocytes. *Health and Population – Perspectives and Issues*. 24 (4). 218 – 231.
- ❖ Chen, C. Q., Xin, H., Zhu, Y. Z. 2007. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacologica Sinica*. 28 (11). 1709 – 1716.

- ❖ Chen, X., Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2004. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathione-β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *The Journal Of Biological Chemistry*. 279 (50). 52082 – 52086.
- ❖ Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3 (3). 265 – 271.
- ❖ Irniger, S. 2006. Preventing fatal destruction: Inhibitor of the anaphase-promoting complex in meiosis. *Cell Cycle*. 5 (4). 405 – 415.
- ❖ Iwashita, J., Hayano, Y., Sagata, N. 1998. Essential role of germinal vesicle material in the meiotic cell cycle of *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (8). 4392 – 4397.
- ❖ Jeřeta, M., Petr, J., Krejčová, T., Chmelíková, E., Jílek, F. 2008. In vitro ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trochostatin A. *Zygote*. 16 (2). 145 - 152.
- ❖ Jha, S., Calvert, J. W., Duranski, M. R., Ramachandran, A., Lefter, D. J. 2008. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signalig. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 295 (2). H801 – H806.
- ❖ Jin, Z., El-Deiry, W. S. 2005. Overview of cell death signaling pathway. *Cancer Biology and Therapy*. 4 (2). 139 – 163.
- ❖ Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145 – 150.
- ❖ Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. 26 (3). 243 – 254.
- ❖ Kelekar, A., Thompson, C. B. 1998. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 8 (8). 324 – 330.
- ❖ Kelly, P. N., Strasser, A. 2011. The role Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*. 18 (9). 1414 -1424
- ❖ Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26 (4). 239 – 257.

- ❖ Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., Toyoda, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63 (3). 715 – 722.
- ❖ Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., Cheng, E. H. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by Bcl-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*. 8 (12). 1348 – 1358.
- ❖ Kim, N. H., Moon, S. J., Prather, R. S., Day, B. N. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 43 (4). 513 – 518.
- ❖ Kimura, H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants and Redox Signaling*. 12 (9). 1111 – 1123.
- ❖ Kimura, H. 2011. Hydrogen sulfide: its production, release, and functions. *Amino Acids*. 41 (1). 113 – 121.
- ❖ Kirkin, V., Joos, S., Zörnig, M. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica Acta*. 1644 (2-3). 229 – 249.
- ❖ Kluck, R. M., Esposito, M. D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M. J., Green, D. R., Newmeyer, D. D. 1999. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *The Journal of Cell Biology*. 147 (4). 809 – 822.
- ❖ Koopman, G., Reuterlingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., Van Oers, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cell undergoing apoptosis. *Blood*. 84 (5). 1415 – 1420.
- ❖ 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 and Differentiation*. 7 (12). 1166 -1173.
- ❖ Kreuger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., Kirchoff, S. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspases-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of Biological Biochemistry*. 276 (23). 20633 – 20640.

- ❖ Kreuger, D., Foerster, M., Mueller, K., Zeller, F., Slota-Huspenina, J., Donovan, J., Grundy, D., Schemann, M. 2010. Signaling mechanisms involved in the intestinal pro-secretory actions of hydrogen sulfide. *Neurogastroenterology and Motility*. 22 (11). 1224 – 1231.
- ❖ Kruip, T., Cran, D., Van Beneden, T., Dieleman, S 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vitro*. *Gamete Research*. 8 (1). 29 – 47.
- ❖ Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C., Colman, P. M. 2008. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death a Differentiation*. 15 (10). 1564 – 1571.
- ❖ Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8 (2). 119 – 125.
- ❖ Lefer, D. J. 2007. A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (46). 17907 – 17908.
- ❖ Lei, K., Davis, R. J. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (5). 2432 – 2437.
- ❖ Levonen, A. L., Lapatto, R., Saksela, M., Raivio, K. O. 2000. Human cystathionine- $\gamma$ -lyase: developmental and *in vitro* expression of two isoforms. *The Biochemical Journal*. 347. 291 – 295.
- ❖ Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94 (4). 491 – 501.
- ❖ Li, L., Rose, P., Moore, P. K. 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 51. 169 – 187.
- ❖ Li, W, Jin, H. F., Sun, J. H., Jian, P. J. Li, X. H., Tang, C. S., DU, J. B. 2009. Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Chinese Medical Journal*. 122 (24). 3032 – 3038.

