

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE**

**FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**KATEDRA ZOOLOGIE A ANTROPOLÓGIE**

**VÝZNAM ÚLOHY SIRTUÍNU V REGULÁCI  
FUNKCIÍ OVARIÁLNYCH BUNIEK OŠÍPANÝCH**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Študijný program: biológia

Školiace pracovisko: Katedra zoológie a antropológie

Konzultant: Doc.RNDr.Alexander Sirotkin,DrSc.

**ABSTRACT**

DEKANOVÁ, Petra: *Význam úlohy sirtuínu v regulácii funkcií ovariálnych buniek ošípaných* (Diplomová práca) / Petra Dekanová- Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra zoológie a antropológie, Vedúci diplomovej práce: Doc.RNDr. Alexander Sirotkin, DrSc. Stupeň odbornej kvalifikácie: magister v odbore biológia, v skratke Mgr. Nitra: FPV, 2010.86s

V našej práci sme jednotlivými metódami biologického výskumu sledovali úlohu sirtuínu v priamej kontrole funkcií vaječníkov (proliferácie, apoptózy, sekrečných funkcií a folikulogenézy v ováriách). V jednotlivých kapitolách Prehľad literatúry sme si podrobnejšie opísali reprodukčný cyklus, vaječníky a ich funkciu, ozrejmili sme si doposiaľ zistené poznatky o sirtuíne a popísali sme vplyv vybraných rastových faktorov a hormónov na sekreciu, proliferáciu a apoptózu ne- ovariálnych a ovariálnych buniek ošípaných. Poznanie nového regulátoru reprodukčných funkcií a mechanizmov jeho pôsobenia pomôže pochopiť vzťahy medzi výživou a reprodukciou, zákonitosti kontroly reprodukčných procesov a využiť ich pre vytvorenie nových metód pre predpoveď stavu a riadenie reprodukčného systému v biotechnológii, zootechnike a medicíne.

Na základe nadobudnutých výsledkov počas našich experimentov (údaje imunocytochemickej analýzy) sme došli k nasledujúcim záverom:

1. FSH môže ovplyvňovať akumuláciu sirtuínu. Mal stimulačný vplyv na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných.
2. Oxytocín neovplyvňoval expresiu sirtuínu.
3. IGF-I mal inhibičný vplyv na akumuláciu sirtuínu.
4. p53 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval v granulóznych bunkách ošípaných.
5. NFkappaB/p50 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval.
6. NFkappaB/p65 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval.
7. Sirtuín je schopný modifikovať efekty FSH. Menil stimulačný efekt FSH na inhibičný. Schopnosť FSH stimulovať akumuláciu sirtuínu a schopnosť génovej konštrukcie pre

sirtuín modifikovať efekty FSH svedčí o to, že sirtuín môže byť sprostredkovateľom účinku FSH na ovária.

8. Sirtuín je tiež schopný modifikovať efekty oxytocínu a IGF-I.

9. Transkripčný faktor p53 v podmienkach overexpresie sirtuínu indukoval apoptózu i proliferáciu. Sirtuín menil inhibičný efekt p53 na stimulačný. Sirtuín môže byť zapojený do potlačenia p53.

10. NFkappaB/p50 v podmienkach overexpresie sirtuínu indukoval apoptózu. Proliferáciu neovplyvňoval.

11. NFkappaB/p65 v podmienkach overexpresie sirtuínu nemal vplyv na výskyt apoptózy a proliferáciu indukoval.

Kľúčové slová: Vaječníky. Reprodukcia. Hormóny. Regulačné látky. Sirtuín

## ABSTRACT

DEKANOVÁ, Petra: *Sirtuin important role in regulating functions of porcine ovarian cells* (Diplom work) / Petra Dekanová- Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta prírodných vied, Katedra zoológie a antropológie, Lector: Doc.RNDr.Alexander Sirotkin,DrSc. Degree qualification: magister degree in biology, at a glance Mgr. Nitra: FPV, 2010.86s

In our work we have followed different biological methods role of sirtuin in the direct control of ovarian function (proliferation, apoptosis and secretory function in ovarian folliculogenesis). The following chapters we describe in more reproductive cycle, ovaries and their function, we have clarified so far found evidence of sirtuin and we described the effect of selected growth factors and hormones secretion, proliferation and apoptosis of porcine non-ovarian and ovarian cells. Knowledge of the new regulator of reproductive and mechanisms of action will help to understand the relationship between nutrition and reproduction, reproductive patterns of control processes and use them to create new methods for forecasting the state and management of reproductive system in biotechnology and medicine zootechnics.

In the light of the results of our experiments (imunocytochemical data analysis), we came to the following conclusions:

- 1.FSH may effect the accumulation sirtuin. Stimulative effect on the expression of sirtuin ovarian cells in pigs.
- 2.Oxytocin did not affect on the expression sirtuin.
- 3.IGF-I had an inhibitory effect on the accumulation sirtuin.
- 4.p53 did not affect apoptosis and inhibited proliferation.
- 5.NFkappaB/p50 did not affect apoptosis and inhibited proliferation.
- 6.NFkappaB/p65 did not affect apoptosis and inhibited proliferation.
- 7.Sirtuin is able to modify the incentive effects FSH.The ability sirtuin to stimulate FSH accumulation of gene structure and the ability to modify the effects of FSH suggests that sirtuin may be the broker effect of FSH on the ovaries.
- 8.Sirtuin is able to modify the effects of oxytocin and FSH.

9. Transcription factor p53 in apoptosis induced conditions overexpression and proliferation. Alter sirtuin inhibitory effect on p53. Sirtuin may be involved in suppression p53.

10. NFkappaB/p50 in terms overexpression sirtuin induced apoptosis.

11. NFkappa/p65 did not influence the incidence and proliferation and induced apoptosis.

Keywords: Ovaries. Reproduction. Hormones. Regulatory agents. Sirtuin

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A ZNAČIEK

FSH- folikulostimulačný hormón

LH- luteinizačný hormón

OT- oxytocín

PGE- prostaglandín E

cAMP- cyklický adenosínmonofosfát

ATP- adenosíntrifosfát

AMP- adenosínmonofosfát

GTP- guanosíntrifosfát

IBMX- 3-izobutyl-1-methylxanthine

cGMP- cyklický guanosínmonofosfát

IGF-I- inzulínu podobný rastový faktor-I

EGF- epidermálny rastový faktor

cDNA- komplementárna DNA

siRNA- interferujúca RNA

miRNA- mikro RNA

LRRs- bielkoviny

FLIP- inhibičný proteín

XIAP- inhibítor apoptózy

CREBP- cAMP (adenosín 3-5 cyklický monofosfát) viazanie reakcie element-bielkovina

IHepG2-

ACTH- adenokortikotropný hormón

PGE2- prostaglandín E2

GnRH- gonadotropín- releasing hormón

GC- granulózne bunky

PBS- phosphate buffer saline (fosfátový tlmivý roztok)

BSA- bovinový sérový albumín

## **OBSAH**

ÚVOD	11
1.PROBLEMATIKA A PREHĽAD LITERATÚRY	13
1.1 Riadenie pohlavných funkcií samíc	13
1.2 Charakteristika reprodukčného cyklu	13
1.2.1 Regulácia cytodiferenciácie a vývoj folikulu	13
1.3 Ovária (vaječníky)	14
1.3.1 Oogenéza.	15
1.4 Neurohormonálne riadenie reprodukcie	15
1.4.1 Cesty pôsobenia hormónov	18
1.5 Cyklické nukleotidy i ich úloha ako vnútrobunkoví sprostredkovatelia pri riadení reprodukcie	19
1.5.1 Cyklický adenosínmonofosfát (cAMP)	19
1.5.2 Cyklický guanosínmonofosfát (cGMP)	20
1.6 Hormonálne regulátory ovariálnych funkcií	22
1.6.1 FSH- folikulostimulačný hormón	22
1.6.1.1 Štruktúra	22
1.6.1.2 Receptory	23
1.6.1.3 Vplyv na apoptózu.	23
1.6.1.4 Vplyv na proliferáciu	24
1.6.1.5 Vplyv na sekréciu	24
1.6.1.6 Mechanizmus účinku FSH	24
1.6.2 Rastový faktor IGF-1	25
1.6.2.1 Štruktúra	25
1.6.2.2 Receptory	25
1.6.2.3 Vplyv na apoptózu	26
1.6.2.4 Mechanizmus účinku IGF-I	26
1.6.3 Oxytocín	27
1.6.3.1 Štruktúra	27
1.6.3.2 Vplyv na apoptózu	27
1.6.3.3 Vplyv na proliferáciu	27
1.6.3.4 Vplyv na sekréciu	28
1.6.3.5 Mechanizmus účinku oxytocínu	28
1.6.4 Prostaglandín F	28
1.6.4.1 Štruktúra	28
1.6.4.2 Vplyv na apoptózu	29
1.6.4.3 Vplyv na proliferáciu	29
1.6.4.4 Vplyv na sekréciu.	29
1.6.4.5 Mechanizmus účinku prostaglandínu F	29
1.7 Vnútrobunkové signálne dráhy	30
1.7.1 p53	30
1.7.1.1 Štruktúra	30
1.7.1.2 Vplyv na apoptózu	30
1.7.1.3 Vplyv na proliferáciu	30
1.7.1.4 Vplyv na sekréciu	31

1.7.1.5 Mechanizmus účinku p53	31
1.7.2 p50 a p65	31
1.7.3 CREB.	32
1.7.3.1 Štruktúra	32
1.7.3.2 Vplyv na apoptózu	32
1.7.3.3 Vplyv na proliferáciu	33
1.7.3.4 Vplyv na sekréciu	33
1.7.3.5 Mechanizmus účinku CREB	33
1.7.4 Bax- apoptický peptid	33
1.7.4.1 Štruktúra	
1.7.4.2 Vplyv na apoptózu	34
1.7.4.3 Vplyv na proliferáciu	34
1.7.4.4 Vplyv na sekréciu	34
1.7.4.5 Mechanizmus účinku Bax	34
1.7.5 Kaspáza 3	35
1.7.5.1 Úloha kaspázy3 v apoptóze	35
1.8 Sirtuíny	36
1.8.1 Charakteristika a mechanizmus účinku sirtuínov	36
1.8.2 Klasifikácia a druhy sirtuínov	37
1.8.2.1 SIRT1	37
1.8.2.2 SIRT2	37
1.8.2.3 SIRT3	37
1.8.2.4 SIRT4.	37
1.8.2.5 SIRT5	38
1.8.2.6 SIRT6	38
1.8.2.7 SIRT7	38
1.8.3 Úloha sirtuínov v kontrole reprodukcie na rôznych úrovniach a ich vplyv na reprodukčné procesy	38
1.8.4 Terapeutické ciele sirtuínu na liečbu chorôb starnutia	39
1.8.5 Sirtuíny ako možné činitele v spomalovaní procesu starnutia	40
2. CIEĽ PRÁCE	42
3. MATERIÁL A METODIKA.	43
3.1 Odber a spracovanie biologického materiálu	43
3.1.1 Izolácia, kultivácia a transfekcia granulóznych buniek	43
3.1.2 Príprava kultúr na analýzy a analytické metódy	44
3.1.2.1 Fluorescenčná mikroskopia	44
3.1.2.2 RIA	47
3.1.2.3 Western Blotting	47
3.1.2.4 Imunocytochemické spracovanie preparátov	47
3.1.3 RIA/EIA metóda	47
4. VÝSLEDKY	49
5. DISKUSIA	54
6. ZÁVER	62
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	64
ZOZNAM TABULIEK	

Tabuľka č.1 Vplyv transfekcie cDNA konštrukciami vyvolávajúcej overexpresiu p53, NF kappaB (p50 a p65) sirtuínu a ich kombinácií na výskyt apoptózy ( expresiu caspázy3) a proliferáciu ( expresiu MAPK/ERK 1,2) kultivovaných buniek ošipovaných



Tabuľka č.2 Vplyv hormónov FSH, oxytocínu a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných

Tabuľka č.3 Vplyv IGF-I a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných

## ÚVOD

V súčasnej dobe „ biotechnologickej reprodukcie“ majú významné postavenie biotechnológie reprodukcie. Súčasný potenciál poznatkov z oblasti biotechnológie reprodukcie umožňuje dokonalejšie využívať prirodzenú reprodukčnú schopnosť živočíchov.

Reprodukcia je integrovaný proces zabezpečujúci priebeh života a tým zachovanie druhu, má dve veľké oblasti na seba naväzujúce a vzájomne sa prelínajúce. Prvá oblasť- primárna zahŕňa tvorbu pohlavných buniek, zaistenie vývoja vzniknutej zygoty a neskôr embrya a plodu až do ukončenia intracelulárneho vývoja. Druhá oblasť- sekundárna zahŕňa zabezpečenie stretnutia dvoch pohlavných buniek ako základných a neoddeliteľných aktérov v procese rozmnožovania v podobe spojenia samca a samice.

Keďže vieme, že tieto dve oblasti zahŕňujú veľké množstvo dejov, preto má byť zabezpečené aj dostatočné riadenie týchto funkcií. Regulácia procesu reprodukcie je zabezpečená týmito rôznymi mechanizmami: dôležitú úlohu tu zohráva genetická informácia viazaná na gén, okrem toho, CNS plní úlohu centrálnej regulácie prebiehajúcich dejov a je prepojená s neuroendokrinným, endokrinným systémom regulácie. Hormonálna sústava je teda neoddeliteľnou súčasťou reprodukcie každého jedinca..

Poznanie nového regulátoru reprodukčných funkcií a mechanizmov jeho pôsobenia pomôže pochopiť vzťahy medzi výživou a reprodukciou, zákonitosti kontroly reprodukčných procesov a využiť ich pre vytvorenie nových metód pre predpoveď stavu a riadenie reprodukčného systému v biotechnológii, zootechne a medicíne.

U všetkých cicavcov prebieha a reguluje sa reprodukčný proces v podstate rovnako, respektívne podobným spôsobom, líši sa len v niektorých detailoch, ktoré sú charakteristické pre daný druh. V súčasnom období je pri chove hospodárskych zvierat dôležitý cieľ zlepšiť reprodukčné ukazovatele a tak zefektívniť chov. Zároveň poznanie regulácii reprodukcie môže pomôcť vyriešiť reprodukčné problémy ľudí. Preto výskum nových regulátorov reprodukcie vrátane nedávno identifikovaného nového regulátora rôznych biologických dejov sirtuínu môže byť zaujímavé z ekonomického a biologického hľadiska.

Z doposiaľ zistených výsledkov o sirtuíne je známe, že sirtuíny regulujú metabolizmus, hormonálnu sekréciu, bunkový cyklus, bunkovú diferenciáciu. Sú tiež ochrancom proti bunkovému stresu, poškodeniu DNA, apoptóze, starnutiu a zápalu. Plnia úlohu aj pri neurodegeneratívnych ochoreniach a zohrávajú dôležitú úlohu v predlžovaní dĺžky života. Zapojenie sirtuínu do priamej regulácie vaječnikov, bunkovej proliferácie, apoptózy a sekréčnej aktivity ovárií zatiaľ nebolo preskúmané. V našej práci sme sledovali vplyv regulátorov sirtuínu na samičiu pohlavnú sústavu (konkrétne na ovariálne bunky vaječnikov).

# **1. PROBLEMATIKA A PREHĽAD LITERATÚRY**

## **1.1 Riadenie pohlavných funkcií samíc**

Pohlavné funkcie a celý reprodukčný proces u samíc sú riadené neurohumorálne. Základné riadenie pohlavnej činnosti je uskutočňované osou hypotalamus- hypofýza-gonády. Významná úloha pri tom patrí gonadotropným hormónom adenohipofýzy a ovariálnym hormónom (Kováčik a i.1996).

Množstvo a vzájomný pomer jednotlivých gonadotropných hormónov rytmicky kolíše a dochádza k ich vzájomnej predominácii, čím je určovaná periodičnosť pohlavného a reprodukčného cyklu. Z ovariálnych hormónov sa na riadení pohlavnej činnosti podieľajú estrogény, steroidy a peptidy napr. hormón žltého telieska- progesterón (Hanč a Padr,1982).

Regulácia ovariálnej činnosti je zabezpečená gonadotropnými hormónmi hypofýzy, intraovariálnymi regulačnými faktormi a spätnoväzbovými účinkami ovariálnych hormónov na vyplavenie hypofýzových gonadotropínov. Do skupiny intraovariálnych faktorov zaradíme hlavne rôzne druhy peptidových hormónov. Medzi ovariálne steroidy môžeme zaradiť progesterón, androgény a estrogény (Nečas,1974).

## **1.2 Charakteristika reprodukčného cyklu**

### **1.2.1 Regulácia cytodiferenciácie a vývoj folikulu**

Počas vývoja folikulu a žltého telieska dochádza k špecifickým zmenám v expresii génov, jednak pre tvorbu hormonálnych receptorov, čím bunky získavajú schopnosť odpovedať na intraovariálne aj extraovariálne signály a jednak pre tvorbu enzýmov potrebných pre biosyntézu jednotlivých typov ovariálnych látok (Chrenek,2002).

Na ováriách prebiehajú zmeny na granulóznych bunkách (závislých od peptidov, FSH, LH, a iných produkujúcich progestagény, androgény, estrogény a steroidné peptidy), ďalej na intersticiálnych bunkách závislých od (LH, PGF 2 alfa) a produkujúcich (androgény), tiež na žltom teliesku (produkcia progesterónu a steroidných peptidov) a tiež sa diferencujú folikulárne bunky a oocyt. Tieto zmeny na vaječníkoch podmieňujú vznik hlavných fáz reprodukčného cyklu kde dochádza k celkovým zmenám na pohlavných orgánoch s cieľom prípravy a uskutočnenia ovulácie, párenia a oplodnenia oocytov (Paulov 1980, Chrenek 2002).

### 1.3 Ovária ( vaječníky)

Vaječníky sú párové pohlavné žľazy uložené v panvovej, prípadne v brušnej dutine. Tvar a veľkosť vaječníkov sa mení podľa vyvíjajúcich sa Graafových folikulov a žltého telieska.

Graafove folikuly vznikli ešte počas vnútromaternicového vývinu (Hašek 1968, Paulov 1980).

Z veľkého počtu folikulov však dozreje len nepatrná časť a v nich oplodnenia schopné vajíčka- 20 až v100 vajíčok za celý ľudský život. Ostatné folikuly zanikajú najmä v čase uhasínania pohlavnej aktivity (Paulov 1980).

Tvorba vajíčok v Graafových folikuloch reguluje hypofýzový hormón FSH (folik ulostimulačný) a LH (luteinizačný). Pri určitom pomere nastáva ovulácia (prasknutie folikulu a vyplavovanie vajíčka do vajíčkovodu). Vyplavené vajíčko vo vajíčkovode sa posúva smerom k maternici. Estrogény spomaľujú pohyb vajíčka, progesterón ho urýchľuje (Sekla 1962, Chrenek.2002).

Oplodnenie vajíčka nastáva u človeka zvyčajne v strednej časti vajíčkovodu. Miesto, kde sa vajíčko zachytí sa volá žlté teliesko (corpus luteum). Funkciu žltého telieska (zadržiavanie vajíčka) podnecuje hormón hypofýzy, ako aj progesterón utvárajúci sa v žltom teliesku (Nečas 1974, Paulov 1980).

Progesterón zo žltého telieska utlmuje vylučovanie folikulostimulačného hormónu z hypofýzy, a tým aj ovuláciu. Žlté teliesko sa premení na belavé (corpus luteum albicans). Pravidelné vyplavovanie vajíčka z folikulov a jeho dočasné uhniesdenie v maternici sa nazýva ovulačný cyklus. Keď bolo vajíčko oplodnené, žlté teliesko sa premení na žlté teliesko gravidity (corpus luteum graviditatis), v ktorom sa utvára viac progesterónu. Ten

blokuje dozrievanie vajíčok vo folikuloch, udržiava oplodnené vajíčko v organizme a zabezpečuje normálny vývin nového jedinca (Stanek 1952, Klika a i.1987).

### **1.3.1 Oogenéza**

Samičie pohlavné bunky vajíčka vznikajú vo folikuloch vaječníka. Vajíčka sa začínajú vyvíjať zo základných buniek oogónií, ktoré sa v kôrovej časti ovária mitoticky delia, v rozmnožovacej fáze (Nečas 1974, Rosypal 1987, Chrenek 2002).

V rastovej fáze vznikajú pomerne veľké guľovité bunky, oocyty 1. rádu, stále s diploidným počtom chromozómov, ktoré získavajú žltok. Oocyty 1. rádu ležia v kortikálnej vrstve ovária, kde sú obklopené folikulovými bunkami, tzv. primordiálny folikulus. Folikulové bunky sa v ďalšom vývoji rozmnožia a vytvárajú niekoľko vrstiev a vo vnútri folikulu vzniká dutinka vyplnená tekutinou. Vytvára sa tak sekundárny folikulus (Graafov folikul), v ktorom dozrieva vajíčko (Nečas 1974, Klika a i.1987).