- ❖ Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. W. H. Freeman and Company. New York. p. 973. ISBN: 9780716743668.
- ❖ Łowicka E., Bełtowski J., 2007. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - 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 Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94 (4). 481 – 490.
- ❖ Machev, N., Fuhrman G., Viville, S. 2004. Ontogenesis of primordial germ cells. *Médecine Sciences*. 20 (12). 1091 – 1095.
- ❖ Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., Del Soldato, P., Wink, D. A., Pagliaro, P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulphide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787 (7). 864 – 872
- ❖ Masters, S. C., Yang, H., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Fu, H. 2001. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular Pharmacology*. 60 (6). 1325 – 1331.
- ❖ Masui, Y., Clarke, H. J. 1979. Oocyte maturation. *International Review of Cytology*. 57. 185 – 282.
- ❖ McGee, E. A., Hsueh, A. J. W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21 (2). 200 – 214.
- ❖ Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocytes maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791 – 799.
- ❖ Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P., Burkhard, P. 2001. Structure of human cystathionine-β-synthase: a unique pyridoxal-5'-phosphate-dependent heme protein. *The EMBO Journal*. 20 (15). 3910 – 3916.
- ❖ Mérino, D., Giam, M., Hughes, P. D., Siggs, O. M., Heger, K., O'Reilly, L. A., Adams, J. M., Strasser, A., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P. 2009. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2like prosurvival proteins. *The Journal of Cell Biology*. 186 (3). 355 – 362.

- ❖ Miao, Y. L., Kikuchi, K., Sun, Q. Y., Schatten, H. 2009a. Oocyte aging: Cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*. 15 (5). 573 – 585.
- ❖ Miao, Y. L., Sun, Q. Y., Zhang, X., Zhao, J. G., Zhao, M. T., Spate, L., Prather, R. S., Schatten, H. 2009b. Centrosome abnormalities during porcine oocyte aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50 (8). 666 – 671.
- ❖ Miyano, T., Ogushi, S., Bui, H. T., Lee, J. 2007. Meiotic resumption and spindle formation of pig oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*. 24 (3). 92 – 98.
- ❖ Miyano, T., Manabe, N. 2007. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 63. 531 – 538.
- ❖ Miyashita, T., Reed, J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 80 (2). 293 - 299.
- ❖ Moore, P. K., Bhatia, M., Mochhala, S. 2003. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends in Pharmacological Sciences*. 24 (12). 609 – 611.
- ❖ 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 (3). 485 – 491.
- ❖ Morita, Y., Tilly, J. L. 1999. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. *Developmental Biology*. 213 (1). 1 – 17.
- ❖ Motlik, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 49 (2). 461 – 469.
- ❖ Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, 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-X<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*. 381 (6580). 335 – 341.
- ❖ Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Snyder, S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling*. 2 (68). re2.
- ❖ Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J., Kimura, H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB Journal*. 18 (3). 557 – 559.

- ❖ Nagata, S. 1994. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philosophical Transaction of the Royal Society B. Biological Sciences.* 345 (1313). 281 – 287.
- ❖ Nakano, K., Vousden, K. H. 2001. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell.* 7 (3). 683 – 694.
- ❖ Neuss, M., Monticone, R., Lundberg, M. S., Cheslev, A. T., Fleck, E., Crow, M. T. 2001. The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function. *The Journal of Biological Biochemistry.* 276 (36). 33915 – 33922.
- ❖ Newritová, R. 2001. Will knowledge of the mechanisms of apoptosis lead to new therapeutic procedures? (Article in Czech) *Časopis českých lékařů.* 140 (15). 460 – 464.
- ❖ Nicoreta, P., Leist, M., Ferrando-May, E. 1998. Intracellular ATP: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters.* (102 – 103). 139 – 142.
- ❖ Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 344 (6266). 503 – 508.
- ❖ O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., Huang, D. C. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO Journal.* 17 (2). 384 – 395.
- ❖ Oi, Y., Imafuku, M., Shishido, C., Kominato, Y., Nishimura, S., Iwai, K. 2001. Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. *The Journal of Nutrition.* 131 (8). 2150 -2156.
- ❖ Orrenius, S., Thivotovsky, B., Nicoreta, P. 2003. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular Cell Biology.* 4 (7). 552 – 565.
- ❖ Parrino, J., Hotchkiss, R. S., Bray, M. 2007. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. In *Emerging Infectious Diseases.* 13 (2). 191 – 198.
- ❖ Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R. Carson, R., J. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 7 (10). 1 – 9.