V zrecej fáze (tzv. ovariálny cyklus, ktorý sa periodicky opakuje u žien každých 28 hodín) prekonávajú oocyty 1. rádu v Graafových folikuloch dve zrecie delenia. Oocyty 1. rádu prekonávajú najskôr redukčné delenie (meiózu) a vznikajú z nich oocyty 2. rádu, ktoré majú haploidný počet chromozómov. Z každého oocytu 1. rádu vznikne však len jeden oocyt 2. rádu. V zrecej fáze vznikajú ekvačným delením oocytu 2. rádu zrelé vajíčka. Z jedného oocytu 2. rádu vzniká opäť iba jedna zrelá pohlavná bunka, vajíčko (ovulum) s polovičným počtom chromozómov. Druhé zrecie delenie prebieha až po ovulácii. Nakoniec vzniká z jednej pôvodnej diploidnej bunky oogónie iba jedna haploidná zrelá pohlavná bunka- vajíčko, schopné oplodnenia (Nečas 1974, Paulov 1980, Rosypal 1987, Chrenek 2002).

## **1.4 Neurohormonálne a hormonálne riadenie reprodukcie**

Reprodukcia je regulovaná vzájomnou spoluúčinnosťou nervového a endokrinného systému.

Cieľom interakcie týchto dvoch systémov je iniciovať, koordinovať a regulovať všetky reprodukčné funkcie (Petrovičová a kol.,2006).

Spojenie regulácie nervovej a hormonálnej prebieha na úrovni hypotalamu a hypofýzy. Predný lalok hypofýzy- adenohipofýza je párová žľaza s vnútornou sekréciou. Vylučuje šesť dôležitých hormónov, z ktorých väčšina riadi činnosť ostatných žliaz s vnútornou sekréciou. Preto má adenohipofýza ústredné postavenie v hormonálnych reguláciách. Hormóny predného laloka hypofýzy ovplyvňujú veľa funkcií a orgánov. Vylučovanie väčšiny hormónov predného laloka hypofýzy riadia hormóny vylučované hypotalamom.

V hypotalame sa tvoria peptidy s malou molekulovou hmotnosťou pôsobiace na adenohipofýzu ako regulačné hormóny uvoľňujúce (liberíny), alebo inhibujúce (statíny). Niektoré adenohipofýzové hormóny sú riadené liberínmi, iné statínmi a niektoré oboma typmi týchto neurohormónov (Uhrín a Uhrín 1995, Vodrážka 1996).

Na to aby hormón mohol spôsobiť špecifickú zmenu v cieľovom tkanive, musia bunky tohto tkaniva obsahovať špecifické receptory. Až spojenie hormónu so špecifickým receptorom vyvolá požadovanú reakciu resp. biologickú odozvu v cieľovom tkanive. Regulácia vylučovania hormónov sa uskutočňuje na základe tzv. spätných väzieb, ktoré môžu byť pozitívne alebo negatívne (Petrovičová a kol., 2006).

Medzi najdôležitejšie hormóny, ktoré sa podieľajú na reprodukcii sú estrogény, gestagény a prostaglandíny.

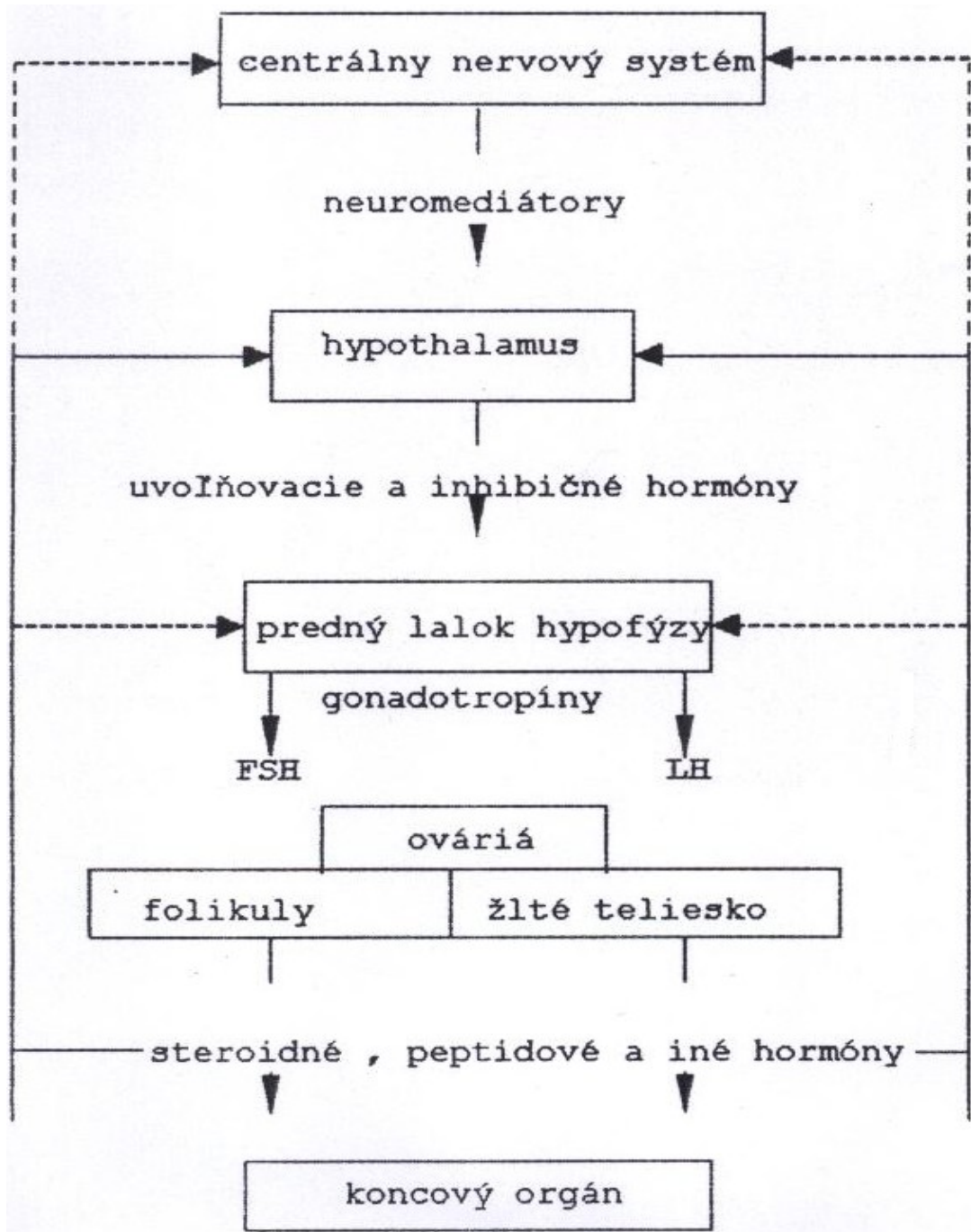
Estrogény sú z chemického hľadiska steroidy. Ako prekursor pri ich vzniku slúži acetát, z ktorého je bunkami secernujúcimi steroidy vytváraný cholesterol, tento je transportovaný do mitochondrií, v ktorých sa z neho cez pregnenolon vytvára progesterón. Ten je prekursorom pre testosterón, z ktorého sa potom vytvárajú estrogény. Estrogény vznikajú v Graafových folikulách vaječníkov, konkrétne sú vytvárané bunkami stratum granulosum a theca interna zrejúceho folikulu, ako aj jeho interstíciom (Petrovičová a kol., 2006).

Gestagény sú steroidné zlúčeniny, ktoré majú v molekule 21 atómov uhlíka a štruktúrne sú veľmi podobné steroidom kôry nadobličiek. Tvorja sa najmä v žltom teliesku (corpus luteum) a tiež v placentе počas gravidity. Účinok progesterónu nadväzuje na zmeny vyvolané estrogénmi, resp. predpokladá ich spolupôsobenie (Petrovičová a kol., 2006).

Prostaglandíny patria medzi tkanivové hormóny. Chemicky sú to mastné kyseliny. Je známych viac ako 20 derivátov, ale pre reprodukčné procesy sú významné najmä PGE2

a do istej miery aj PGE. Tvorja sa vo vaječníku, v maternici, v embryonálnych obaloch (Petrovičová a kol.,2006).

Tab.č.1: Schéma hormónovej regulácie žliaz a orgánov u samíc





### 1.4.1 Cesty pôsobenia hormónov

Všetky hormóny na cieľové bunky nepôsobia priamo, ale ich pôsobenie býva sprostredkované rôznymi štruktúrami a látkami. Podľa Kováčika (1996) vlastný účinok hormónov je sprostredkovaný:

- receptormi
- bunkovými membránami
- enzýmami

Pričom hormonálna aktivita v bunke sa nemusí obmedziť iba na jeden z uvedených mechanizmov, ale hormón môže pôsobiť prostredníctvom viacerých mechanizmov a to buď súčasne, alebo postupne. Charakteristickým znakom hormónov je ich špecifický účinok podmienený prítomnosťou receptorov. Receptory pre hormóny sú bielkovinové molekuly, ktoré majú špecifickú aktivitu voči molekule hormónu, a preto hormón silne viažu. Väzba na receptor je podmienkou účinku hormónu v bunke. Receptory pre peptidové hormóny sú na bunkových membránach a pre steroidné hormóny vo vnútri jadra na bunkovom cytozole (Kováčik,1996).

V zhode so systémovou teóriou, že hormón je viazaný na bielkovinu, ktorá je jeho prenášačom a plní funkciu akéhosi antigénu. Podľa tohto sú hormóny malými informačnými molekulami. Túto schopnosť môžu získať tieto molekuly až po väzbe na veľké špecifické molekuly bielkovín asi tak, ako u antigénnych štruktúr t. j. nastáva zmena molekulárneho komplexu (Hanč a Pádr,1982).

Základné časti mechanizmu vplyvu peptidových hormónov na pohlavnú sústavu samíc môžeme popísať na takzvanej teórii troch poslov (Kliment a i.,1989).

Podľa tejto teórie na cytoplazmatickej membráne buniek je špecifický receptor, ktorý je napojený na vnútrobunkového sprostredkovateľa ( napr. na adenylátcyklázu, cAMP ad.).

Hormón kolujúci v krvi je ako tzv. 1. posol so zachytením na tomto receptore , tým je sprostredkovateľ napr. adenylátcykláza bunkovej steny podnietená k tvorbe tzv. 2. posla ( napr. proteínkináza A), ktorá ovplyvnením RNK jadra cez špecifické transkripčné faktory reguluje syntézu bielkovín v ribozómoch endoplazmatického retikula.

Táto bielkovina je špecifickým nosičom špecifických enzýmov regulujúcich tvorbu 3. posla napríklad hormónu, ktorý prestúpi do krvi, z ktorej sa zachytí na špecifickom

receptore cieľových buniek, v ktorých ovplyvnením RNK jadra nastávajú zmeny vyvolané hormónom (Kliment a i.,1989).

Druhými poslami môže byť cAMP a ním aktivovaná proteinkináza A, cGMP a proteinkináza G, Ca<sup>2+</sup> a ním aktivovaná fosfolipáza, proteinkináza C, diacylglycerol, inositolfosfát, MAP kináza a iné (Kliment a i.,1989).

## **1.5 Cyklické nukleotidy a ich úloha ako vnútrobunkoví sprostredkovatelia pri riadení reprodukcie**

### **1.5.1 Cyklický adenosínmonofosfát (cAMP)**

Intracelulárne efekty veľkej skupiny peptidových hormónov je treba odvodiť od nepriameho pôsobenia cez druhého posla cAMP. Prvé zmienky o cyklických nukleotidoch boli zamerané v roku 1957 Shuterlandom , kde ich popisuje ako mediátorov pôsobenia adenylázovej cyklázy a je inaktivovaná fosfodiesterázou- enzýmom štiepiacim cAMP (Hanč a Pádr 1982,Musil 1990).

Cyklický nukleotid stimuluje špecifické bunkové reakcie podľa typu buniek. Spoločným mechanizmom pre jeho pôsobenie v eukaryotických bunkách je aktivácia enzýmov- kináz bielkovín, ktorá je závislá od fosforylácie kľúčových bielkovinových substrátov v cieľových bunkách. Kinázy sú enzýmy, ktoré prenášajú funkčné skupiny. Najvýznamnejšou skupinou kináz sú proteinkinázy, ktoré prenášajú fosfátovú skupinu na proteín za vzniku esterovej väzby. Tento typ, kináz prenáša fosfátovú skupinu z ATP na bielkovinové reťazce, kde sa viaže na serín a treonín. Fosforylované bielkoviny môžu byť znovu zbavené fosforylačnej skupiny pôsobením špecifických fosfatáz (Hanč a Pádr 1982,Vodrážka 1996,Sirotkin 1998).

Kreeze a i. (1993) popisuje systém adenylátcykláza- cAMP. Táto kaskáda dejov pozostáva z niekoľkých základných krokov.

1. Aktivácia membránovej adenylátcyklázy komplexom hormón- receptor.
2. Tvorba cyklického AMP z ATP účinkom adenylátcyklázy.
3. Aktivácia proteinkináz (fosfokináz), ktoré katalyzujú fosforyláciu rôznych proteínov (zväčša enzýmov) a tým ich aktivujú.

Ďalej hovorí, že proces má takýto sled:

1. Hormón sa naviaže na príslušný receptor a pôsobením tohto komplexu sa potom za sprostredkujúceho pôsobenia tzv. 6- proteínov naviaže guanozín trifosfát (GTP) na regulačnú podjednotku adenylcyklázy, čím dochádza k aktivácii katalytickej podjednotky tohto enzýmu.

Proces dezaktivácie adenylátcyklázy nastáva hydrolyzou naviazaného GTP na GDP účinkom guanozín fosfatázy. Tieto skutočnosti sa vysvetlili prítomnosťou ďalších regulačných bielkovín, ktoré sprostredkujú stimuláciu alebo inhibíciu adenylátcyklázy komplexom hormón- receptor. Tieto látky sa nazývajú 6- proteíny.

2. Aktivovaná adenylátcykláza potom štiepi substrát ATP-  $Mg^{2+}$  za vzniku cAMP. Adenylátcykláza môže byť aktivovaná nielen systémom hormón- receptor, aj farmakologickými prípravkami (napr. Forskolínom). Malé množstvo cAMP sa rozkladá fosfodiesterázou. Takisto sa rozkladajú zvýšené množstvá cAMP vytvorené po stimulácii hormónom, ako náhle tento prestane pôsobiť. Mechanizmus hormónového receptora spojeného s adenylátovou cyklázou bol aplikovaný na rôzne bunky reprodukčného systému, kde cAMP má úlohu od regulácie hypotalamovými faktormi až po účinnosť hormónov v cieľových tkanivách. V rôznych fázach a na rôznych hladinách regulácie reprodukčného procesu boli pozorované rozdiely vo fyziologických reakciách. Fosfodiesterázu inhibujú metylxantíny (kofein, teofylín, IBMX), čím sa predlžuje či nahrádza hormonálny účinok, lebo vtedy sa cAMP pomalšie rozkladá.

3. V jednotlivých bunkách potom cAMP katalyzuje prenos fosfátu (t.j. fosforyláciu) z ATP na serínové zvyšky v sekvenciách rôznych bielkovín, ktoré sa týmto aktivujú. Sú to jednak početné enzýmy a tiež aj neenzýmové bielkoviny jadra, ribozómov, tubulov a membrán (Sibley a i.,1988).

4. Enzýmy, ktoré vykonávajú spomenutú fosforyláciu sa nazývajú cAMP závislé proteinkinázy A. Ich aktivácia je vlastne prvým krokom reťaze účinku cAMP na bunkový metabolizmus (Kreeze a i.,1993).

Predpokladá sa, že aj hladiny fosfodiesterázy môžu byť hormonálne regulované. Biologické efekty a efekty hormónov sprostredkované s cAMP v rôznych tkanivách sú uvedené v tabuľke, z ktorej je dôležitý pre reprodukciu vplyv LH a FSH (Hanč,Pádr 1982).

### **1.5.2 Cyklický guanozínmonofosfát (cGMP)**

V niektorých tkanivách je špecifická kináza bielkovín citlivá voči analógom cGMP s podobným predpokladaným mechanizmom účinku regulácie ako u cAMP. Napríklad, intracelulárny cGMP sprostredkováva uvoľňovanie lyzozómových enzýmov v neutrofiloch, zatiaľ čo cAMP ich môže inhibovať (Hanč,Pádr 1982).

Dumont (1983) demonštroval, že tvorenie cGMP je stimulované rôznymi hormonálnymi a nehormonálnymi faktormi.

Z hormonálnych stimulátorov cGMP sú známe gonadotropíny, RH, oxytocín, prostaglandíny. Je dokázané, že niektoré hormonálne a iné faktory zvyšujúce cGMP v tkanivách sa vyžadujú  $Ca^{2+}$ , naopak, rôzne hormonálne efekty cGMP na rôznych úrovniach sú zmenšené alebo zrušené, keď sa zníži koncentrácia extracelulárneho vápnika. Nešpecifikovaný inhibitor fosfolipázy zredukuje rast hladiny cGMP v tkanivách. Tým pádom efekty hormónov a iných faktorov na cGMP sú sprostredkované ďalším druhým poslom, systémom vápnik- fosfolipáza.

V skratke môžeme povedať, že väčšina hormónov riadi fyziologické funkcie nepriamo, cez receptory, ktoré pomocou vnútrobunkových sprostredkovateľov (cAMP, cGMP,  $Ca^{2+}$ , inozitol- fosfátov a iných) regulujú špecifické proteinkinázy- stimulátory fosforylácie a aktivity vnútrobunkových proteínov (Leung a Steele 1992,Urban a Veldhuis 1992).

V reprodukčných procesoch sú tieto špecifické proteinkinázy ( každý jeden vnútrobunkový sprostredkovateľ má svoju, buď jednu, alebo viacej proteinkináz, ktoré stimulujú fosforyláciu) sprostredkovateľom regulácie dozrievania oocytov ( Sato a Koide 1987), produkcie ovariálnych peptidových a steroidných (Paton a Colins 1992) hormónov, určujúcich sekrečné a generatívne funkcie reprodukčných systémov a rastu (Sirotkin 1998).

V týchto kapitolách som sa venovala reprodukčnému cyklu, funkcii vaječníkov a všeobecne o vaječníkoch, aby som priblížila bližšie problematiku mojej práce. Ďalej som bližšie opísala neurohormonálne riadenie reprodukcie, vnútrobunkové sprostredkovatele riadenia reprodukcie a vývoj folikulu.

V ďalších kapitolách si popíšeme vybrané rastové faktory a hormóny, ich vplyv na proliferáciu a apoptózu a ozrejníme si doposiaľ zistené poznatky o sirtuine.

## **1.6 Hormonálne regulátory ovariálnych funkcií**

Reprodukčné procesy sú regulované rôznymi extracelulárnymi a intracelulárnymi látkami. Extracelulárne látky ( hormony, rastové faktory a iné) regulujú reprodukčné procesy prostredníctvom kontroly expresie zodpovedajúcich génov. Po aktivácii špecifických receptorov naviazaním ligandu – extracelulárnej látky- sa v bunke spúšťa kaskáda reakcií, ktorá vedie ku aktivácii alebo deaktivácii zodpovedajúcich transkripčných faktorov (Uhrín a Uhrín,1995).

Na prenose signálu vnútri bunky sa zúčastňuje množstvo signálnych látok, ktoré medzi sebou interagujú a zabezpečujú tak šírenie signálu. Intracelulárne mechanizmy účinku extracelulárných látok sú zložité a nedostatočne preskúmané, a ich hlbšie pochopenie umožní efektívnejšie riadenie reprodukčných procesov (Chrenek,2002).

Základné funkcie ovárií (proliferácia, apoptóza, sekrečná aktivita, folikulo-,oo-,a embryogenéza a predispozícia k rakovine) sa regulujú nielen známymi gonadotropínmi, a steroidnými hormónmi a prostaglandínmi, ale aj menej známymi nonapeptidovými hormónmi oxytocínom a jeho analogmi, rastovým hormónom, indolamínmi serotonínom a melatonínom, metabolickými hormónmi leptínom a ghrelínom, a rastovými faktormi IGF-1, EGF, trombopoietínom a ich väzbovými proteínmi (Vilček a kol.,2002).

Manipulácie s hormónmi mali za následok aj zmeny v akumulácii cyklických nukleotidov, niektorých proteín kináz a transkripčných faktorov. Blokovanie produkcie alebo účinku týchto vnútrobunkových látok farmakologickými blokátormi alebo cDNA, siRNA a miRNA génovými konštrukciami podstatne menili ovariálne funkcie a modifikovali efekty peptidových hormónov a rastových faktorov. Hormóny a rastové faktory regulujú ovariálne funkcie cez proteínkinázy, transkripčné faktory a s nimi spojené gény a RNA.

Regulácia sa reguluje stovkami regulačných látok. Z hľadiska nášho výskumu medzi významnými regulačnými látkami a vnútrobunkovými signálnymi dráhami patria tieto:

### **1.6.1 FSH- folikulostimulačný hormón**

#### **1.6.1.1 Štruktúra**

FSH je polypeptid, ktorý pozostáva z nekovalentne spojených podjednotiek  $\alpha$  a  $\beta$ .  $\alpha$  podjednotka pozostáva z 92 aminokyselín a  $\beta$  podjednotka pozostáva zo 111 aminokyselín (Henry a Norman, 2003). Molárna hmotnosť FSH -  $\alpha$  je 15 500 a FSH -  $\beta$  18 500. Nositeľom hormónálnej špecificity je podjednotka  $\beta$  (Obr. 6) (Hane a Padr, 1982).

#### 1.6.1.2 Receptory

Extracelulárna doména FSH receptora je charakteristická striedaním LRRs repetícií pozostávajúcich zo štrukturálnych jednotiek - striedajúcich sa  $\beta$ -listov a  $\alpha$ -helixov (naznačených krúžkami). Transmembránová doména pozostáva zo siedmych hydrofóbnych segmentov prestupujúcimi bunkovú membránu a sú spojené intra a extracelulárnymi slučkami. V bunkovej membráne je sedem hydrofóbnych úsekov. Intracelulárna doména je homologická len na N - terminálnom úseku (Simoni a kol., 1997).

Účinky: Je dokázané, že FSH vplýva na apoptózu, proliferáciu a sekréciu.

#### 1.6.1.3 Vplyv na apoptózu:

FSH stimuluje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - žiadne vplyvy nie sú dokázané
- v reprodukčných tkanivách - v granulóznych bunkách ľudí (Maillet a kol., 2005) v preovulačných folikuloch krýs stimulovaním kaspázy 3 a 7 (Yacobi a kol., 2004), v bovinných kumulárnych bunkách (Pomar a kol., 2004).

FSH inhibuje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - stimulovaním intracelulárnych anti - apoptotických proteínov - XIAP a FLIP (Jiang a kol., 2003).
- v reprodukčných tkanivách - v Sertolihových bunkách (Suomalainen a kol., 2004), v spermatických bunkách počas spermiogenézy (Cui a kol., 2004), u ľudských luteinizovaných granulóznych buniek (Sifer a kol., 2003), v ľudských epteliálnych ovariálnych bunkách stimulovanú cisplatínom (Huang a kol., 2003), v granulóznych bunkách inhibuje apoptózu počas folikulogenézy vo folikuloch ošipovaných (Guthrie a Garrett, 2001), v preovulačných folikuloch krýs (Tsai-Turton a Luclerer, 2006), v ováriách ošipovaných a :kráv (Guthrie a Garrett, 2001), v granulóznych bunkách malých folikulov ošipovaných v synergizme s tyroidným hormónom (Asahara a kol., 2003).

#### 1.6.1.4 Vplyv na proliferáciu:

FSH stimuluje proliferáciu:

- v nereprodukčných tkanivách - žiadné vplyvy neboli doteraz dokazané
- v reprodukčných tkanivách - v synergizme s IGF-I v granulóznych bunkách krýs (Kanzaki a kol., 1996) vo folikulárnych bunkách ovárií, čo sa prejavuje rastom Graafových folikulov (Paulov, 1980), u folikulov oviec (Campbell a kol., 1995), testikulárnych buniek (Mi a kol., 2004), Sertoliho buniek v semenníkoch u ľudí (Meachem a kol., 2005), testikulárnych germinálnych buniek v embryách kučiat v kombinácii s testosterónom (Mi a kol., 2004), Sertoliho buniek u ľudí (Meachem, 2005), v kombinácii so 17 $\beta$ -estradiolom v bunkovej kultúre ovariálnych embryonálnych germinálnych buniek u kurčiat (Xie a kol., 2004), u epiteliálnych ovariálnych nádorových bunkových línií - OVCAR3 - FSHR (Sheng a kol., 2003), Sertoliho buniek u sumca - *Clarias gariepinus* (Shulz a kol., 2003), premeiotických spermatogenných buniek u gonadotropín deficičných mýší v rekombinantnej – rhFSH forme (Shingh a Handelsman, 1996).

#### 1.6.1.5 Vplyv na sekréciu:

FSH stimuluje sekréciu:

- v nereprodukčných tkanivách - vplyvy nie sú preskúmané
- v reprodukčných tkanivách - OT v ovariálnych bunkách žien (Kumaresana a kol., 1983), progesterónu v granulóznych bunkách byvolov (Vinze a kol., 2001), ovariálneho androstenediónu, inhibínu a estradiolu u oviec (Campbell a kol., 1998), estradiolu -17 $\beta$  - E2 v synergizme s IGF-I u potkanov (Zachov a Woolery, 2002), progesterónu v kumulárnych bunkách oocytov u ošípaných (Shimada a Terada, 2002), oxytocínu vo folikuloch ošípaných (Sirotkin a kol., 1998).

#### 1.6.1.6 Mechanizmus účinku FSH

FSH sa viaže na receptor, ktorý má veľký extracelulárny N - koniec a malý cytoplazmatický C - koniec. Naviazanie ligandu spôsobí zmenu v transmembránovej oblasti receptora, ktorá sa prejaví v schopnosti interakcie C - konca receptora s G-proteínom, ktorý aktivuje adenylát cyklázu, vzniká cAMP, ktorý sa viaže na príslušné proteínkinázy (napr. pteínkinázu C alfa - (Sheng a kol., 2003), protínkinázu - PKA, MAP-kinázu - p38 MAP kinázu, ERK kinázu, PI3-K - kinázu aktivovanú guanín

nukleotid výmennými faktormi (GEFs), fosfoinozítid dependentnú proteín kinázu (PDK1), PKB-kinázu a v granulóznych bunkách na SGK - (glukokortikoid-indukovanú kinázu) a GSK-3 (glykogén syntetázovú kinázu-3) (William H Walker a Jing Cheby, 2005). Kinázy fosforylujú skupinu bielkovín CREBP (cAMP response element binding proteins). CREBP aktivuje transkripciu rôznych enzýmov. FSH môže účinkovať aj cez PI-D6-PKC systém (Henry a Norman, 1999), PI3-K cestu a fosfatidylinozitol 3 - kinázovú/Akt cestu. (Min a kol., 2004). FSH môže stimulovať vstup  $Ca^{2+}$  do buniek , ktorý sprostredkovaný cAMP a možno modifikáciou plochy  $Ca^{2+}$  kanálov proteínkinázou- PKA. Zvýšená  $Ca^{2+}$  hladina môže aktivovať kalmodulín a CaM kinázy, ktoré fosforylujú transkripčný faktor CREB (Wiliam H.Walker a Jing Cheby,2005).

Funkcie FSH v organizme samíc:

- stimuluje rast a dozrievanie folikulov
- proliferáciu buniek stratum granulosum
- spolu s LH zahájenie produkcie estrogénov (Petrovičová a kol.,2006).

## 1.6.2 Rastový faktor IGF - I

### 1.6.2.1 Štruktúra

Zrelý IGF-I je peptid zložený z B a A domén, ktoré sú homologické s B a A reťazcom inzulínu. Viaceré vodíkové väzby formované medzi N-terminálnym regiónom B reťazca a vnútorný A –disulfidický región A -reťazca sú hlavné faktory .stability vnútorných disulfidických väzieb -A-reťazca a faktory pre zamedzenie disulfidickej izomerizácie. (Yun, 2004). Na rozdiel od inzulínu nie sú domény A a B proteolyticky rozštiepené, ale zostávajú viazané so zrelým peptidom doménou C analogickou C peptidu inzulínu (Pombo a kol., 2001).

### 1.6.2.2 Receptory

IGF-I receptory sú členovia superrodiny receptora tyrozín kináz - (RTKs). IGF-I receptory su diméry pozostávajúce z dvoch extracelulárnych a podjednotiek a dvoch transmembránových  $\beta$  podjednotiek obsahujúcich tyrozín kinázovú doménu. $\alpha$  podjednotky obsahujú ligandové väzbové miesta. Všetky receptory tyrozín kináz - RTKs sú dimérne alebo oligoméne v ligand - aktivovanej forme. Receptory utvárajú najmenej dva hlavné



epitopy tak, že čiastočne sa prekrývajú s dimérne a hexamérne formovanými povrchmi inzulínovej molekuly. (De Meyts a kol., 2004) .

Účinky - Je dokázané, že IGF-1 vplýva na apoptózu, proliferáciu a sekréciu

#### 1.6.2.3 Vplyv na apoptózu:

IGF-1 stimuluje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - V ľudských HepG2 a Huh-7 hepatómových bunkových líniiach (Alexia a kol., 2004), v kultivovaných periodontálnych ligamentárnych fibroblastoch - PDLF (Han a kol., 2003).

- v reprodukčných tkanivách - vo folikuloch krýs a iných zvierat (Marhstrom a kol., 2002).

IGF-1 inhibuje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - v adenokarcinómových bunkových líniiach (Bogazzi a kol., 2005), podocytoch u detí (Bridgewater a kol., 2005), vplyvom adriamycínu v srdcových H9C2 svalových bunkách ľudí, v lymfocytoch indukovanú cez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jimenez Del Rio a kol., 2006), v ľudských a krýsich hladkosvalových vaskulárnych bunkách indukovanú staurosporínom (Allen a kol., 2005), (Chae a kol., 2004), v chondrogénnych ATDC5 - mtR3 bunkách u ľudí (Koike a kol., 2003) .

- v reprodukčných tkanivách - v žltých telieskách ošípaných (Ptak a kol., 2004).

#### 1.6.2.4 Mechanizmus účinku IGF-I

Väzbu ligandu aktivuje tyrozín kinázovú oblasť, dochádza k autofosforylácii tyrozínového zvyšku a k fosforylácii príslušného enzýmu. Následne sa aktivuje receptor tyrozín kinázy s autofosforylovanými tyrozínovými zvyškami v membráne a C - terminálnej doméne, ktorá je bočnou časťou tyrozín kinázovej domény. Tieto zvyšky osobitne Tyr - 950 slúžia na zníženie miest pre členov inzulín receptorového substrátu a Shc upravovacie rodiny proteínov. Ďalšia fosforylácia týchto proteínov receptormi tyrozín kinázy dovoľí IRS a Shc proteínom spojiť sa s faktorom Grb2/Soc a p85 regulovaním podjednotky fosfatidylinozitol 3 kinázy (vedie k aktivácii mitogén aktivovanej proteín kinázy - MAPK). IGF-1 môže účinkovať aj cez proteínkinázy C-ε , P13 (Allen, 2005), proteínkinázu B (AKT/PKB) (Bridgewater, 2005), fosfatidylinozitol 3 - kinázu (Koike, 2003), fosfoinositid 3 - kinázu - (PI-3K) (Jimenez Del Rio a kol., 2006) MEK1/ERK-kinázu, P13-K-kinázu, p38-MAPKkinázu, a aj cez Ca<sup>2+</sup>/kalmodulín kinázu a kalcineurín.

(Maldonado a kol., 2005). Konečný cieľ kináz je pôsobenie na viaceré potencionálne transkripčné faktory napr. NF –  $\kappa$ B, p53 (Jimenez Del Rio, 2006) a CREB (Maldonado a kol., 2005), ktoré sa zúčastňujú na génovej expresii. (Pombo a kol., 2001).

### 1.6.3 Oxytocín

#### 1.6.3.1 Štruktúra

Oxytocín je deväť aminokyselinový peptid (Cys<sup>1</sup>\_ Tyr<sup>2</sup>\_ Ileu<sup>3</sup> - Gln<sup>4</sup>\_ Asn<sup>5</sup>- Cys<sup>6</sup>\_ Pro<sup>7</sup> - Leu<sup>8</sup>- Gly<sup>9</sup> \_NH<sub>2</sub>) produkovaný len u cicavcov (Henry a Norman, 2003) .

Receptory - Receptor pre oxytocín je polypeptid pozostávajúci z 388-aminokyselín.

Má 7 transmembránových domén (Kimura a kol., 1992).

Účinky - V doterajšej dobe sú dokázané viaceré účinky na proliferáciu, apoptózu a sekréciu.

#### 1.6.3.2 Vplyv na apoptózu

Oxytocín stimuluje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - žiadne vplyvy nie sú doteraz preskúmané
- v reprodukčných tkanivách - v germinálnych ovariálnych bunkách cicavčích novorodencov (Marzona a kol., 2001).

#### 1.6.3.3 Vplyv na proliferáciu

Oxytocín stimuluje proliferáciu

- v nereprodukčných tkanivách - v synergizme s vazopresínom v nadorových bunkách pľúc (Péqueux a kol., 2004).

- v reprodukčných tkanivách - ovariálnych buniek u ošípaných (Makarevich a kol., 2004)

oxytocín inhibuje proliferáciu:

- v reprodukčných tkanivách - neoplastických buniek oboch typov - epiteliálnych buniek - (prsňovitých), buniek nervových a kostných základov (Cassoni a kol., 2004).

- v reprodukčných tkanivách - V ľudských ovariálnych karcinómových bunkách in vitro a in vivo (Morita a kol., 2004) .

#### 1.6.3.4 Vplyv na sekréciu

Oxytocín, stimuluje

sekreciu:

- v nereprodukčných tkanivách - histamínu u krýs (Kjar a kol., 1995), stimuluje uvoľňovanie

adrenokortikotropínu z epifýzy krýs (Schlosser a kol., 1994), IGFBP-3 a PGE v ovariálnych granulóznych bunkách ošípaných (Kjar a kol., 1995).

- v reprodukčných tkanivách - progesterónu v žltých telieskach hovädzieho dobytku (Miyamoto a Schams, 1991).

oxytocín inhibuje sekréciu:

- v nereprodukčných tkanivách - ACTH a PRL indukovanú stresom u krýs (Kjar a kol., 1995).

- v reprodukčných tkanivách - prostaglandínu F<sub>2</sub> alfa a prostaglandínu F v myometriu ošípaných (Franczak a kol., 2004).

#### 1.6.3.5 Mechanizmus účinku oxytocínu

Vplyv oxytocínu v neovariálnych bunkách môže byť zprostredkovaný cez proteínkinázu C (Hu a kol., 2004), MAPK/JERK1/2 p90<sup>RSK</sup> - kinázu, fosfolipázu C - PLC a Ca<sup>2+</sup> - závislé signálne cesty. (Péqueux a kol., 2004). Signál sa ďalej prenáša cez transkripčné faktory napr. cez indukibilný transkripčný faktor (iTFs) (Luckman, 1995).

V ovariálnych bunkách môže účinkovať zvyšovaním koncentrácie PGF<sub>2</sub> alfa, v hladkej svalovine (Viggiano a kol., 1989). Iné signálne dráhy neboli doteraz v ováriách preskúmané.

Funkcie oxytocínu v organizme samíc.

- kontrakcia myoepitelových buniek maternice a uľahčenie pôrodu
- kontrakcia myoepitelových buniek mliečnej žľazy (Petrovičová a kol., 2006).

### 1.6.4 Prostaglandín F

#### 1.6.4.1 Štruktúra

Ľudských PGFS je 3 alfa-hydroxysteroid dehydrogenáza (3 alpha-HSD) typ II a má PGFS aktivitu a 3 alfa - HSD aktivitu (Komoto a kol., 2004).

Receptory - FP receptor je člen sedemčlennej transmembránovej receptorovej rodiny

a je premostený guanozín trifosfát - väzbovým proteínom (Komoto a kol., 2004).

#### 1.6.4.2 Vplyv na apoptózu

prostaglandín F stimuluje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - v ľudských melanocytoch (Scott a kol., 2005), v lymfocytoch ľudí.(Nencioni a kol., 2003).

- v reprodukčných tkanivách – vplyvy boli neznáme

Prostaglandín F inhibuje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách – v radiačne poškodených krvných epitelových bunkách (Houchen a kol., 2003).

- reprodukčných tkanivách – žiadne vplyvy nie sú zistené

#### 1.6.4.3 Vplyv na proliferáciu

Prostaglandín F stimuluje proliferáciu:

- v nereprodukčných tkanivách - u klonálnych osteoblastických MC3T3-E1 buniek u ľudí (Hakeda a kol., 1991), u glomerulárnych mezangiálnych buniek (Mene a Dunn, 1990).

- v reprodukčných tkanivách - žiadne vplyvy neboli doteraz preskúman

Prostaglandín F inhibuje proliferáciu:

- v nereprodukčných tkanivách - fibroblastov cez tumor nekrosis faktor (Hori a kol., 1991).

- v reprodukčných tkanivách - granulóznych buniek ovarií u sliepok (Li a Tang, 1995).

#### 1.6.4.3 Vplyv na sekréciu

Prostaglandín F stimuluje sekréciu:

- v nereprodukčných tkanivách - LH v hypotalamo-hypofýzovom systéme počas estru králikov

(Carlson a kol., 1977).

- v reprodukčných tkanivách - inzulínu - podobného rastového faktora väzbového proteínu 3 IGFBP - 3 v ľudských granulóznych - luteálnych bunkách (Sarvas a kol., 1994), oxytocínu v granulóznych a prvotných luteálnych bunkách oviec (Denning-Kendall a Wathes, 1994), estradiolu u žaby - *Rana esculenta* (Gobbetti a Zerani, 1993).

#### 1.6.4.4 Mechanizmus účinku prostaglandínu F

V neovariálnych bunkách môže PGF účinkovať cez Ca<sup>2+</sup> cesty,

Rho - kinázovú dráhu (Hasegawa a kol., 2006), kalcineurín (CaN) signálnu dráhu in vivo a

in vitro (Jiang a kol., 2005). Proteinkinázy pôsobiť môžu cez transkripčný faktor CREB v hladkosvalových bunkách u ľudí (Fukuyama a kol., 2005).

V ovariálnych bunkách má PGF funkčné prepojenie s NO (Basini a Tomanini, 2001). V ľudských luteálnych bunkách je účinok PGF sprostredkovaný cez fosfolipázu C (PLC), diacylglycerol- proteín kinázu C a MAPK signálnu dráhu (Tai a kol., 2001).

## **1.7 Vnútrobunkové signálne látky**

### **1.7.1 p53**

#### **1.7.1.1 Štruktúra**

Ľudský p53 je fosfoproteín ktorého core-doména má od 102 do 292 AK zvyškov s molekulovou váhou 53000, (Yang a kol., 1998). Ma tetramérnu formu.

Účinky - Je už dokázané, že p53 ovplyvňuje aj procesy, ktoré sú predmetom nášho záujmuapoptózu, proliferáciu a sekréciu.

#### **1.7.1.2 Vplyv na apoptózu**

Cez p53 je stimulovaná apoptóza:

- v nereprodukčných tkanivách - v rôznych typoch buniek (Yang a kol., 1998 ), napr. v T - lymfocytoch (Amsterdam a kol., 2003), v karcinómových bunkách žalúdka (Pan a kol., 2005), v ľudských MCF-7 - prsníkových nádorových bunkách indukovaná estrogénom (Zhang a kol. 2004), v lymfocytoch u ľudí (Suzuki a kol. 2003).

- v reprodukčných tkanivách - v granulóznych ovariálnych bunkách (Sasson a kol. 2003), v ľudských granulóznych bunkách cez p53/cAMP systém (Hosokawa a kol. 1998).

#### **1.7.1.3 Vplyv na proliferáciu**

Cez p53 je stimulovaná proliferácia:

- v nereprodukčných tkanivách - v niektorých cicavčích bunkách (Asselin a kol.,2000).

- v reprodukčných tkanivách – podporuje lyteolýzu žltého telieska (Moeljono a kol.,1976),stimuluje v reprodukčnom trakte syntézu prostaglandínu (Grazul a kol.,1989), p53 potláčajú proliferáciu buniek vaječníkov, podieľajú sa na kontrole ovariálnych

peptidových hormónov (OT)

Cez p53 je inhibovaná proliferácia:

- v nereprodukčných tkanivách - pľúcnych nádorových buniek (Pataer a kol., 2006)
- v reprodukčných tkanivách - endometriálnych nádorových bunkových línií - (SPEC-2) sprostredkovaná adenovírus indukovanou smrťou (Rarnondetta a kol., 2000).

#### 1.7.1.4 Vplyv na sekréciu

- v nereprodukčných tkanivách - vazopresínu a katecholamínov v hypotalame (Chrnigovskaya a kol. 2005) a p53 môže byť regulátor génovej transkripcie paratyroid hormón príbuzného peptidu (PTHrP) u myši (Motokura, T. a kol. 1995).

- v reprodukčných tkanivách - podieľa sa na kontrole sekrécie peptid.hormónov a prostaglandínu

Vplyvy na apoptózu, proliferáciu a sekréciu v ovariálnych bunkách ošípaných nie sú známe.

#### 1.7.1.5 Mechanizmus účinku p53

- Vplyvom MAPK (mitogén aktivovanej proteínkinázy), proteínkinázy C (PKC), RNI (reaktívneho nitrogenného intermediátora) môže p53 pôsobiť cez transkripčné faktory napr. NF-kappaB a HIF-1 (hypoxia indukibilný faktor-1) (Asselin a kol., 2000).

## 1.72 NFkB p50 a p65

NF- kappa B je komplex transkripčného faktora obsahujúci 2 proteíny (p50 a p65) viazané na 3 proteín známy ako I kappa B, ktorý je normálne prítomný v cytoplazme. Typický NF- kappa B sa skladá z p50 a p65 proteínu, ktorý je viazaný na I kappa B. Aktivácia NF- kappa B zahŕňa degradáciu I kappa B, výsledkom čoho je translokácia p50/p65 a vznik heterodiméru, ktorý sa väzbou na kappa B elementy zvyšuje transkripciu zápalových génov ako napr. Inducibilná syntetáza oxidu dusičného (iNOS). Indikátor aktivácie NF- kappa B je, že sa zvýši pomer p65 oproti I kappa B proteínu (Ruben et al., 1992).

Prezentujeme dôkaz, že subjednotka p65 je potenciónálny transkripčný aktivátor v zjavnom nedostatku subjednotky p50, v dôsledku demonštrácie in vitro výsledkov, že

p65 môže vzájomne pôsobiť s DNA (Ruben et al., 1992). NF-kappa B bol zapletený do najrôznejších biologických procesov, ako je metabolizmus, zápal, bunkové senescence, a starnutie (Natoli, 2008).