- ❖ Pepling, M. E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: Mammalian female germ cell development. *Genesis*. 44 (12). 622 – 632.
- ❖ Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1644 (2-3). 83 – 94.
- ❖ 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.
- ❖ Picton, R., Eggo, M. C. Merrill, G. A., Langmann, M. J., Sigh, S. 2002. Muconasal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut*. 50 (2). 201 – 205.
- ❖ Prather, R. S., Day, B. N. 1998. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*. 49 (1). 23 – 32.
- ❖ Rathmell, J. C., Fox, C. J., Plas, D. R., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M., Thompson, C. B., Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Molecular and Cellular Biology*. 23 (20). 7315 – 7328.
- ❖ Rich, T., Watson, C. J., Wyllie, A. 1999. Apoptosis: The germ of death. *National Cell Biology*. 1 (3). E69 – E71.
- ❖ Rong, L., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Shang, M., Guo, J. Z. 2006. Localization of cystathionine- $\beta$ -synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese od Medical Journal*. 119 (22). 1877 – 1883.
- ❖ Rong, L., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Shang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathione- $\beta$ -synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89 – 96.
- ❖ 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. *The EMBO Journal*. 16 (23). 6914 – 6925.
- ❖ Runge, K. E., Evans, J. E., He, Z. Y., Gupta, S., McDonald, K. L., Stahlberg, H., Primakoff, P., Myles, D. G. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane



and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental Biology*. 204 (1). 317 – 325.

- ❖ Salvesen, G. S., Renshaw, M. 2002. Apoptosome: The seven-spoked death machine. *Developmental Cell*. 2 (3). 256 – 257.
- ❖ Saran, S. 2000. Programmed cell death. *Current Science*. 78 (5). 575 – 586.
- ❖ Sasaki, K., Chiba, K. 2004. Induction of apoptosis in starfish eggs requires spontaneous inactivation of MAPK (extracellular signal-regulated kinase) followed by activation of p38 MAPK. *Molecular Biology of the Cell*. 15 (3). 1387 – 1396.
- ❖ Scaffidy, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E. 1998. Two CD95 (APO/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*. 17 (6). 1675 – 1687.
- ❖ Scorrano, L., Korsmeyer, S. J. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304 (3). 437 – 444.
- ❖ Shi, S., Li, Q. S., Li, H., Zhang, L., Xu, M., Cheng, J. L., Peng, C. H., Xu, C. Q., Tian, Y. 2009. Anti-apoptotic action of hydrogen sulfide is associated with early JNK inhibition. *Cell Biology International*. 33 (10). 1095 – 1101.
- ❖ Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*. 9 (3). 459 – 470.
- ❖ Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur-E-Kamal, A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., Mathew, R., White, E., Inoue, M. 2007. NBK/BIK antagonizes Mcl-1 and Bcl-X<sub>L</sub> and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes and Development*. 21 (8). 929 – 941.
- ❖ Skinner, M. K., Keski-Oja, K. G., Moses, H. L. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- $\beta$  which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 121 (2). 786 – 792.
- ❖ Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia. Praha. 448 s.
- ❖ Srilatha, B., Adakain, P. G., Li, L., Moore, K. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The Journal of Sexual Medicine*. 4 (5). 1304 – 13011.