NF-kappa B sa skladá z piatich členov, podjednotiek, ktoré tvoria homo-alebo heterodimery: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 a NF- $\kappa$ B2. Všetky sú transkripčný faktor NF-kappa B. NF-kappa B reguluje expresiu množstva génových produktov, ktoré sú zapojené do ovládania rôznych bunkových procesov. NF-kappa B kontroluje zápalové a imunitné odpovede, angiogézu, stimuluje aj proliferáciu a apoptózu, aktivuje diferenciáciu, adhéziu a migráciu non-ovariálnych buniek (Ghosh et al., 1998; Barkett a Gilmore, 1999; Chen et al., 2000, Perkins, 2004; Nishikori, 2005; Wu et al., 2007; Sethi et al., 2008).

Ako concernés reprodukcie, je NF-kappa B vyjadrený vo vysokých koncentráciách v Sertolihových bunkách v semenníkoch hlodavcov (Delfino a Walker, 1998; 1999), kde sa reguluje množstvo génov zapojených do spermatogenézy (Delfino et al., 2003, Hong et al., 2003) a inhibuje steroidogézu (Hong et al., 2004).

Okrem toho môže mať anti-apoptotické účinky na granulózne bunky u potkana, inhibovať katabolizmus progesterónu u potkanov (Xiao et al., 2002; Telleria et al., 2004, Wang et al., 2002), ale nemá vplyv na sekréciu progesterónu v luteálnych ľudských bunkách (Gonzales-Navarrete et al., 2007).

Podjednotka p65 je zodpovedná za väčšinu funkcií. NF-kappa B by mohla regulovať proliferáciu ovariálnych buniek a uvoľňovať hormóny vaječníkov inak ako progesterón. Stále nie je známe, či má NF-kappa B vplyv na reprodukčné procesy v ošípaných.

### **1.7.3 CREB**

#### **1.7.3.1 Štruktúra**

CREB je transkripčný faktor, polypeptid, ktorý pozostáva z kináza indukibilnej domény (KID),

krátkej domény CBP a KIX domény (Shaywitz a kol. 2000).

*Účinky* - Pre tento transkripčný faktor sú známe tieto vybrané účinky.

#### **1.7.3.2 Vplyv na apoptózu**

Cez CREB je stimulovaná apoptóza:

- v nereprodukčných tkanivách - cez cAMP, ktorý inhibuje TCR - induktor apoptózy cez PKA/CREB závislé mechanizmy (Refojo a kol., 2003), v pľúcnych epiteliálnych bunkách (Barlow C. A. a kol., 2006), v kardiálnych myocytoch vplyvom IGF-1 (Maldonado, C. a kol. 2005).

- v reprodukčných tkanivách - žiadne vplyvy neboli doteraz uvádzané

#### 1.7.3.3 Vplyv na proliferáciu

Cez CREB je stimulovaná proliferácia:

- v nereprodukčných tkanivách - ľudských krvných buniek pri leukémii (Shankar a kol., 2004), lebečných MC3T3 E1-osteoblastických buniek u novonarodených myší (San Miguel a kol. 2005), overexpresia CREB-u vyúsťuje ku zvýšenej proliferácii buniek kostnej drene pri leukémii u ľudí (Shankar, a kol. 2005), u T84 črevných karcinomových buniek ľudí vplyvom  $17\beta$ -Estradiolu (E2) (Hannesty a kol. 2005).

- v reprodukčných tkanivách - vplyvy CREB na reprodukčné funkcie neboli doteraz objasnené

#### 1.7.3.4 Vplyv na sekréciu

Cez CREB je stimulovaná sekrécia:

- v nereprodukčných tkanivách - melatonínu v epifýze u cicavcov (Gupta a kol., 2004), (TRH - tyrotropín stimulačného hormónu) u ľudí (Lechan a Fekete a kol., 2004), glia maturačného faktora - GMF, neurotropínov v embryonálnych mozgoch krýs (Zaheer, A. a kol. 2001).

- v reprodukčných tkanivách - žiadne vplyvy sa doteraz neuvádzali a nie sú dokázané.

### 1.7.4 Bax - apoptotický peptid

#### 1.7.4.1 Štruktúra

Bax je peptid, ktorý pozostáva z 9 alfa helixov C - terminálny alfa helix obsahuje hydrofóbnu priehradku, ktorá má heterodimérnu formáciu opačnú Bcl-2 rodine (Rodina kol., 2004).

Účinky - Vplyvy na apoptózu su viaceré, na proliferáciu a sekréciu neboli doteraz pozorované



#### 1.7.4.2 Vplyv na apoptózu

Bax stimuluje apoptózu:

- v nereprodukčných tkanivách - V SKOV3 bunkách transfekovaných s Bax u ľudí (Rodina kol., 2004), v ľudských mozgových tumoroch (Konstantinidou a kol., 2005).
- v reprodukčných tkanivách – priame dôkazy o vplyve Bax na apoptózu v ováriách nemáme.

#### 1.7.4.3 Vplyv na proliferáciu

- v nereprodukčných tkanivách – Bax sa prejavuje svojim anti – proliferatívnym efektom v mezangiálnych bunkách ľudí (Marti, 1997).
- v reprodukčných tkanivách – vplyvy ešte čakajú na objasnenie

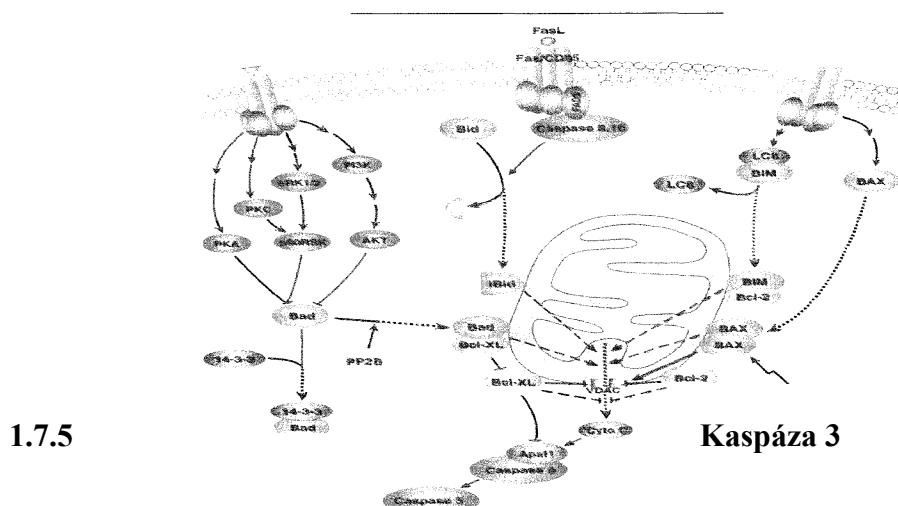
#### 1.7.4.4 Vplyv na sekréciu

Žiadne vplyvy nie sú dokázané. V ováriách nie sú známe vplyvy Bax na sekréciu.

#### 1.7.4.5 Mechanizmus účinku Bax

Bax stimuluje uvoľňovanie cytochrómu C z mitochondrií, ktorý následne aktivuje kaspázy 9 a 3. (Obr.3). Tie aktivujú kaspázou aktivovanú DNA-ázu II. (CAD), ktorá spôsobuje fragmentáciu DNA. Fragmentácia DNA môže byť stimulovaná aj cez DNA fragmentačný faktor (DFF) (Nagata a kol., 2003).

Obr.3 Mechanizmus účinku Bax na apoptózu (Hostino, 2001).



Kaspázy sú kľúčovými mediátory programovanej bunkovej smrti (apoptózy). Medzi nimi, kaspázy-3 je často aktivovaný smrti proteázy, katalyzujúce špecifické štiepenie mnohých kľúčových bunkových proteínov. Avšak, špecifické požiadavky tejto (alebo iné), kaspázy v apoptóze zostali do značnej miery neznáme až doteraz. Cesty ku kaspáza-3 aktivácie boli identifikované, ktoré sú buď závislé alebo nezávislé na mitochondriálnom uvoľnení cytochrómu c a kaspázy-9 funkcií. Kaspáza-3 je potrebná pre normálny vývoj mozgu a je dôležitá, alebo v iných základných apoptotických scenárov v pozoruhodnej tkanív-, typ buniek-alebo smrť podnet-špecifickým spôsobom. Kaspázy-3 je tiež potrebná pre niektoré typické znaky apoptózy, a je nepostrádateľná pre apoptotické kondenzácie chromatínu a fragmentácie DNA vo všetkých typoch buniek. Tak, kaspáza-3 je potrebná pre niektoré procesy spojené s demontážou buniek a vznik apoptotických teliesok. (<http://www.nature.com/cdd/journal/v6/n2/abs/4400476a.html>).

#### 1.7.5.1 Úloha kaspázy 3 v apoptóze

Termín apoptóza je odvodený z gréckeho slova, ktoré znamená opustenie lístia zo stromov. Tento termín je aplikovaný na skupinu charakteristické štruktúrne a molekulárnej udalostí, ktoré oddeľujú tento typ buniek vymazaní z nekrózy. Na rozdiel od nekrózy, ktorá zahŕňa skupinu buniek súčasne, môže dôjsť k apoptóze v jednej bunke obklopenej skupinou živých buniek. Tam je zreteľná a presne lokalizovaná kontrola nad osudom špecifických buniek v zmiešanej bunkovej populácii, že je odsúdený k apoptóze. Apoptóza je selektívny proces pre odstránenie buniek v rôznych biologických systémoch. Táto udalosť podobná šíreniu je prísne regulovaná s oboma procesmi, ktoré zohrávajú zásadnú úlohu v homeostáze obnoviteľných tkanív.

Rôzne skupiny molekúl sa zúčastňujú apoptózy. Jedna sada mediátorov zapletených do apoptózy patrí k aspartate-špecifické proteázy cysteinyl alebo kaspázy. Člen tejto rodiny, kaspázy-3 (CPP32, apopain, Jama), bol identifikovaný ako kľúčový mediátor apoptózy cicavčích buniek. Kothakota *et al.* zistili, že v bunkách vystavených Fas, gelsolin bol štiepaný *in vivo* v kaspázy závislým spôsobom. Rozštípenie fragmentov gelsolin viedlo k rozštípeniu na génu aktín vlákien vo  $Ca^{2+}$  nezávisle. Vyjadrenie gelsolin fragmentov tiež viedlo k apoptóze buniek. Dodatočné dôkazy o úlohe gelsolin v apoptóze boli poskytnuté tým, že ukazujú, že v porovnaní s divokým typom-neutrophis, tie z myšiach, ktorým chýba gelsolin vystavoval oneskorený nástup indukovanej apoptózy. Preto autori naznačujú, že

štiepané fragmenty gelsolin môžu byť zapletené do apoptózy (<http://www.bioscience.org/news/scientis/caspase.htm>).

## 1.8 Sirtuíny

### 1.8.1 Charakteristika a mechanizmus účinku sirtuínov

Sirtuíny regulujú dôležité biologické cestičky v eubaktériách, archeách a eukaryotoch. Sirtuíny sú proteíny deacetylázy. Na rozdiel od ostatných známych deacetylázových proteínov, ktoré jednoducho hydrolyzujú acetyl-lyzín zostatky, sirtuínom sprostredkovaná deacetylová reakcia spája deacetyláciu lyzínu do NAD hydrolýzy. Táto hydrolýza prináša O-acetyl-ADP-ribozu, deacetylovaný substrát a nikotínamid, samo sebe spomaľujúci aktivitu sirtuínu (Zhao et al.,2004).

Závislosť sirtuínu na NAD dokazuje ich enzymatická aktivita priamo v energetickom stave bunky cez bunkový NAD: NADH prepínač, absolútne stúpne NAD, NADH alebo nikotínamidu alebo kombinácia týchto premenných. Kým baktérie a archaea odkodujú každý jeden alebo dva sirtuíny, eukaryoty odkodujú niekoľko sirtuínov v ich genomoch (North et al.,2004).

### 1.8.2 Klasifikácia a druhy sirtuínov

Cicavce majú sedem sirtuínov (SIRT1-7), ktoré obsadzujú rôzne podbunkové priestory, ako nukleus (SIR1,2,6,7) cytoplazmu (SIRT1 a SIRT2) a mitochondrie (SIRT3,4,5). Sirtuíny boli zahrnuté do regulácie starnutia, prepisovaní, uvoľňovaní a odpadnutí kožnej chrasty a odolnosti voči stresu.

Eukaryotické sirtuíny sú rozdelené do 4 fylogenetických skupín. Do prvej triedy zaradujeme SIR1, 2 a 3, do druhej SIR4, do tretej SIR5 a do poslednej štvrtej SIR6 a SIR7. Ďalšia veľmi podstatná cesta funkčného klasifikovania sirtuínov je založená na ich vnútrobunkových lokalizáciách. Štyri sirtuíny, SIR1, SIR3, SIR6 a SIR7 sú nukleárne proteíny, ale ich subnukleárne lokalizácie sú jednoznačné.

#### 1.8.2.1 SIRT1

SIRT1 sa podieľa na riadení správania v reakcii na dostupnosti potravy. Má dôležitú úlohu v priebehu svalovej diferenciácie. SIRT1 je len jeden zo siedmich sirtuínov v genómoch cicavcov, z ktorých každá má charakteristický výraz vzor, subcelulárnu lokalizáciu a fyziologický význam, je združený s tumorsupresorovým proteínom p53 (Cakir et al.,2009). SIRT1 jeznámy v inhibícii apoptózy a podporuje prežívanie rôznych typov buniek (Takayama et al.,2009).

#### 1.8.2.2 SIRT2

SIRT2 je obvykle lokalizovaný v cytoplazme. Zohráva dôležitú úlohu pri kontrole bunkového cyklu. Je členom deacetylázy histon triedy III a bol zapletený do mnohých bunkových procesov, ktoré zahŕňajú histon deacetyláciu, umlčanie génovej, chromozomálnej stability a starnutie (Frye 2000).

#### 1.8.2.3 SIRT3

SIRT3 je mitochondria lokalizovaná tumor.supres. potrebného na údržbu mitochondriálnej integrity a metabolizmu počas stresu. Absencia SIRT3 génu narušuje mitochondriálnu funkciu a destabilizuje mitochondriálnu DNA ( Kim et al.,2010).

#### 1.8.2.4 SIRT4

SIRT4 je mitochondriálny enzým, ktorý sa používa NAD ADP- ribózu a downreguláciu činnosti glutamát dehydrogenázy. Strata SIRT4 inzulínu v bunkách aktivuje GDH, čím upregulácia aminokyselín stimulovanú sekréciu inzulínu (Haigis et al.,2006).

#### 1.8.2.5 SIRT5

SIRT5 je lokalizovaný v mitochondriálnom matrice a integruje s karbamoyl fosfát syntetázou 1. Je to enzým, ktorý katalyzuje prvý krok v cykle močoviny na amoniak detoxikáciu a likvidáciu (Takashi et al.,2009).

#### 1.8.2.6 SIRT6

SIRT6 spolupracuje s NF-kB REAL podjenukou a deacetylázou histon H3 lyzínu 9 na signalizáciu. Nedostatok SIRT6 u cicavcov vedie ku skráteniu dĺžky života. U SIRT6 deficient buniek je hyperacetylácia z H3K9 spojená so zvýšenou REAL promótorom obsadením a vylepšenou NF-kB dependentnou moduláciou génovej expresie, apoptózy a bunkového starnutia (Tiara et al.,2009)

#### 1.8.2.7 SIRT7

SIRT7 je nukleárny proteín, ktorý je asociovaný s aktiváciou rRNA génov kde je interakcia s RNA t 1. Overexpresia SIR7 zvyšuje transkripciu rRNA, zatiaľ čo downregulácia znižuje transkripciu rRNA. SIR7 je bohato zastúpený v tkanivách s možnou vysokou proliferáciou, tak ako pečeň, slezina a testes (Wang et al.,2009).

### **1.8.3 Úloha sirtuínov v kontrole reprodukcie na rôznych úrovniach a ich vplyv na reprodukčné procesy**

V non-ovariálnych bunkách, SIRT1 reguluje metabolizmus, hormonálnu sekréciu, bunkový cyklus, bunkovú diferenciáciu, je ochrancom proti bunkovému stresu, poškodeniu DNA, apoptóze, starnutiu a zápalu (Bordon et al., 2006; Fu et al., 2006 ; Haigis a Guarente, 2006; Wolf, 2006; Rajendrasozhan et al., 2008; Rodgers et al., 2008).

Zapojenie SIRT1 do kontroly bunkového cyklu a apoptózy je dobre zdokumentované. V zdravých bunkách, SIRT1 má anti-apoptotické účinky a to v tom zmysle, že pôsobia prostredníctvom inhibície pre-apoptotické proteíny Bax (Cohen et al., 2004) a p53 (Langley et al., 2002) a prostredníctvom stimulácie anti-apoptotických proteínov BCL- XL (Dey et al., 2008).

Okrem toho môže v nádorových bunkách SIRT1 podporovať apoptózu napriek poklesu v expresii anti-apoptotických proteínov BCL-XL (Bourguignon et al.,

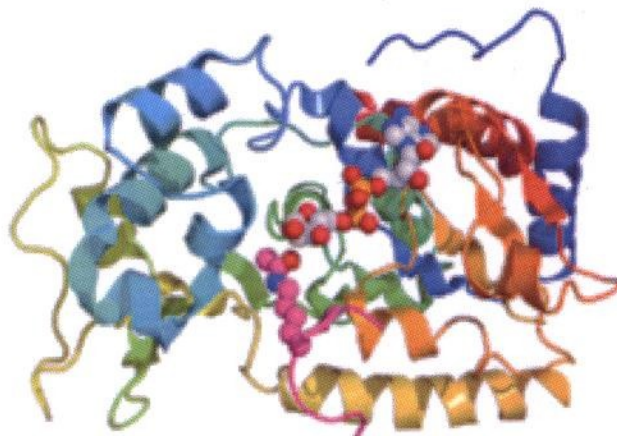
2009). SIRT1 môže buď podporovať a inhibovať šírenie zdravých aj nádorových buniek. SIRT1 aktivuje expresiu GADD45 (rast Zatknutie a poškodenie DNA inducibilní génová 45), ktorý indukuje zastavenie bunkového cyklu (Kobayashi et al., 2005). Sasaki et al. (2006) zistil značnú pozitívnu koreláciu medzi úrovňou SIRT1 a množiacimi sa bunkami nukleárnemu antigénu (PCNA), spracovanie DNA faktora vyjadreného v priebehu S-fázy.

Okrem toho, znižuje syntézu DNA a vyjadrenie PCNA (Dey et al., 2008), blokuje proliferáciu buniek rakoviny prostaty (Fu et al., 2006). Vedomosti o účinkoch SIRT1 na reprodukciu sú obmedzené. Môže priamo stimulovať spermatogézu, ale nie oogenézu u hlodavcov (Coussens et al., 2008). Jedným z možných mechanizmov, ktorými SIRT1 môže stimulovať reprodukčné procesy môže byť indukcia expresie GnRH a uvoľňovanie LH (Kolthur-Seetharan, 2009). Zapojenie SIRT1 do priamej regulácie vaječníkov, bunkovej proliferácie, apoptózy a sekrečnej aktivity nie je známe.

### **1.8.5 Terapeutické ciele sirtuínu na liečbu chorôb starnutia**

Sirtuíny objavili ako terapeutické ciele pre liečbu vekom- príbuzné choroby. Je ich tam 7 sirtuínov (SIRT1-7), ktoré zobrazujú rôznorodosť v bunkovej lokalizácii a funkcii. Rastúce dôkazy naznačujú, že malé molekuly aktivátorov- z SIRT1 môže pôsobiť proti vekom – súvisiace s úzkosťou, ako sú diabetes mellitus 2. typu. Alternatívne môžu byť inhibítory SIRT2 užitočné pri liečbe neurodegeneratívnych chorôb, ako Parkinsonova choroba. Nedávne objavy malých molekúl a proteín modulátory aktivity deacetylázy sirtuínu poskytli obrovské možnosti nahliadnuť do biologickej a molekulárnej funkcie sirtuínov a overiť ich potenciál ako terapeutiká (Milne et al., 2008).

Regulácia metabolických procesov ako i obranného mechanizmu buniek môže byť napokon kľúčovou úlohou pre sirtuíny k možnému predlžovaniu dĺžky života u cicavcov (Schwer et al., 2008).



Obr. 4: Kryštalografická štruktúra kvasinky Sir2.

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/1SZD-png/220px1SZD.png>).

#### 1.8.6 Sirtuíny ako možné činitele v spomalovaní procesu starnutia

Sirtuíny môžu byť schopné kontrolovať poruchy spojené s vekom vo viacerých organizmoch a ľuďoch. Tieto poruchy zahŕňajú proces starnutia, obezitu, metabolický syndrom, dabetes mellitus 2. typu a Parkinsonovu chorobu (Yammamoto et al., 2007).

Normálna aktivita sirtuínu je brzdená nikotínamidom, ktorý ho spája do špecifických väzbových miest receptorov. Lieky, ktoré rušia tieto väzby by mali zvýšiť aktivitu sirtuínu. Niekoľko štúdií ukázalo, že resveratrol, nájdený v červenom víne, môže rušiť toto vzájomné pôsobenie a je zdanlivým činiteľom pre spomalenie procesu starnutia (Pearson et al., 2008). Predsa len, množstvo resveratrolu je veľmi nízke na aktiváciu sirtuínu, teda možné terapeutické použitie by vyžadovalo čistenie a vývoj terapeutického činiteľa.

Resveratrol a rapamycín, dve zlúčeniny, môžu napodobňovať niektoré aspekty diétného obmedzenia, predstavujú prvé takéto zásahy. Obe látky boli hlásané v procese spomaľovania starnutia u kvasiniek a niektorých druhov bezstavovcov. Nedávne štúdiá zistili, že rapamycín zvyšuje životnosť u hlodavcov. Okrem toho, obe tieto zlúčeniny ukazujú pôsobivé efekty v modeloch s hlodavcami veku pridružených ochorení. V súčasnosti prebiehajú klinické štúdiá, či je resveratrol užitočný ako anti- liečba rakoviny

a rapamycín je už schválený na použitie u ľudských pacientov. Zlúčeniny ako sú tieto, zistené na dlhovekosť štúdií v modelových organizmoch, majú veľký prísľub, terapiou zacieliť na viac rokov s chorobami súvisiacimi s tým, že modelujú molekulárne príčiny starnutia (Kaeberlein 2010).

Vývoj nového činiteľa, ktorý by špecificky blokoval väzbové miesta nikotínamidu môže poskytnúť cestu na vývoj nových činiteľov na liečbu degeneratívnych chorôb ako diabetes, aterosklerozu a lámku. Proteín sirtuín má novú funkciu: môže hrať úlohu v predlžovaní dĺžky života (Schwer et al.,2008).

Obmedzovanie celkového množstva prijatých kalórií rozširuje dĺžku života organizmov meraných od kvasníc po laboratorne zvieratá.

Sirtuín zvýšil dýchanie buniek, čo je procesom, ktorý používa kyslík na premenu kalórií na energiu. Kontroluje enzým, ktorý premieňa acetát, zdroj kalórií, na acetyl-CoA, kľúčový komponent k dýchaniu buniek.

Nová úloha sirtuínov v baktérii zahrňa rovnakú výmenu ako pri jej vzájomnom pôsobení s histone odobratím acetylovej skupiny, pridaním dekorácie k proteínovej sekvencii (ako fosfát), ale cieľový proteín je vtiahnutý do výroby energie, nie kontroly chromozomov.

Normálne bunky môžu prežiť využitím veľa rôznych molekúl ako zdroj energie-účinné zdroje ako tuky a cukry, alebo aj relatívne chudobné molekuly na energiu ako acetáty.

Proteín sirtuín v baktérii je základným meničom enzýmu známeho ako acetyl-CoA syntéza, ktorá mení acetát na acetyl CoA v dvojstupňovom procese. Acetyl CoA potom môže priamo poháňať citric acid cyklus, centrálnu produkujúcu energiu na dýchanie buniek (Yamamoto et al.,2007).

Kým baktérie a kvasnice sú jednobunkové stvorenia, kvasnice sú omnoho bližšie príbuzné zvieratám, vrátane ľudí, ako baktérie. Ak verzia sirtuínu kvasníc taktiež mení novo určený cieľ, ktorý by pravdepodobnejšie odzrkadľoval úlohu proteínu vo zvieratách a formálnejšie by dĺžku života baktérie nebol platný.

## 1 CIEĽ PRÁCE



Cieľom našej práce je jednotlivými metódami biologického výskumu zistiť úlohu sirtuínu v kontrole základných funkcií vaječníc a jeho vzájomné vzťahy s vybranými hormonálnymi a vnútrobunkovými regulátormi ovariálnych funkcií.

Cieľom diplomovej práce:

- úloha sirtuínu v priamej kontrole funkcií vaječníc (proliferácie, apoptózy, sekrečných funkcií a follikulogenézy v ováriách) cestou sledovania následkov indukcie overexpresie sirtuínu
- skúmanie vplyvu vybraných rastových faktorov, hormónov a transkripčných faktorov a sirtuínu na proliferáciu, apoptózu ovariálnych buniek ošísaných
- úlohu sirtuínu v kontrole odozvy ovariálnych buniek na hormonálne a vnútrobunkové regulátory (schopnosť overexpresie sirtuínu ovplyvňovať nie len základné funkcie ovariálnych buniek, ale aj ich odozvu na prídavky týchto hormonálnych regulátorov a overexpresie týchto transkripčných faktorov)

### **3 MATERIÁL A METODIKA**

Výskumy vplyvu sirtuínu na funkciu ováriálnych buniek sme zrealizovali v Centre výskumu živočíšnej výroby v Nitre, Ústave genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat.

### **3.1 ODBER A SPRACOVANIE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU**

#### **3.1.1 Izolácia, kultivácia a transfekcia granulóznych buniek**

Vaječníky sme odobrali na bitútku po zabití zvierat a individuálne sme ich uskladnili pri izbovej teplote, s prídavkom fyziologického roztoku a spracovali maximálne do 5. hodín od porážky zvierat. Po preprave do laboratória sme vaječníky očistili, vizuálne sme posúdili ich stav a následne sme ovária premyli 1 krát v 70% alkohole a 1 krát vo fyziologickom roztoku. GC sme získali aspirovaním tekutiny z folikulov veľkosti 1-3mm pomocou injekčnej striekačky. Bunky sme premyli opakovanou centrifugáciou a rozsuspendovaním v médiu (DMEM/F12 + 2% FCS) (BioWhittaker). Po poslednom odstredení sme pridali k peletu granulóznych buniek kultivačné médium (DMEM/F12 + 10% FCS + 1% antibiotikum/antimykotikum) a bunky sme rozsuspendovali na magnetickom miešadle. Suspenziu GC sme zriedili na požadovanú koncentráciu. Nariedenú suspenziu GC sme rozdelili do 24 komôrkových platničiek (Becton Dickinson, Lincoln Park, USA). GC sme kultivovali v CO<sub>2</sub> inkubátore pri 38,5 st.celzia a periodicky kontrolovali vytváranie monovrstvy. Keď bola plocha na 50-60% pokrytá prisadnutými bunkami (2-3 deň), bunky sme obmyli premývacím médiom (DMEM/F12) a uskutočnili sme lipofekciu granulóznych buniek s použitím transfekčného reagenta Roti-Fect (Carl Roth GmbH+CO, Karlsruhe, Germany). Pokusná kultúra buniek bola transfektovaná expresným vektorom pre proteín p53, NFkappaB (p50 a p65) a SIRT1. Kontrolná kultúra buniek bola transfektovaná reportérovým plazmidom pEGFP-N1. Po 4-6 hodinovej transfekcii sme bunky obmyli a pridali čerstvé kultivačné médium s prídavkami o koncentráciách 0,1,0,100ng/ml. Bunky sme kultivovali 1-2 dni v CO<sub>2</sub> inkubátore pri 38,5st.celzia, až kým bola plocha na 70-80% pokrytá adherentnými bunkami a experiment sme ukončili.

#### **3.1.2 Príprava kultúr na analýzy a analytické metódy**

Médium z kultúr v platničkách sme odsali a uchovali pri -80st.celzia. Bunky z platničiek sme lyzovali a uchovali pri -80st.celzia.

Analytické metódy:

### 3.1.2.1 Fluorescenčná mikroskopia

Fluorescenčná mikroskopia bola použitá pri analýze expresie GFP (green fluorescent protein) proteínu.

### 3.1.2.2 RIA

Rádioimunologická analýza (RIA) bola využitá pri analýze kultivačného média. Rozbor vzoriek sa podľa tejto metódy robil nasledovne: vzorky sa nechali pomaly rozmraziť pri izbovej teplote. Potom sme si pripravili skúmavky so štandardmi a skúmavky s totálmi (dve). Ďalej sa postupovalo tak, že do skúmaviek (podľa určenia) sa namerala vzorka a do nej sa pridávali látky potrebné pre izolovanie daného hormónu, resp. látky. Po úprave vzoriek tieto boli zmerané na automatickom prístroji metódy RIA/EIA. Výsledky boli spracované a vyhodnotené bežnými štatistickými metódami pomocou programu Sigma Plot 11,0 (Systat Software, Inc., CA, USA). Pri výpočtoch sme považovali údaje kde bol „p“ menší ako 0,05 ako preukázané a ak bol väčší za nepreukázané. Podľa spracovaných údajov sme zhotovili grafy, ktoré sme rozdelili podľa jednotlivých pozorovaní a tiež podľa sledovaných látok. Na zostrojenom grafe sme porovnávali hladinu v pokusnej skupine s úrovňou v kontrolovanej skupine.

### 3.1.2.3 Western Blotting

Ďalšou použitou analytickou metódou bol SDS-PAGE/Western blotting (Lammeli,1970). Vo vzorkách lyzovaných granulóznych buniek sme zisťovali prítomnosť a akumuláciu proteínov ako kontroly účinnosti transfekcie. Elektroforézou získané frakcie bielkovín boli následne prenesené mokrým prenosom použitím prístroja Transblottera z gélu na nitrocelulóзовú membránu. Blokovanie nešpecifických väzieb antigénov sme uskutočnili inkubáciou membrány v 5% roztoku BSA (bovinový sérový albumín, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany). Endogénnu peroxidázu sme blokovali inkubáciou v 3% roztoku peroxidu vodíka. Po 1-hodinovej inkubácii membrány s primárnou protilátkou sme detekovali signál 40-minútovou inkubáciou so sekundárnou protilátkou. Vizualizáciu signálu sme uskutočnili použitím luminiscenčných reagentov Visualize (Upstate, Temecula, CA, USA, ktoré reakciou s peroxidázou vyžarujú luminiscenčný

signál, ktorý zachytíme po expozícii s RTG-filmom typu Hyperfilm (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

#### 3.1.2.4 Imunocytochemické spracovanie preparátov

Roztoky po fixácii používame vychladené, zo sklíčok neodstraňujeme inkubačné mriežky, jednotlivé roztoky pridávame (dávkujeme) po stenách komôrok- nie kolmo resp. priamo, roztoky pridávame hneď po odstraňovaní predchádzajúceho, aby sa nevysušila monovrstva, sklíčka resp. komôrky vždy prikryvame pôvodným krytom vždy si overím (u zodp. Vedúceho) pomer riedenia ako aj druh (firmu) primárnej a sekundárnej protilátky, rovnako aj druh a pomer riedenia farbiva

Premývanie- prudkým pohybom strasieme zo sklíčok inkubačné médium do každej komôrky pridáme 700 mikrolitrov PBS, po pridaní PBS do poslednej komôrky proces zopakujeme a necháme pôsobiť 5 minút

Fixácia paraformaldehyd- po zliatí PBS pridáme do každej komôrky 500 mikrolitrov paraformaldehydu (4% v PBS, pH- 7,2-7,4), takto pripravené sklíčka uložíme na 1 hodinu do chladničky

Premývanie- po fixácii sklíčka 2 krát opláchneme v PBS, roztok necháme pôsobiť 3 minúty

Permeabilizácia- do každej komôrky pridáme 500 mikrolitrov permeabilizačného roztoku a necháme pôsobiť 3 minúty

Premývanie- po permeabilizácii sklíčka 2 krát opláchneme v PBS, roztok necháme pôsobiť 3 minúty

Peroxidáza- do každej komôrky pridáme 5-6 kvapiek roztoku 3% peroxidu vodíka, necháme pôsobiť 5 minút pri izbovej teplote

Premývanie- po fixácii sklíčka 2 krát opláchneme v PBS, roztok necháme pôsobiť 3 minúty

Serum Block- do každej komôrky pridáme 4-5 kvapiek serum block- roztoku, roztok necháme pôsobiť 20 minút pri izbovej teplote, 1% kozie sérum (10ml PBS a 100 mikrolitrov KS) alebo 1% BSA

Fixácia buniek-

1. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) po vybratí z termostatu opláchneme v 4 stup. Roztoku PBS (pH 7,4)

2. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) inkubujeme v 4% paraformaldehyde (pH 4,2) 60 minút
3. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) opláchneme v PBS (pH 7,4) 1 krát 10 minút
4. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) inkubujeme v 70% alkohole 10 minút
5. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) inkubujeme v 80% alkohole 15-30 minút
6. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) inkubujeme v 96% alkohole 30-60 minút
7. chamber- slides (sklíčka s kultúrou) inkubujeme v 100% alkohole 60 minút  
99%- v tomto stave je možné sklíčka resp. slides uchovať pri teplote 4 stupne celzia až do ďalšieho spracovania

Pred ďalším spracovaním je nutné znížiť % obsah alkoholu postupným opakovaním bodov 6- 4.

Sklíčka je možné uchovať aj bez použitia alkoholu v paraformaldehyde. Vtedy postupujeme len po bod 2.

- 4% paraformaldehyd- musíme pracovať pod zapnutým digestorom, 4g paraformaldehydu zmiešame so 100ml PBS, na chvíľu zapneme varenie, aby sa zahriala platňa a pridáme 150 mikrolitrov 10,5 M, NaOH a necháme rozmiešať, kým nie je roztok číry, podľa potreby pridáme ďalšie NaO
1. PBS 2krát 3 minúty
  2. Serum block 20 minút
  3. Primárna protilátka- do každej komôrky pridáme po 300 mikrolitrov nariadenej protilátky
    - primárnu protilátku necháme pôsobiť 1 hodinu pri izbovej teplote
    - primárnu protilátku riedime v PBS s 1% kozím sérom alebo 1% BSA
  4. Premývanie- po inkubácii sklíčka opláchneme v PBS
    - roztok necháme pôsobiť 3 minúty
  5. Sekundárna protilátka- do každej komôrky pridáme po 300 mikrolitrov nariadenej protilátky
    - sekundárnu protilátku necháme pôsobiť 1 hodinu pri izbovej teplote
    - sekundárnu protilátku riedime v PBS s 1% kozím sérom alebo 1% BSA
  6. Premývanie- po inkubácii sklíčka 4 krát opláchneme v PBS
    - roztok necháme pôsobiť 4 minúty
  7. Farbenie – do každej komôrky pridáme po 300 mikrolitrov farbiva DAB- substrate
    - pôsobenie kontrolujeme pod mikroskopom
    - po zafarbení ihneď premývame

8. Premývanie- po farbení sklička 3 krát opláchneme vo väčšom množstve PBS
9. Odstraňovanie vrchných komôrok
10. Montovanie- použitím montovacieho roztoku prekryjeme zafixované a zafarbené bunky krycí skličkou
  - pri montovaní preparátov oocytov je ako pomôcka možné využiť malé kúsky plastelíny, na ktoré sa nalepia podložné sklička

#### **Roztok PBS pH 7,4**

- 52,2 fosfátového pufru zmiešame so 7g NaCl a dolejeme do 1 litra destilovanou vodou.

#### **0,2 M fosfátový pufr, pH 7,4**

A: 3,1202g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> krát 2H<sub>2</sub>O+ destilovaná voda do 100ml (0,2M)

B: 35,85g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> krát 12H<sub>2</sub>O+ destilovaná voda do 500 ml (0,2M)

Zmiešať 19ml roztoku A a 81 ml roztoku B a doliať destilovanou vodou do 200ml

#### **Permeabilizačný roztok**

100ml PBS+ 500 mikrolitrov TWEEN 20 (podľa potreby+ 500 mikrolitrov kozieho séra)

#### **1% kozie sérum**

10ml+ 100 mikrolitrov kozieho séra

#### **DAB**

Zarábať v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### **5%BSA**

10ml PBS+ 0,5g BSA

### **3.1.4 RIA/EIA metóda**

Z biologických metód sa najčastejšie používajú imunologické metódy RIA a ELISA. Sú založené na imunitnej reakcii kontrolovanej látky s protilátkami.

ELISA má oproti RIA výhodu jednoduchšieho odčítania výsledku (spravidla v závere stačí zmerať intenzitu zafarbenia roztoku jednoduchým fotometrom), zavádza však do reakcie ďalšiu citlivú bielkovinovú molekulu (enzým), ktorej vlastnosti môžu byť pozmenené látka zo vzorky a podieľajú sa na starnutí analytického kitu (sady).

Obe metódy, RIA a ELISA, bývajú spravidla vypracované pre konkrétne presné definované látky. V prípade právne záväzného porovnania s normou sú namerané hodnoty kontrolované fyzikálno chemickými metódami

#### **4VÝSLEDKY**

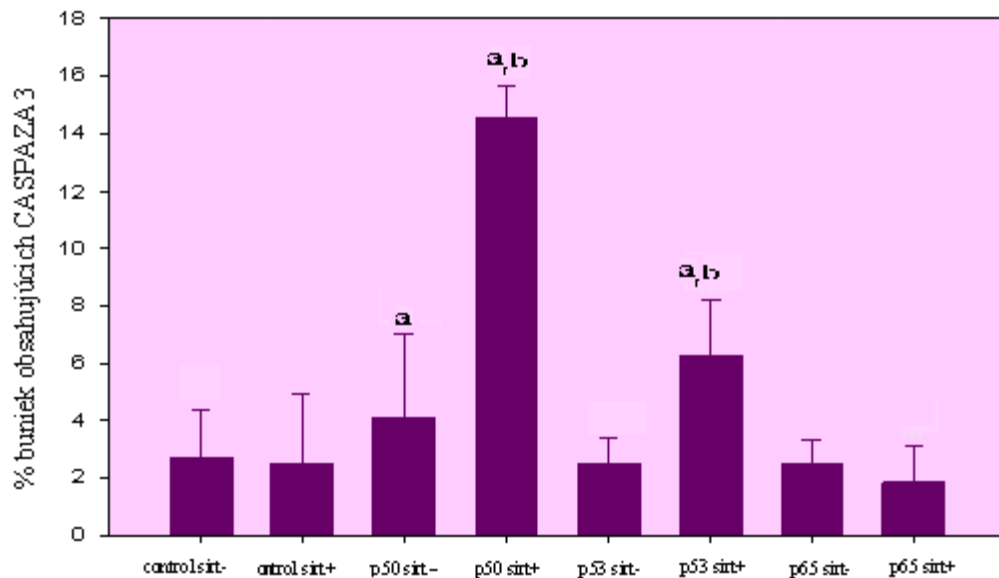
#### 4.1 VPLYV TRANSFEKCIE cDNA KONŠTRUKCIAMI VYVOLÁVAJÚCIMI OVEREXPRESIU p53, NFkappaB (p50 a p65), SIRTUÍNU A ICH KOMBINÁCIÍ NA VÝSKYT APOPTÓZY (EXPRESIU CASPAZY3) KULTIVOVANÝCH BUNIEK OŠÍPANÝCH (príloha-tabuľka č.1) (údaje imunocytochemickej analýzy)

##### 4.1.1 Výsledky

Samotný sirtuín, p53, NFkappa (p50 a p65) (bez kombinácií s inými konštrukciami) neovplyvňovali apoptózu (expresiu caspázy3).

Prítomnosť sirtuínu vyvolala stimulačný efekt p50 a p53 na apoptózu (expresiu caspázy3) a efekt p65 neovplyvňovala (graf č.1).

Graf č.1: Vplyv p53, NFkappaB (p50 a p65) a génovej konštrukcie pre sirtuín na výskyt apoptózy (expresie caspázy3) v granulóznych bunkách ošípaných (údaje imunocytochemickej analýzy)



Dávky - p50, p53, p65

a- vplyv transkripčného faktora, b- vplyv sirtuínu



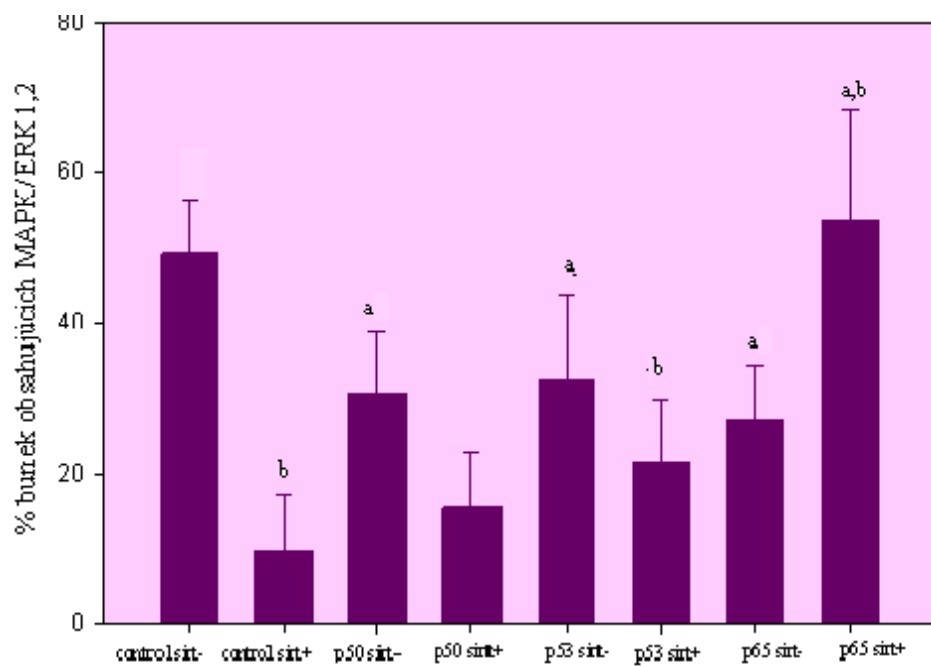
## 4.2 VPLYV TRANSFEKCIE cDNA KONŠTRUKCIAMI VYVOLÁVAJÚCIMI OVEREXPRESIU p53, p50 a p65 (NFkappaB), SIRTUÍNU A ICH KOMBINÁCIÍ NA VÝSKYT PROLIFERÁCIE (EXPRESIU MAPK/ERK 1,2) KULTIVOVANÝCH BUNIEK OŠÍPANÝCH (príloha-tabuľka č.1) (údaje imunocytochemickej analýzy)

### 4.2.1 Výsledky

Samotný sirtuín, p53 a NFkappaB (p50 a p65) (bez kombinácií s inými konštrukciami)- mali inhibičný efekt na proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2).