- ❖ Srilatha, B., Adakain, P. G., Moore, K. 2006. Possible role in the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction – a pilot study. *European Journal of Pharmacology*. 535 (1-3). 280- 282.
- ❖ Stárka, L. 2009. Sulfan – další plynný hormon? *Chemické listy*. 103. 28 -31.
- ❖ Steegers-Theunissen, R. P., Steegers, E. A., Thomas, C. M., Hollanders, H. M., Peereboom-Stegeman, J. H., Trijbels, F. J., Eskes, T. K. 1993. Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. *Fertility and Sterility*. 60 (6). 1006 – 1010.
- ❖ Steuder, P. A., Peterson, B. J. 1984. Contribution of gaseous sulphur from salt marshes to the global sulphur cycle. *Nature*. 311. 455- 457.
- ❖ Steuerwald, N. M., Steuerwald, M. D., Mailhes, J. B. 2005. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Molecular Human Reproduction*. 11 (9). 623 – 630.
- ❖ Stipanuk, M. H., Beck, P. W. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*. 206. 267 – 277.
- ❖ Strauss, J., Barbieri, R. L. 2009. Yen and Jaffés Reproductive endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. 6 th ed. Saunders Elsevier. Philadelphia. p. 928. ISBN: 9781416049074.
- ❖ Sugiura, Y., Kashiba, M., Maruyama, K., Hoshikawa, K., Sakasi, R., Saito, K., Kimura, H., Goda, N., Suematsu, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 7 (5-6). 781 – 787.
- ❖ Sugiyama, T., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y. 2002. Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by proapoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*. 21 (32). 4944 – 4956.
- ❖ Suqira, K., Najito, K., Iwamori, N., Kagii, H., Goto, S., Ohashi, S., Naruoka, H., Yada, E., Yamanouchi, K., Toio, H. 2002. Activation of ribosomal S6 kinase (RSK) during porcine oocyte maturation. *Zygote*. 10 (1). 31 – 36.

- ❖ 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.
- ❖ Szabó, C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 6 (11). 917 – 935.
- ❖ Szabó, G., Veres, G., Radovits, T., Gero, D., Módis, K., Miesel-Gröschel, C., Horkay, F., Karck, M., Szabó, C. 2011. Cardioprotective effects of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 25 (2). 201 – 210.
- ❖ Tajima, K., Orisaka, M., Hosokawa, K., Amsterdam, A., Kosuji, F. 2002. Effects of ovarian theca cells on apoptosis and proliferation of granulosa cells: Changes during bovine follicular maturation. *Biology of Reproduction*. 66 (6). 1635 – 1639.
- ❖ Tan, B. H., Wong, P. T., Bian, J. S. 2009. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International*. 56 (1). 3 – 10.
- ❖ Tatemoto, H., Muto, N. 2001. Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following pathenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote*. 9 (1). 15 – 23.
- ❖ Teague, B., Asiedu, S., Moore, P. K. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology*. 137 (2). 139- 145.
- ❖ Thibault, C., Szöllösi, D., Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, Nutrition, Developmental*. 27 (5). 865 – 896.
- ❖ Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267 (5203). 1456 – 1462.
- ❖ Tilly, J. L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Review of Reproduction*. 1 (3). 162 – 172.
- ❖ Triapirux, U., Na-Ek, P., Kitthipongvivat, C., Chalajit, S. 2008. Methemoglobin and sulfhemoglobin levels in students of Walailak university. *Walailak Journal of Science and Technology*. 5 (2). 173 - 180.
- ❖ Tunguist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cyostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development*. 17 (6). 683 – 710.

- ❖ Uren, R. T., Dewson, G., Bonzon, C., Lithgow, T., Newmeyer, D. D., Luck, R. M. 2005. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: Electrostatic interaction can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (3). 2266 – 2274.
- ❖ Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. D2006 – D2022.
- ❖ Villa, P., Kaufman, S. H., Earnshaw, W. C. 1997. Caspases and caspases inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*. 22 (10). 388 – 393.
- ❖ Wagner, C. A. 2009. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator. *Journal Nephrology*. 22 (2). 173 – 176.
- ❖ Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16 (13). 1792 – 1798.
- ❖ Wang, Y., Cao, R., Liu, D., Chervin, A., Yuan, J., An, J., Huang, Z. 2007. Oligomerization of BH<sub>4</sub>-truncated Bcl-X<sub>L</sub> in solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 361 (4). 1006 – 1011.
- ❖ Warenycia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D., Dieken, F. P., 1989. Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology*. 38. 973 – 981.
- ❖ Warzych, E., Lechniak, D. 2005. Apoptosis in oogenesis and preimplantation embryo development of mammals (Article in Polish). *Biotechnologia*. 1 (68). 172 – 182.
- ❖ Wassarman, P. M. The mammalian ovum. 1988. In: Knobil, E., Neill, J. et al. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. p. 69 – 102.
- ❖ Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M. R., Maeda, N. 1995. Mice deficient in cystathionine-β-synthase: animal models for mild and severe homocystein(e)inemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (5). 1585 – 1589.
- ❖ Webb, G. D., Lim, L. H., Oh, V. M., Yeo, S. B., Cheong, Y. P., Ali, M. Y., El Oakley, R., Lee, C. N., Wong, P. S., Caleb, M. G., Salto-Tellez, M., Bhatia, M., Chan, E. S., Taylor,