Prítomnosť sirtuínu menila inhibičný efekt p53 a p65 na stimulačný a efekt p50 neovplyvňovala (graf č.2).

Graf.č.2: Vplyv p53, NFkappaB ( p50 a p65) a génovej konštrukcie pre sirtuín na proliferáciu (expresiu MAPK/ERK 1,2) v granulóznych bunkách ošípaných (údaje imunocytochemickej analýzy)



Dávky - p50, p53, p65

a- vplyv transkripčného faktora, b- vplyv sirtuínu

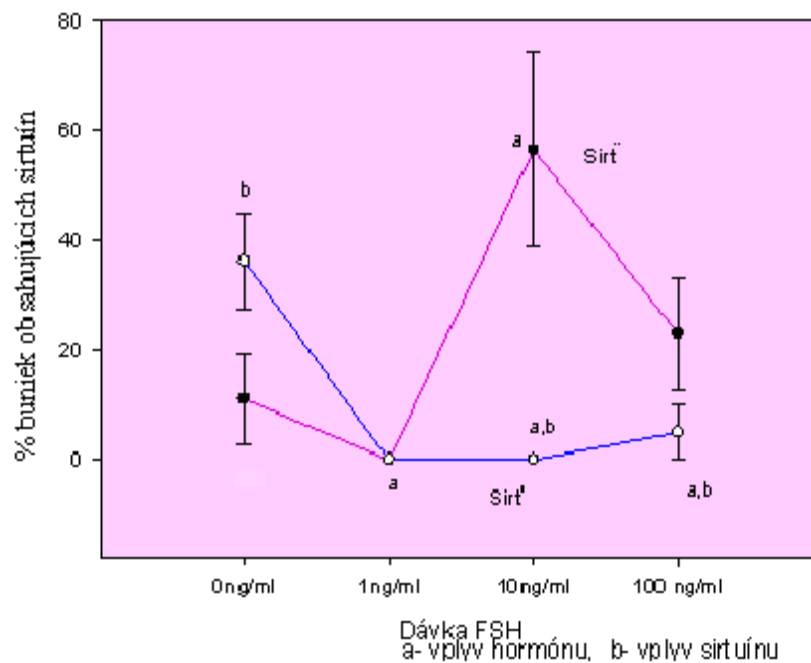
#### 4.3 VPLYV HORMÓNU FSH A GÉNOVEJ KONŠTRUKCIE PRE SIRTUÍN NA EXPRESIU SIRTUÍNU V GRANULÓZNYCH BUNKÁCH OŠÍPANÝCH (príloha-tabuľka č.2) (údaje imunocytochemickej analýzy)

##### 4.3.1 Výsledky

Samotný sirtuín ( bez kombinácii s inými konštrukciami) mal stimulačný efekt na expresiu sirtuínu. Samotný FSH mal inhibičný efekt na expresiu sirtuínu pri dávke 1 ng/ml a stimulačný efekt pri dávke 10 ng/ml.

Prítomnosť sirtuínu vyvolala inhibičný efekt FSH na expresiu sirtuínu, pri dávke 10 ng/ml menila stimulačný efekt FSH na inhibičný (graf č.3).

Graf č.3: Vplyv FSH a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu na granulóznych bunkách ošípaných (údaje imunocytochemickej analýzy)



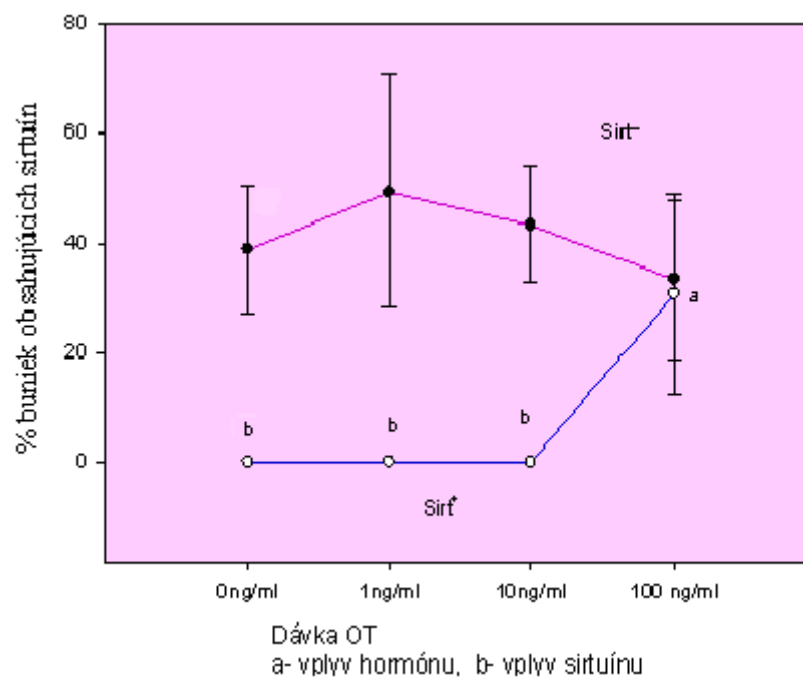
#### 4.4 VPLYV HORMÓNU OXYTOCÍNU A GÉNOVEJ KONŠTRUKCIE PRE SIRTUÍN NA EXPRESIU SIRTUÍNU V GRANULÓZNYCH BUNKÁCH OŠÍPANÝCH (príloha-tabuľka č.2) (údaje imunocytochemickej analýzy)

##### 4.4.1 Výsledky

Samotný sirtuín (bez kombinácií s inými konštrukciami) mal inhibičný efekt na expresiu sirtuínu. Samotný oxytocín neovplyvňoval expresiu sirtuínu.

Prítomnosť sirtuínu pri dávkach 1 a 10 ng/ml vyvolala inhibičný efekt oxytocínu na expresiu sirtuínu a pri dávke 100 ng/ml stimulačný efekt (graf č.4).

Graf č.4: Vplyv hormónu oxytocínu a génovej konštrukcie pre sirtuín expresiu sirtuínu na granulóznych bunkách ošipaných (údaje imunocytochemickej analýzy).



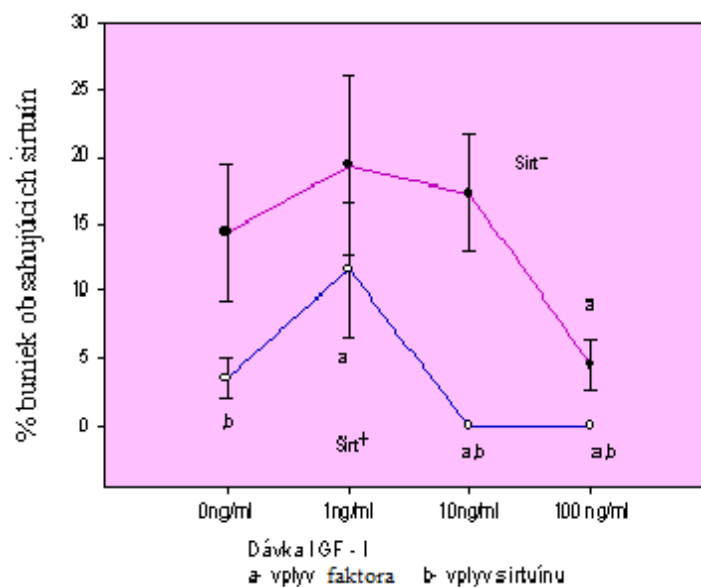
## 4.5 VPLYV RASTOVÉHO FAKTORA IGF-I A GÉNOVEJ KONŠTRUKCIE PRE SIRTUÍN NA EXPRESIU SIRTUÍNU V GRANULÓZNYCH BUNKÁCH OŠÍPANÝCH (príloha-tabuľka č.3) (údaje imunocytochemickej analýzy)

### 4.5.1 Výsledky

Samotný sirtuín a IGF-I (bez kombinácií s inými konštrukciami) mali inhibičný efekt na expresiu sirtuínu.

Prítomnosť sirtuínu pri dávke 1 ng/ml menila inhibičný efekt IGF-I na stimulačný (graf č.5).

Graf č.5: Vplyv rastového faktora IGF-I a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu na granulóznych bunkách ošípaných (údaje imunocytochemickej analýzy)



## **5 DISKUSIA**

Cieľom našej práce bolo preskúmanie úlohy sirtuínu a možnej účasti vybraných hormónov FSH a oxytocínu a rastových faktorov IGF-I v regulácii funkcií kultivovaných ovariálnych buniek ošípaných. Ďalej sme sa zamerali na poznanie účinkov transkripčných faktorov p53 a NFkappaB (p50 a p65) na výskyt apoptózy a proliferácie biologicky aktívnych látok ovariálnymi bunkami ošípaných in vitro. V dôsledku splnenia cieľov našej práce sme odpovedali na niekoľko nami stanovených otázok uvedených dole.

### **5.1 Aké látky produkujú ovária?**

Najvýkonnejšie regulátory dlhodobo fyziologických zmien, vrátane reprodukcie, sú hormóny, rastové faktory a látky s nimi spojené. Extracelulárne látky (hormóny, rastové faktory a iné) regulujú reprodukčné procesy prostredníctvom kontroly expície zodpovedajúcich génov. Na prenose signálu vnútri bunky sa zúčastňuje množstvo signálnych látok, ktoré medzi sebou interagujú a zabezpečujú tak šírenie signálu. Intracelulárne mechanizmy účinku extracelulárnych látok sú zložité a nedostatočne preskúmané, a ich hlbšie pochopenie umožní efektívnejšie riadenie reprodukčných procesov. Cieľom našej práce bolo preskúmanie úlohy sirtuínu a možnej účasti vybraných hormónov FSH a oxytocínu a rastových faktorov IGF-I v regulácii funkcií kultivovaných ovariálnych buniek ošípaných. Ďalej sme sa zamerali na poznanie účinkov transkripčných faktorov p53 a NFkappaB (p50 a p65) na výskyt apoptózy a proliferácie biologicky aktívnych látok ovariálnymi bunkami ošípaných in vitro. Počas našich experimentov v niektorých prípadoch génová konštrukcia pre sirtuín bola schopná vyvolať overexpresiu (akumuláciu) sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných a v niektorých prípadoch nebola funkčná.

### **5.2 Môžu hormóny FSH, oxytocín a rastový faktor IGF-I ovplyvňovať akumuláciu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných?**

#### **5.2.1 Vplyv samotného FSH**

Na základe výsledkov nadobudnutých v našich experimentoch FSH môže ovplyvňovať akumuláciu sirtuínu, samotný FSH mal stimulačný efekt na expresiu sirtuínu. Výsledky nášho výskumu sú prvými, ktoré svedčia o možnosti vplyvu FSH na akumuláciu sirtuínu.

Pravdepodobne sme prví, ktorí zistili účinok FSH na expresiu sirtuínu u uvedeného živočíšneho druhu. Stimulačný účinok FSH pozorovaný v našich experimentoch potvrdzuje zapojenie FSH v riadení hormonálnej sekrécie vaječníkov.

### **5.2.2 Vplyv samotného oxytocínu**

U nás samotný oxytocín neovplyvňoval akumuláciu sirtuínu. Nevyvolal na akumuláciu sirtuínu žiadny efekt.

### **5.2.3 Vplyv samotného IGF-I**

Samotný IGF-I mal inhibičný efekt na akumuláciu sirtuínu. Mechanizmy účinku IGF-I nie sú dostatočne preskúmané. V ováriách podporuje proliferáciu a inhibuje apoptózu. Je zapojený do procesov dozrievania a selekcie folikulov. Zatiaľ nie sú poznatky o tom, či IGF-I pôsobí na funkcie granulóznych buniek ošípaných prostredníctvom sirtuínu. Naše výsledky sú prvé informácie o vplyve IGF-I na ováriách ošípaných.

## **5.3 Môže sirtuín modifikovať efekty FSH, oxytocínu a IGF-I?**

### **5.3.1 Vplyv sirtuínu na efekt FSH**

Génová konštrukcia pre sirtuín môže modifikovať efekt FSH. Poskytuje to priamy dôkaz, že môžu regulovať ovária aj cez sirtuín, a že výživa môže ovplyvňovať ovariálne funkcie cez zmenu produkcie sirtuínu, ktoré mení aj základné funkcie vaječníka, aj jeho odozvu na FSH. Sirtuín menil stimulačný efekt samotného FSH na inhibičný pri dávke 10 ng/ml. Naše pozorovania naznačujú, že sirtuín môže zabraňovať efektu FSH. Vplyvy FSH na expresiu sirtuínu a schopnosť sirtuínu modifikovať efekty uvedeného hormónu svedčia o tom, že sirtuín môže byť potencionálnym sprostredkovateľom účinku FSH na ováriách ošípaných. Keďže sirtuín môže sprostredkovať FSH môže byť zapojený do regulácii ovariálnych funkcií regulovaných týmito hormónmi.

### **5.3.2 Vplyv sirtuínu na efekt oxytocínu**

Sirtuín môže modifikovať efekt oxytocínu. Poskytuje to priamy dôkaz, že oxytocín môže regulovať ovária aj cez sirtuín, a že výživa môže ovplyvňovať ovariálne funkcie cez zmenu produkcie sirtuínu, ktoré mení aj základné funkcie vaječníka, aj jeho odozvu na oxytocín. Schopnosť sirtuínu modifikovať efekt oxytocínu svedčí o tom, že sirtuín môže byť potencionálnym sprostredkovateľom účinku oxytocínu na ováriách ošípaných. Keďže

sirtuín môže sprostredkovať oxytocín môže byť zapojený do regulácii ovariálnych funkcií regulovaných týmito hormónmi.

### 5.3.3 Vplyv sirtuínu na efekt IGF-I

Sirtuín môže modifikovať efekt IGF-I. Poskytuje to priamy dôkaz, že môžu regulovať ovária aj cez sirtuín, a že výživa môže ovplyvňovať ovariálne funkcie cez zmenu produkciu sirtuínu, ktoré mení aj základné funkcie vaječníka, aj jeho odozvu na IGF-I. Sirtuín menil inhibičný efekt IGF-I na stimulačný pri dávke 10 ng/ml. Naše pozorovania naznačujú, že sirtuín môže byť zapojený do potlačenia efektu IGF-I. Schopnosť sirtuínu modifikovať efekt IGF-I svedčí o tom, že sirtuín môže byť potenciálnym sprostredkovateľom účinku IGF-I na ováriách ošipovaných.

Úloha sirtuínu pri sprostredkovaní IGF-I na vaječníku nebola doteraz skúmaná. Schopnosť sirtuínu podporovať IGF-I naznačuje, že sirtuín môže byť zapojený do propagácie vo folikulogéze ovárií a steroidných hormónov, ktoré sú aktivované IGF-I (Hammond et al., 1991). IGF-I môže regulovať nie len folikulogézu steroidogézu, ale aj iné ovariálne funkcie (apoptózu, dozrievanie oocytov). Keďže sirtuín môže sprostredkovať oxytocín i FSH môže byť zapojený do regulácii ovariálnych funkcií regulovaných týmito hormónmi.

Na základe výsledkov nadobudnutých v našich pozorovaniach môžeme tvrdiť, že sirtuín môže pôsobiť ako stimulátor i ako inhibítor v ovariálnych bunkách ošipovaných. Naše získané výsledky môžu prispieť k lepšiemu poznaniu mechanizmov regulácie reprodukčných funkcií, konkrétne týkajúcich sa vybraných extracelulárnych regulátorov-IGF-I, oxytocínu a FSH. Výsledky našich výskumov sú prvými dôkazmi nového mechanizmu účinku týchto látok cez sirtuín vo folikulárných bunkách vaječníkov ošipovaných.

Sirtuín môže byť tiež sprostredkovateľom efektu výživy. Na základe našich pozorovaní sme nadobudli výsledky, kedy prítomnosť sirtuínu vyvolala zmenu efektu hormónu v ováriách a tým pádom i výživa môže ovplyvňovať ovariálne funkcie cez zmenu produkcie sirtuínu. Sirtuín sprostredkuje vplyv nízkokalorickej výživy na dlhovekosť, rezistentnosť k chorobám a pohlavné dozrievanie. Pri aktivácii sirtuínov, kedy viedlo by k zníženiu koncentrácií, to znamená tzv. k obmedzeniu kalórií. Obmedzenie kalórií znamená prijať menej kalórií, ako telo potrebuje k tomu, aby fungovalo. V praxi to znamená jesť do polsýta. Pri nízkokalorickej diéte dochádza k zložitému procesu, na

ktorého konci je stimulácia tzv. génu mladosti, označovaného ako sirtuín (Schwer et al. 2008).

Naše pozorovania sú prvé informácie o vplyve hormónu na expresiu sirtuínu u samíc. Poznanie nového mechanizmu účinku týchto hormónov na folikulárne bunky môže mať význam pre prax, pretože možným farmakologickým ovplyvňovaním týchto látok môžeme doceliť usmernenie funkcií vaječníkov, zlepšenie reprodukčných funkcií živočíchov, pochopiť vzťahy medzi výživou a reprodukciou a výsledky našej práce vytvárajú teoretický základ pre perspektívny vývoj nových liečebných postupov porúch a chorôb reprodukčného systému živočíchov.

Tieto látky a ich farmakologické a génové regulátory môžu byť použiteľné pre charakteristiku, predpoveď a reguláciu funkcií ovárií a pre liečbu reprodukčných a nádorových ochorení v reprodukčnej biológii, biotechnológiách, veterinárnej a humánnej medicíne a poľnohospodárstve.

Blokovanie produkcií alebo účinku týchto vnútrobunkových látok cDNA génovými konštrukciami pre sirtuín podstatne menili ovariálne funkcie a modifikovali efekty hormónov a rastových faktorov. Tieto údaje dokazujú, že hormóny a rastové faktory regulujú ovariálne funkcie (proliferáciu, apoptózu a sekrečnú aktivitu) cez transkripčné faktory a s nimi spojené gény a za prítomnosti sirtuínu (schéma). Tieto pozorovania svedčia o tom, že ovariálne funkcie sa môžu regulovať zložitým komplexom i menej známymi nedávno objavenými hormónmi (oxytocínom, FSH), rastovým faktorom IGF-I a vnútrobunkovými sprostredkovateľmi ich účinku (transkripčnými faktormi p53 a NFkappaB).

#### **5.4 Aký vplyv mali samotný sirtuín, p53 a NFkappaB (p50 a p65) na výskyt apoptózy a proliferácie v granulóznych bunkách ošípaných?**

##### **5.4.1 Vplyv samotného sirtuínu na apoptózu**

V našich experimentoch sme nadobudli výsledky, že samotný sirtuín neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) v granulóznych bunkách ošípaných.

##### **5.4.2 Vplyv samotného p53 na apoptózu**

Samotný p53 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) v granulóznych bunkách ošípaných. Vplyvy p53 na apoptózu sú v ováriách čiastočne preskúmané predchádzajúcimi publikáciami. Naše výsledky sa nezhodujú s výsledkami Sassona a kol. (2003), kedy cez



p53 môže byť stimulovaná apoptóza v granulóznych bunkách ošípaných. Je tiež zapojený do inhibícií apoptózy ovariálnymi bunkami (Benčo a kol.,2005). Podľa Matasa a kol. (2004) p53 môže stimulovať apoptózu v makrofágoch.

#### **5.4.3 Vplyv samotného NFkappaB/p50 na apoptózu**

Samotný NFkappaB/p50 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) v granulóznych bunkách ošípaných. NFkappa B môže stimulovať apoptózu v non- ovariálnych bunkách (Ghosh a kol.,1998).

#### **5.4.4 Vplyv samotného NFkappaB/p65 na apoptózu**

Samotný NFkappaB/65 neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) v granulóznych bunkách ošípaných. NFkappa B môže stimulovať apoptózu v non- ovariálnych bunkách (Ghosh a kol.,1998).

#### **5.4.5 Vplyv samotného sirtuínu na proliferáciu**

V našich experimentoch sme nadobudli výsledky, že samotný sirtuín mal inhibičný efekt na proliferáciu (MAPK/ERK1,2) v granulóznych bunkách ošípaných.

#### **5.4.6 Vplyv samotného p53 na proliferáciu**

Samotný p53 mal inhibičný efekt na proliferáciu (MAPK/ERK1,2) v granulóznych bunkách ošípaných. Naše pozorovania o vplyve p53 na proliferáciu sa zhodujú s pozorovaniami Hsiecha a kol. (2004), kedy transkripčný faktor p53 inhiboval proliferáciu, ale v leiomyómových bunkách u ľudí. Nezhodujú sa však s pozorovaniami Benča a kol (2005), kde p53 stimuloval proliferáciu v ovariálnych bunkách ošípaných.