- E. A., Moore, P. K. 2008. Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 324 (2). 876 – 882.
- ❖ Wenner, C. E. 2012. Argeting mitochondria as a therapeutic target in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 227 (2). 450 – 456.
  - ❖ Westergaard, L., Byskov, A. G., Van Look, P. F., Angell, R., Aitken, J., Swanston, I. A., Templeton, A. A. 1985. Meiosis-inducing substances in human preovulatory follicular fluid related to time of follicle aspiration and to the potential of the oocyte to fertilize and cleave *in vitro*. *Fertility and Sterility*. 44 (5). 663 – 667.
  - ❖ Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Rewiews of Reproduction*. 1 (2). 127 – 135.
  - ❖ Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B. S., Cheung, N. S., Halliwell, B., Moore, P. K. 2004. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite "scavenger"? *Journal Neurochemistry*. 90 (3). 765 – 768.
  - ❖ Wickramasinghe, D., Albertini, D. F. 1993. Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Current Topics Developmental Biology*. 28. 125 – 153.
  - ❖ Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., Huang, D. C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-X<sub>L</sub>, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes and Development*. 19 (11). 1294 – 1305.
  - ❖ World Health Organization. 2003. Hydrogen sulphide: Human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 53. [Citováno dne 23-1-2012] Dostupné z: <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad53.pdf>>
  - ❖ Yakovlev, A., G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., Faden, A. I. 2004. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (27). 28367 – 28374.
  - ❖ Yamashita, M., Mita, K., Yoshida, N., Kondo, T. 2000. Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: General and species-specific aspects. In: Meijer, L., Jezeguel, A., Duncommun, B. (eds.) *Progress in Cell Cycle Research*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. p. 115 – 129.

- ❖ 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, 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. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine- $\gamma$ -lyase. *Science*. 322 (5901). 587 – 590.
- ❖ Ye, J., Flint, A. P., Luck, M. R., Campbell, K. H. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125 (5). 645 – 656.
- ❖ 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 – 49.
- ❖ Young, J. M., McNeilly, A. S. 2010. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 140 (4). 489 – 504.
- ❖ Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M., Lockshin, R. A. 1995. Cell death: Programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death and Differentiation*. 2 (2). 87 – 96.
- ❖ Zangemeister-Wittke, U., Simon, H. U. 2001. Apoptosis-regulation and clinical implications. *Cell Death and Differentiation*. 8 (5). 537 – 544.
- ❖ 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, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B., Reed, J. C. 1996b. Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 16 (11). 6494 – 6508.
- ❖ Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Kormeyer, S. J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X<sub>L</sub>. *Cell*. 87 (4). 619 – 628.
- ❖ Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P. J., Yang, X., Fodke, R. A. 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (3). 338 – 344.

- ❖ Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sup>+</sup>ATP channel opener. *The EMBO Journal*. 20 (21). 6008 – 6016.
- ❖ Zheng, L. M., Zychlinsky, A., Liu, C. C., Ojcius, D. M., Young, J. D. 1991. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*. 112 (2). 279 – 288.
- ❖ Zhi, L., Ang, A. D., Zhang, H., Moore, P. K., Bhatia, M. 2007. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Leukocyte Biology*. 81 (5). 1322- 1332.
- ❖ Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen sulphide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Reviews of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75 – 82.
- ❖ Zong, W., X., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C., Yuan, J., Thompson, C. B. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 162 (1). 59 – 69.