#### **5.4.7 Vplyv samotného NFkappaB/p50 na proliferáciu**

Samotný NFkappaB/p50 mal inhibičný efekt na proliferáciu (MAPK/ERK1,2) v granulóznych bunkách ošípaných. Podľa Ghosha a kol. (1998), Barketa a Gilmora (1999) NFkappa B môžu stimulovať proliferáciu v non- ovariálnych bunkách. Doposiaľ nie je známe, či NFkappaB má vplyv na reprodukčné procesy u ošípaných. Naše výsledky sú prvé informácie o jeho vplyvoch na ováriách ošípaných.

#### **5.4.8 Vplyv samotného NFkappaB/p65 na proliferáciu**

Samotný NFkappaB/65 mal inhibičný efekt na proliferáciu (MAPK/ERK1,2) v granulóznych bunkách ošípaných. Podľa Ghosha a kol. (1998), Barketa a Gilmora (1999) NFkappa B môžu stimulovať proliferáciu v non-ovariálnych bunkách. Doposiaľ nie je známe, či NFkappaB má vplyv na reprodukčné procesy u ošípaných. Naše výsledky sú prvé informácie o jeho vplyvoch na ováriách ošípaných.

### **5.5 Môže sirtuín modifikovať efekty týchto transkripčných faktorov?**

#### **5.5.1 Vplyv sirtuínu na efekt p53**

Sirtuín môže indukovať pro-apoptotický efekt p53. V podmienkach overexpresie sirtuínu p53 indukoval apoptózu i proliferáciu. Znamená to, že môžu byť synergisti a indukujú apoptózu a proliferáciu spolu. Sirtuín menil inhibičný efekt p53 na stimulačný. Naše pozorovania naznačujú, že sirtuín môže byť zapojený do potlačenia p53. Na základe našich výsledkov nie je vylúčené, že sirtuín má schopnosť vyvolávať rast folikulov, taktiež môže byť stimulátor folikulogenézy. Zapojenie sirtuínu pri kontrole bunkového cyklu a apoptózy je dobre zdokumentované. V zdravých bunkách, sirtuín má anti-apoptotické účinky v tom zmysle, že pôsobia prostredníctvom inhibície pre-apoptotické proteíny p53 (Langley et al., 2002). Okrem toho môže v nádorových bunkách sirtuín podporovať apoptózu. Sirtuín môže buď podporovať a inhibovať šírenie zdravých aj nádorových buniek. Naše pozorovania naznačujú existenciu úzkych funkčných vzťahov medzi p53 a sirtuínom: p53 inhibuje proliferáciu a sirtuín zvyšuje p53, pravdepodobne mechanizmus spätnej väzby.

#### **5.5.2 Vplyv sirtuínu na efekt NFkappaB/p50**

V podmienkach overexpresie sirtuínu p50 indukoval apoptózu a proliferáciu neovplyvňoval. Sirtuín nevyvolal žiadny efekt na NFkappaB/p50.

#### **5.5.3 Vplyv sirtuínu na efekt NFkappaB/p65**

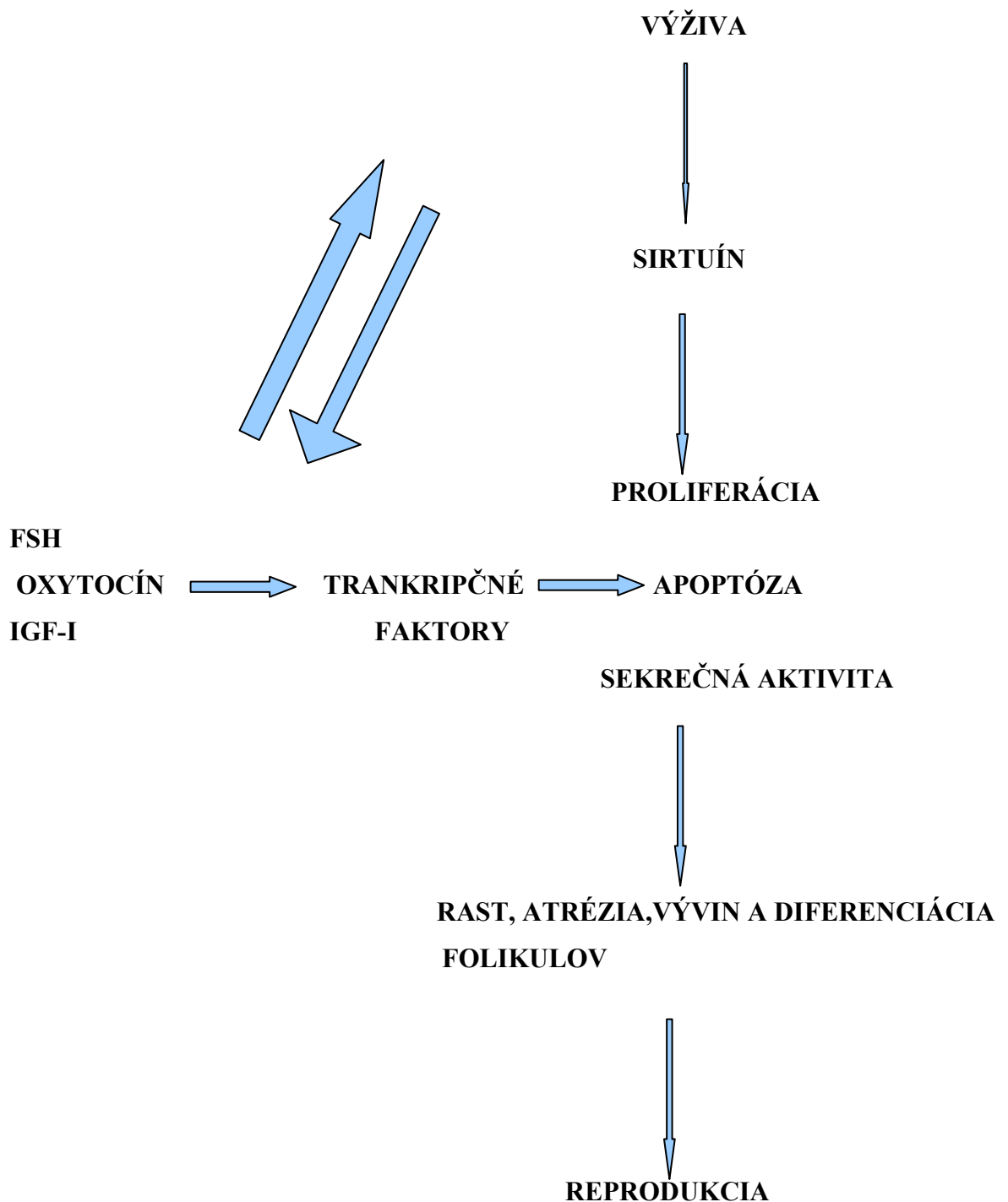
V podmienkach overexpresie sirtuínu p65 nemal vplyv na výskyt apoptózy a indukoval proliferáciu. Sirtuín menil inhibičný efekt p65 na stimulačný. Predtým, inhibičný účinok sirtuínu na činnosť p65, ale nie akumuláciu bol hlásený (Yang et al., 2007). Naše pozorovania naznačujú, že sirtuín môže byť zapojený do potlačenia NF-kappaB inhibíciou p65/NF-kappaB.

V non-ovariálnych bunkách, sirtuín reguluje metabolizmus, hormonálnu sekréciu, bunkového cyklu, bunkovej diferenciácie, je ochrancom proti bunkovému oxidatívne stresu, poškodeniu DNA, apoptóze, starnutiu a zápalu (Bordon et al., 2006; Fu et al., 2006; Haigis a Guarente, 2006; Wolf, 2006; Rajendrasozhan et al., 2008; Rodgers et al., 2008). Vedomosti o účinkoch sirtuínu na reprodukciu sú obmedzené. Je známe, že obmedzenie potravín upravuje ako reprodukciu a činnosť sirtuínu, t.j. môže byť obmedzenie potravín potenciálne riadené cez reprodukciu sirtuínu (Bordon a Guarente, 2005; Nala et al., 2008). Jedným z možných mechanizmov, ktorými sirtuín môže stimulovať reprodukčné procesy môže byť indukcia expície GnRH a uvoľňovanie LH (Kolthur-Seetharan, 2009). Zapojenie sirtuínu v priamej regulácii vaječníkov bunkovej proliferácie, apoptózy a sekrečnej aktivity doposiaľ nie sú neznáme.

Naše pozorovania naznačujú existenciu úzkych funkčných vzťahov medzi NF-kappaB/p65 a sirtuínom: NF kappaB/p65 potláča proliferáciu, zatiaľ čo sirtuín zvyšuje NF-kappaB/p65, pravdepodobne mechanizmus spätnej väzby.

Naše pozorovania stimulačného vplyvu sirtuínu na proliferáciu ovariálnych buniek ošípaných sú v súlade so správou o pozitívnej korelácii medzi úrovňou sirtuínu a ďalšieho markera proliferácie, PCNA, v non-ovariálnej bunke (Sasaki et al., (2006). Okrem toho by mohli naše pozorovania byť prvé demonštrácie, kde sirtuín prostredníctvom MAPK/ERK1,2 môže byť zapojený do stimulácie bunkovej proliferácie vaječníkov ošípaných.

**Schéma:** Možná regulácia proliferácie, apoptózy a sekrečnej aktivity vaječníkov ošípaných pomocou látok skúmaných v našich experimentoch



## 5 ZÁVER

V našej experimentálnej práci sme sledovali úlohu sirtuínu, zároveň aj iných regulátorov (hormónov FSH, oxytocínu, rastového faktora IGF-I, transkripčných faktorov p53, NFkappaB (p50 a p65) v priamej kontrole funkcií vaječníkov (proliferácie, apoptózy, sekrečných funkcií a folikulogenézy v ováriách).

Na základe nadobudnutých výsledkov počas našich experimentov sme došli k nasledujúcim záverom:

**1.FSH** môže ovplyvňovať akumuláciu sirtuínu. Mal stimulačný vplyv na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných.

**2. Oxytocín** neovplyvňoval expresiu sirtuínu.

**3. IGF-I** mal inhibičný vplyv na akumuláciu sirtuínu.

**4. p53** neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval v granulóznych bunkách ošípaných.

**5.NFkappaB/p50** neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval.

**6. NFkappaB/p65** neovplyvňoval apoptózu (expresiu caspázy3) a proliferáciu (expresiu MAPK/ERK1,2) inhiboval.

**7. Sirtuín** je schopný modifikovať efekty FSH. Menil stimulačný efekt FSH na inhibičný. Schopnosť FSH stimulovať akumuláciu sirtuínu a schopnosť génovej konštrukcie pre sirtuín modifikovať efekty FSH svedčí o to, že sirtuín môže byť sprostredkovateľom účinku FSH na ovária.

**8. Sirtuín** je tiež schopný modifikovať efekty oxytocínu a IGF-I.

**9. Transkripčný faktor p53** v podmienkach overexpresie sirtuínu indukoval apoptózu i proliferáciu. Znamená to, že môžu byť synergisti a indukujú apoptózu a proliferáciu spolu. Sirtuín menil inhibičný efekt p53 na stimulačný. Sirtuín môže byť zapojený do potlačenia p53.

**10. NFkappaB/p50** v podmienkach overexpresie sirtuínu indukoval apoptózu. Proliferáciu neovplyvňoval.

**11. NFkappaB/p65** v podmienkach overexpresie sirtuínu nemal vplyv na výskyt apoptózy a proliferáciu indukoval.

**12. Transkripčné faktory** môžu pôsobiť aj samostatne, aj sprostredkovať efekty sirtuínu. Efekt sirtuínu na transkripčné faktory, zhody alebo opačné efekty sirtuínu a transkripčných faktorov, a schopnosť overexpresie transkripčných faktorov modifikovať efekty sirtuínu

svedčí o tom, transkripčné faktory sú sprostredkovatelia účinku sirtuínu na niektoré ovariálne funkcie.

Počas našich experimentov v niektorých prípadoch génová konštrukcia pre sirtuín bola schopná vyvolávať overexpresiu (akumuláciu) sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných a v niektorých prípadoch nebola funkčná.

## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ACKERMAN, RC.-MURDOCH, W.J. (1993) : *Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells*. Prostaglandins. 45(5) 475-85

AHMED, KM. - CAO, N. - LI, J.J. (1997) : *HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy - resistant breast cancer*. Anticancer Res. 26(6B), 4235-43

ALEXIA, c.- FALLOT, G.- LASFER, M.-SCHWEIZER, G.-GROYER A (2004) :*An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis*. Biochem Pharmacol., 68(6), 1003-15

ALLEN, T.R- KRUEGER, K.D.- HUNTER III, W.J.- AGRAWAL, D.K. (2005): *Evidence that insulin-like growth factor-1 requires protein kinase C-E, PI3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways to protect human vascular smooth muscle cells from apoptosis*. Immunology and Cell Biology., 83(6),651-667

ALBANI,D.,POLITO,L.,FORLONI,G.:*J.Alzheimers Dis*.2010 Jan.,19(1):11-26

AMSTERDAM, A- SASSON, R.- KEREN-TAL, I.- AHARONI, D.- DANTES, A- RIMON, E.- LAND, ACOHEN, T.- DOR, Y.- HIRSH, L. (2003): *Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life*. Biochem Pharmacol. 66, 1355-62

AMSTERDAM, A.-KEREN- TAL, I.-AHARONI, D.-DANTES, A.-LAND BRACHA A.-RIMON, E.-SASSON, R. HIRSH, L. (2003) : *Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary*. Mol. Cell endocrinol., 68(10-13), 861-7

ANDERSON, E. (2001): *Ovarian steroids and control of proliferation in the normal human Breast*. Breast., 10(4),273-278

AMSTRONG, S.M.-STUENKEL, E.L. (2005): *Progesterone regulation of catecholamine secretion from maffin cells*. Brain Res. 1043(1-2), 76-86

ASAHARA, S.- SATO, A.- ALJONAIID, A.A.- MARVO, T. (2003): *Thyroid hormone*

*synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles.* Kobe Journal of Medical Sciences 49(5-6), 107-116

ASSELIN E.-XIAO, C.W.-W ANG, Y.F.-TSANG, B.K. (2000): *Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis.* Biol Signals Recept., 9(2), 87-95

BARKET, M. and GILMORE, T.D. (1999) *Control of apoptosis by Rel/ NF- $\kappa$ B transcription factors.* Oncogene 18, 6910-24

BARLOW, CA.- SHUKLA, A.- MOSSMAN, B.T.- LOUNSBURY, K.M. (2006): *Oxidant-mediated cAMP response element binding protein activation: Calcium regulation and role in apoptosis of lung epithelial cells.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology., 34(1), 7-14

BASINI, G.- TOMANINI, C. (2001): *Interrelationship between nitric oxide and prostaglandins in bovine granulosa cells.* Prostaglandins Other Lipid Mediat. 66(3), 179-202

BEHRMAN, H.R. (1979) : *Prostaglandins in hypothalamo-pituitary and ovarian function.* Annu Rev Physiol 41 685-700

BOGAZZI, F.- RUSSO, D.- LOCCI, M.T.- CHIFENTI, B.- ULTIMIERI, F.- RAGGI, F.- COSCI, C.SARDELLA, c.- COSTA, A.- GASPERI, M.- BARTALENA, L.-MARTINO, E. (2005) : *Apoptosis is reduced in the colonic mucosa of patients with acromegaly.* Clinical Endocrinology., 63(6), 683-688

BOURGUIGNON, L.Y., XIA, W., WONG, G. (2009) *Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells.* [J Biol Chem.](#) 284, 2657-71

BRIDGEWATER, DJ.- HO, J.- SAURO, V.- MATSELL, D.G. (2005): *Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway.* Kidney International.,



67(4),1308-1314

CAMPBELL, B.K.-SCARAMUZZI, R.J.-WEBB, B. (1995): *Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle*. J Reprod Fertil Suppl, 150(6),335-50

CARDINALI, D.P.-RITTA, M.N. (1983): *The role of prostaglandins in neuroendocrine junctions: studies in the pineal gland and the hypothalamus*. Neuroendocrinology. 36(2), 152-60

CARLSON, J.C.- WONG, A.P.- PERRIN, D.G. (1977): *The effects of prostaglandin and mating on release of LH in the female rabbit*. J Reprod Fertil. 51(1), 87-92

CASANUEVA, F.F.- DIEGUEZ, C. (1999): *Neuroendocrine regulation and actions of leptin*. Front Neuroendocrinol., 20(4), 317-63 .

CASSONI, P.- SAPINO, A.- MARROCCO, T.- CHINI, S.- BUSSOLATI, G. (2004): *Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation*. Journal of Neuroendocrinology., 16(4),362-364

COHEN, H.Y., MILLER, C., BITTERMAN, K.J., WALL, N.R., HEKING, B., KESSLER, B., HOWITZ, K.T., GOROSPE, M., DE CABO, R., SINCLAIR, D.A. (2004) *Calorie restriction promotes cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. Science 305, 390-2

COUSSENS, M., MARESH, J.G., YANAGIMACHI, R., MAEDA, G., ALLSOP, R. (2008) *Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function*. Plos One 3., e1571

CUI, Y.- CHEN, Z.- SHA, J (2004): *Effects of reproductive hormones on spermatogenesis*. Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology., 10(6),465-467

CUNHA-NETO, E.-RIZZO, L.V. (1989): *Prostaglandin E2 inhibits proliferation but not interleukin-2 production by phorbol ester plus calcium ionophore-activated murine T cell clones*. Braz J Med Biol Res. 22(3), 365-77

- DELFINO F.J., BOUSTEAD, J.N., FIX, C., WALKER, W.H. (2003) *NF-kB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells*. [Mol Cell Endocrinol](#). 28, 201(1-2), 1-12
- DELFINO, F., WALKER W.H. (1998) *Stage-specific nuclear expression of NF-kappaB in mammalian testis*. *Molecular Endocrinology* 12(11),1696-707
- DELFINO, F., WALKER, W.H. (1999) *NF-kB Induces cAMP-response element-binding protein gene transcription in Sertoli Cells*. *The Journal of biological chemistry* 274, 35607-13
- DENNING-KENDALL, P.A.- WATHES, D.C. (1994): *Acute effects of prostaglandin F(2a), luteinizing hormone, and estradiol on second messenger systems and on the secretion of oxytocin and progesterone from granulosa and early luteal cells of the ewe*. *Biology of Reproduction.*, 50(4), 765-773
- DEY, S., BAKTHAVATCHALU, V., TSENG, M.T., WU, P., FLORENCE, R.L., GRULKE, E.A., YOKEL, R.A., DHAR, S.K., YANG, H.S., CHEN, Y., St CLAIR, D.K. (2008) *Interactions between SIRT1 and AP-1 reveal a mechanistic insight into the growth promoting properties of alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles in mouse skin epithelial cells*. *Carcinogenesis* 29(10), 1920-9
- DUMONT, J.E., NUNEZ, J., DENTON, R.M.: *Hormones and cells regulations*. European Symposium Volume 7. Elsevier biomedical press Amsterdam-New York-Oxford, 1983, 108-148s.
- FAUVET, R.- DUFOURNET ETIENNE, c.- PONCELET, C.- BRINGUIER, A.F.- FELDMANN, G.- DARAI, E. (2006) : *Effects of progesterone and anti-progestin (mifepristone) treatment on proliferation and apoptosis of the human ovarian cancer cell line, OVCAR-3*. *Oncol Rep.* 15(4), 743-8
- FLOEGE, J.- JOHNSON, R.J.- GORDON, K.- IIDA, H.- PRITZL, P.- YOSHIMURA, A.- CAMPBELL, C. ALPERS, C.E.- COUSER, W.G. (1991): *Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis*. *Kidney Int.* 40(3), 477-88

FLOEGE, J.-TOPLEY, N.-RESH, K. (1991): *Regulation of mesangial cell proliferation*. Am J Kidney Dis. 17(6), 673-6

FOLLER, M.- KASINATHAN, R.S.- DURANTON, C.- WIEDER, T.- HUBER, S.M.- LANG, F. (2006):  
*PGE2-induced apoptotic cell death in K562 human leukaemia cells*. Cell Physiol Biochem. 17(5-6),201-10

FRYE,R.(2000) „*Phylogenetic classification of procaryotic and eucaryotic Sir2-life proteins*“.Biochem.Biophys Res Commun 273(2):793-8.DOI:10.1006/bbrc.2000.3000  
PMID 10873683

FU, M., LIU, M., SAUVE, A.A., JIAO, X., ZHANG, X. (2006) *The hormonal control of androgen receptor function through SIRT1*. Mol Cell Biol. 26, 8122-35

GAMMELTOFT, S.- KAHN, C.R. (1995): Hormone signaling via membrane receptors. Endocrinology, 145 (3), 17-66.

GARTENHAUS,R.B.,WANG,P., HOFFMAN,P.1996.“ *Induction of the Waf1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53 –independent pathway*.Proc Natl Acad Sci USA.93(1),1993.265-268s

GHOSH, S., MAY, M.J., KOPP, E.B. (1998) *NF- $\kappa$ B and rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu. Rev. Immunol. 16, 225-260

GHOSH, AK. (2003) : *Regulation by prostaglandin E2 and histamine of angiogenesis in inflammatory granulation tissue*. Yakugaku Zasshi. 123(5) 295-303

GOBBETTI, A.- ZERANI, M. (1993): *Possible roles for prostaglandins and F(2a) in seasonal changes in ovarian steroidogenesis in the frog (Rana esculenta)*. Journal of Reproduction and Fertility., 98(1), 27-32.

GOLDBERG ,AC.-ELIASCHEWITZ, F.G.-MONTOR, W.R.-BACHARO, G.V.-ERRANTE, P.R.-CALLERO, M.A.-CARDOSO, M.R.-BRAGA, P.E.-KALIL, J.-SOGA Y AR, M.C.-RIZZO, L.V. (2005): *Exogenous leptin restores in vitro T cell proliferation and cytokine synthesis in patients with common variable immunodeficiency syndrome*.In: Clin Immunol., 114(2), 147-53.

GONZALES-NAVARRETE F., EISNER, V., MORALES, P., CASTRO, O., POMMER, R., QUIROGA, C., LAVANDERO, S., DEVOTO, L. (2007) *Tumor necrosis factor-alpha activates nuclear factor-kappaB but does not regulate progesterone production in cultured human granulosa luteal cells*. Gynecol. Endocrinol. 23(7), 377-84

GREGORASZCZUK, E.L.- PTAK, A. (2005): *In vitro effect of leptin on growth hormone (GR)- and insulin like growth factor-I (IGF-I)-stimulated progesterone secretion and apoptosis in developing and mature corpora lutea of pig ovarium*. Journal of Reproduction and Development., 51(6), 727-733.

GRINER, E. M.-KAZANIETZ, M.G. (2007) : *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. Nat Rev Cancer. 7(4), 281-94.

GUPTA, B. B.-SPESSERT, R.-VOLLRATH, L. (2005): *Molecular components and mechanism of adrenergic signal transduction in mammalian pineal gland: regulation of melatonin synthesis*. Indian J Exp Bio!., 43(2),

GUTHRIE, H.D.- GARRETT, W.M. (2001): *Apoptosis during folliculogenesis in pigs*. f Agriculture., 44(7), 17-29.

HAN, x.- AMAR, S. (2003): *Role of insulin-like growth factor-I signaling in dental fibroblast apoptosis*.  
Journal of Periodontology., 74(8), 1176-1182.

HANČ,O.- PÁDR ,Z. (1982): *Hormony 2.vyd.*, Praha Academia, 19-20.

HANČ,O.,PÁDR,Z.: *Hormóny,Úvod do ich biológie a chémie*.Praha,Akadémia,1982,520s.

HASEGAWA, Y- NISHIMURA, J.- NITRO, N.- HIRANO, K.- ISHIBASHI, T.- KANAIDE, H. (2006): *Prostaglandin F2alpha, but not latanoprost, increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the pig iris sphincter muscle*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 47(11),4865-71.

HAŠEK,M.,HAŠKOVÁ,V.,KLEIN,J.,HOJA,Š.: Biológia, Vydavatel'stvo Obzor,1968,259s

HENRY, L.- NORMAN W. (2003) : *Encyclopedia of Hormones*, 2. vyd., 456-61.

HENRY, L.- NORMAN W. (2003) : *Encyclopedia of Hormones*, 2. vyd., 56-68.

HONG, Ch.Y., PARK, J.H., SEO, K.H., JIN-MAN, K., YOUNG, I.M, CHOI, H-S., LEE, K. (2003) *Expression of MIS in the testis is downregulated by tumor necrosis factor alpha through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-κB*. Molecular and cellular biology 23, 6000-12, ISSN 0270-7306

HONG, Ch.Y., PARK, J.H., AHN, R.S., IM, S.Y., CHOI, H-S., SOH, J., MELLON, S.H., LEE K. (2004) *Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine Tumor Necrosis Factor Alpha*. Molecular and Cellular Biology 24, 2593–2604

HORI, T.- YAMANAKA, Y.- HAYAKAWA, M.- SHIBAMOTO, S.- TSUJIMOTO, M.- OKU, N. (1991): *Prostaglandins antagonize fibroblast proliferation stimulated by tumor necrosis factor*. Biochemical and Biophysical Research Communications., 174(2), 758-766

HOSOKAWA, K.- AHARONI D, DANTES, A.- SHAULIAN, E.- SCHERE-LEVY, C.- ATZMON, R.-KOTSUJI, F.- OREN, M.- VLODAVSKY, 1.- AMSTERDAM, A. (1998): *Modulation of Mdm2 expression and p53 induced apoptosis in immortalized human ovarian granulosa cells*. Endocrinology. 139(11),4688-700

HOSTINO, Y- KURODA, R.- NAGAMUNE, K.- YAGI, M.- MIZUNO, K.- YAMAGUCHI, M.- MURATSU,H.-YOSHIYA, S.- KUROSAKA, M. (2001): *In vivo measurement of the pivot-shift test in the anterior cruciate ligament-deficient knee using an electromagnetic device*. Am J Sports Med. 35(7),1098-104.

HOUCHEN, C.W.- STURMOSKI, M.A.- ANANT, S.- BREYER, R.M.- STENSON, W.F. (2003): *Prosurvival and antiapoptotic effects of PG~ in radiation injury are mediated by EP2 receptor in intestine*. American Journal of Biology - Gastrointestinal and Liver Physiology ., 284 (3) 490-498

HUC, L. - TEKPLI, X. - HOLME, J.A. - RISSEL, M. - SOLHAUG, A - GARDYN, C. - LE MOIGNE, G. GORRIA, M. - DIMANCHE - BOITREL, M.T. - LAGADIC - GROSSMANN, D. (2007) : *c-Jun NH2-terminal kinase-related Na<sup>+</sup> H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 activation controls hexokinase IT expression in benzo(a)pyrene-induced apoptosis*. Cancer Res. 67(4), 1696-705.

CHEN, C.L., EDELSTEIN, L.C., GELINAS, C. (2000) *The Rel/ NF- $\kappa$ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)*. Molecular and Cellular Biology 20, 2687-2695

CHERNIGOVSAYA, E.V.- TARANUKHIN, A.G.- GLAZOVA, M.Y.- YAMOVA, L.A- FEDOROV, L.M. (2005): *Apoptotic signaling proteins: possible participation in the regulation of vasopressin and catecholamines biosynthesis in the hypothalamus*. Histochem. Cell BioI. 124,523-533.

CHRENEK,P.: *Genetické manipulácie s embryami*.Výskumný ústav živočíšnej výroby,Nitra,2002,83s

JIANG, J.Y.- CHEUNG, C.K.M.- WANG, Y - TSANG, B.K. (2003): *Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia*.Frontiers in Bioscience. 8 222-237.

JIMENEZ DEL RIO, M.- VELEZ-PARDO, C. (2006): *Insulin-like growth factor-1 prevents A $\beta$ (25-35)/(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis in lymphocytes by reciprocal NF-KB activation and p53 inhibition via PI3K-dependent pathway*. Growth Factors., 24(1), 67-78.

JINDRA,A.,KOVÁCS,P.,PŠENÁK,M.,ŠÍPAL,Z.:*Biochémi*a.Vydavateľstvo Osveta,1985,556s

KAEBERLEIN,M.(2010).“ *Resveratrol and rapamycin: one they anti-aging drugs?*“Bioessays,32/21,96-99DOI:10:1002/bies.200900171

KIM,H.,PATEL,K.,MULDOON-JACOBS,K.,BISCHT,K.,AYKIN-BORNS,N.,PENNINGTON,J.,VAN DER MEER,R.et al.(2010).“ *SIR3 in a mitochondria localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during*“.Stress cancer cells.(17/1),41-52 DOI:10.1016/j.ccr.2009.11./23

KIMURA, T.- TANIZAWA, O.- MORI, K- BROWNSTEIN, MJ.- OKAYAMA, H. (1992): *Structure and expression of a human oxytocin receptor*. Nature., 356(6369), 526-529.

KJAR, A.- KNIGGE, u.- WARBERG, J. (1995): *Involvement of oxytocin in histamine- and stress-induced ACTH and prolactin secretion*. Neuroendocrinology., 61(6),704-713.

KLIKA,E.,VACEK,Z.,DVOŘAK,M.,KAPELLER,K.,: *Embryológia*.Vydavateľstvo Osveta,1987,309s.

KLIMENT,J.a kol.: *Reprodukcia hospodárskych zvierat*.Bratislava:Príroda,1989,378s

KLINE, L.W.- KARPINSKI, E. (2005): *Progesterone inhibits gallbladder motility through multiple signaling pathways*. Steroids., 70(9), 673-679.

KOBAYASHIK, Y., FURUKAWA-HIBI, Y., CHEN, C., HORIO, Y., ISOBE, K., IKEDA, K., MOTOYAMA, N. (2005) *SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress*. Int. J.Mol.Med. 16(2), 237-43

KOIKE, M- YAMANAKA, Y.- INOUE, M- TANAKA, H.- NISHIMURA, R.- SEINO, Y. (2003): *Insulin-like Growth Factor-1 Rescues the Mutated FGF Receptor 3 (G380R) Expressing ATDC5 Cells from Apoptosis Through Phosphatidylinositol3-Kinase and MAPK* Journal of Bone and Mineral Research., 18(11), 2043-2051.

KOLTHUR-SEETHARAM , U., TEERDS, K.,DE ROOIJ, D.G., WENDLING, O., MC BURNEY, M., SASSONE-CORSI, P., DAVIDSON, I. (2009) *The histone deacetylase*

- SIRT1 controls male fertility in mice through regulation of hypothalamic-pituitary gonadotropin signaling.* Biol Reprod. 80, 384-91
- KOMOTO, J.- YAMADA, T.- WATANABE, K- TAKUSAGAWA, F. (2004): *Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKRIC3).* Biochemistry. 43(8), 2188-98
- KOVÁČIK, J., VALENT, M., KOLLÁROVÁ, E.: *Fyziológia zvierat.* Nitra: VŠP, 1996, 254-257s.
- KREEZE, A. a i.: *Praktická endokrinológia.* Bratislava: Slovak Academic Press, 1993, 7-56s.
- KUMARESAN, P.-KUMARESAN, M.-HOSSINI, M.-ARELLANO, C.-VASICKA, A. (1983): *Human ovulation and plasma oxytocin.* Int J Gynaecol Obstet., 21(5), 413-8.
- LANGLEY, E., PEARSON, M., FARETTA, M., BAUER, U.M., FRYE, R.A., MINUCCI, S., PELICCI, P.G., KOUZARIDES, T. (2002) *Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence.* EMBO J. 21, 2383-96
- LECHAN, R.M.-FEKETE, C. (2004): *Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome.* J Endocrinol Invest., 27(6) , 105-19
- LEUNG, P., C., K., ADASHI, E., Y.: *The ovary*, 2. vydanie, 2003, ISBN 0-12-444-562-4
- LEUNG, P.C.K., STEELE, G.L.: *Endocrine Rev.* 13, 1992, 476-498s.
- LI, J.- TSANG, RK (1995): *Prostaglandins mediate the stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis by transforming growth factor  $\alpha$  in hen granulosa cells during ovarian follicular development.* Biology of Reproduction., 52(5), 1050-1058.
- LIMBECKOVÁ, K., MORAVČÍK, M.: *Ludské telo.* Nakladatelství a vydavatelství Cesty, Praha, 1996, 336s., ISBN 80-7181-094-0
- LIU , YL.-ZHONG, YQ.-CHI, S.M.-ZHU, Y.L. (2005) : *Effect of leptin on growth hormone secretion and apoptosis of GH3 cells.* Sheng Li Xue Bao., 57(2), 254-258.



LUCAS, W.E. (2001): *Causal relationships between endocrine metabolic variables in patients with endometrial carcinoma*. Obstetrical and Gynecological Survey., 29 (8), 507-528.

LUCKMAN, S.M. (1995): *Stimulus-specific expression of inducible transcription factors*. Adv Exp Med Biol., 395, 37-48.

MAILLET, M.- ROBERT, S.I.- LEZOUALC'H, F. (2005): *New insights into serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease?* Curr Alzheimer Res. 1(2), 79-85

MAKAREVICH, A.V.- SIROTKIN, A.V.- FRANEK, J.- KWON, H.B.- BULLA, J. (2004): *The Role of Oxytocin, Protein Kinase A, and ERK-Related MAP-Kinase in the Control of Porcine Ovarian Follicle Functions*. Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes., 112(2), 108-114.

MANCHANDA, R.-KIM, J.M.-TSANG, B.K. (2001) : *Role of prostaglandins in the suppression of apoptosis in hen granulosa cells by transforming growth factor alpha*. Reproduction. 122(1) 91-101.

MARHSTROM, E.-SUNDELL, K.-LYSDAHL, M.-ANDERSSON, G.-SCHEIDIN, U.-KLANG, B. (2002): *Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation*. Reproduction., 22(5), 23-30.

MARTI , H.P. (1997): *The role of matrix metalloproteinases in the activation of mesangial cells*. Transpl Immunol, 23(4), 97-100.

MATSUO,H.,BABA,Y.,NAIR,R.M.G.:*Structure of the porcine LH and FSH- releasing hormone.I.The proposed amino acid sequence*.Biochem.Biophys.Res.Comm.,1971,43s.,1334-1339

MATON, G.- THIBIER, C.- CASTRO, A- LORCA, A- PRIGENT, c.- JESSUS, C. (2003): *Cdc2-cyclin B triggers H3 kinase activation of Aurora-A in Xenopus oocytes*. Journal of Biological Chemistry., 278 (24) 21439-21449.

MEACHEM, S.J.- RUW ANPURA, S.M.- ZIOLKOWSKI, J.- AGUE, J.M.- SKINNER, M.K.- LOVELAND, K.L. (2005): *Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation*. Journal of Endocrinology., 186(3) 429-446.

MI, Y.- ZHANG, C.- XIE, M.- ZENG, W. (2004): *Effects of follicle-stimulating hormone and androgen on proliferation of cultured testicular germ cells of embryonic chickens*. General and Comparative Endocrinology., 138(3), 237-246.

MIYAMOTO, A.- SCRAMS, D. (1991): *Oxytocin stimulates progesterone release from microdialyzed bovine corpus luteum in vitro*. Biol Reprod. 199144(6),1163-70

MORITA, T.- SHIBATA, K.- KIKKAWA, F.- KARIYAMA, H.- INO, K.-MIZUTANI, S. (2004): *Oxytocin inhibits the progression of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo*. International Journal of Cancer., 109(4), 525-532.

MOTOKURA, T.- ENDO, K.- KUMAKI, K.- OGATA, E.- IKEDA, K. (1995): *Neoplastic transformation of normal rat embryo fibroblasts by a mutated p53 and an activated ras oncogene induces parathyroid hormone-related peptide gene expression and causes hypercalcemia in nude mice*. Journal of Biological Chemistry., 270(52), 30857-30861.

MURDOCH, W.J.- VAN KIRK, E.A. (2002): *Steroid hormonal regulation of proliferative, p53 tumor suppressor, and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells*. Molecular and Cellular Endocrinology., 186(1) 61-67.

NAGATA, S.- NAGASE, H.- KAWANE, K.- MUKAE, N.- FUKUYAMA, H. (2003): *Degradation of chromosomal DNA during apoptosis*. Cell Death Differ., 10(1) 108-16.

NATOLI, G. (2008) When Sirtuins and NF- $\kappa$ B Collide. Cell 136, 19-21

NEČAS, O., HOJA, Š., MACKU, J.: *Všeobecná biológia*, 2. prepracované vydanie, Vydavateľstvo Osveta, 1974, 651 s

- NELSON-DOOLEY, E.- DELLA-FERA, M.A.- HAMRICK, M.- BAILE, C.A. (2005): *Novel treatments for obesity and osteoporosis: targeting apoptotic pathways in adipocytes*. *Curr Med Chem.*, 12(19), 2215-25.
- NENCIONI, A.- LAUBER, K.- GRUNEBACH, F.- VAN PARIJS, L.- DENZLINGER, C.-WESSELBORG, S.-BROSSART, P. (2003): *Cyclopentenone Prostaglandins Induce Lymphocyte Apoptosis by Activating the Mitochondrial Apoptosis Pathway Independent of External Death Receptor Signaling*. *Journal of Immunology.*, 171(10), 5148-5156.
- NIEUWENHUIZEN, A.G.- SCHUILING, G.A- HILBRANDS, L.G.- BISSCHOP, E.M.- KOITER, T.R. (1998) : *Proliferation of pancreatic islet-cells in cyclic and pregnant rats after treatment with progesterone*. *Horm Metab Res.* 30(11), 649-55.
- NISHIKORI, M. (2005) *Classical and alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and their roles in lymphoid malignancies*. *J.Clin.Exp.Hematopathol* 45, 15-24
- NORTH,BJ.,VERDIN,E.(2004) „*Sirtuins SIR2 related NAD-dependent protein deacetylases*“. *Genome Biol.*5(5):224:DOI:10.1186/gb-2004-5-5-224.PMID 15128440
- OKUDA, K- KORZEKWA, A.- SHIBAYA, M.- MURAKAMI, S.- NISHIMURA, R.- TSUBOUCHI, M.WOCLA WEK-POTOCKA, L.- SKARZYNSKI, DJ. (2004): *Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells*. *Biology of Reproduction.*, 71(6), 2065-2071.
- PAN, M.H.- LAI, C.S.- HSU, P.e.- WANG, Y.J. (2005): *Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 53(3), 620-630.
- PATAER, A- FANALE, M.A.- ROTH, J.A.- SWISHER, S.G.- HUNT, K.K. (2006): *Induction of apoptosis in human lung cancer cells following treatment with amifostine and an adenoviral vector containing wild-type p53*. *Cancer Gene Ther.* 13(8),806-14.
- PATON,A.C.,COLLINS,W.P.:*Oxford.Rev.Reprod.Biol.*,14,1992,170-223s.

PAULOV,Š.:*Fyziológia živočíchov a človeka*, Bratislava, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1980, 644s

PEARSON, KL., BAUR, JA., LEWIS, KN., PESHKIN, L., LABINSKY, N. ET AL. (aug. 2008) "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span" 8(2):157-68. DOI:10.1016/j.cmet.2008.06.011. PMID 18599363

PERKINS, N.D. (2004) *NF-κB: tumor promoter or suppressor?* Trends in Cell Biology 14, 64-8

PETROVIČOVÁ, I., KRŠKOVÁ, L., STREJČEK, F., ŠVARCOVÁ, O., LAURINČÍK, J.: *Fyziológia živočíchov a človeka*. Nitra. Univerzita Konštantína Filozofa, Fakulta prírodných vied, 2006, 157s.

PÉQUEUX, C.-KEEGAN, B.P.-HAGELSTAIN, M.T.-GEENEN, V.-LEGROS, J.-NORTH, W.G. (2004): *Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway*. Endocrine-Related Cancer, 11(4), 871-885.

PIEKLO, R.- GREGORASSZCZUK, E.L.- LESKO, J.- GOLAIS, F.- STOKLOSOWA, S. (1999): *Enhanced proliferation and progesterone production by porcine granulosa cells cultured with pseudorabies virus growth factor (pRGF)*. Journal of Physiology and Pharmacology, 50(1), 129-137.

POMAR, F.J.R.- ROELEN, B.A.J.- SLOT, K.A.- VAN TOL, H.T.A.-COLENBRANDER, B. TEERDS, KJ. (2004): *Role of Fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes in vitro*. Biology of Reproduction, 71(3), 790-796.

POMBO, M.- GARCIA, A.-CAMINOS, E.-GUALILLO, O.-ALVAREZ, C.V.-CASANUEVA, F.F.-DIEGUEZ C. (2001): *Hormonal control of growth hormone secretion*. Department of Pediatrics, 55 (1), 6-11

PTAK, A - KAJTA, M.- GREGORASZCZUK, E.L. (2004): *Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured luteal cells collected from early, mature, and regressing porcine corpora lutea*. Anim Reprod Sci., 80(3-4), 267-79.

RAJENDRASOZHANR, S., YANG, S-R., KINNULA, V.L., RAHMAN, I. (2008) *SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 177, 861–870

RAMONDETTA, L.- MILLS, G.B.- BURKE, T.W.- WOLF, I.K. (2000): *Adenovirus-mediated expression of p53 or p21 in a papillary serous endometrial carcinoma cell line (SPEC-2) results in both growth inhibition and apoptotic cell death: potential application of gene therapy to endometrial cancer*. Clin Cancer Res. 6(1), 278-84.

RASIIIDIAN, J.- IYIRIIARO, G.O.- PARK, D.S. (2007) : *Cell cycle machinery and stroke*. Biochim Biophys Acta. 1772(4), 484-93.

REEDING, T.W., KASTIN, A.J., GONZALES-BARCENA, D.: *The half-life, metabolism and excretion of tritiated luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in man*. J. Clin. Endocrin. Metab., 1973, 37s. 626-631

REFOJO, D.- LFFIERMAN, A.C.- GIACOMINI, D. (2003): *Integrating systemic information at the molecular level: cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells*. Ann N Y Acad Sci., 992, 196-204.

RODINA, AV.- SLADKOVA, L.V.- OBUKHOVA, V.V.- VEZIRKHANOVA, T.Z.,- MOSKALEVA, O.V.- BELETSKII, I.P (2004) : *Inactivation and sensitization of the tumor cells by the gene Bax transfection*. Mol Biol., 39(1), 40-7.

ROSYPAL S. (1997) *Úvod do molekulární biologie*. 2.vyd. Brno Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 399-408s.

ROSYPAL, S.: *Přehled biologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1987, 684s

RUBEN, S.M., NARAYANNAN, R., KLEMENT, J.F., CHEN, C.H., ROSEN, C.A.: *Departme*

*nt of gene regulation*, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, New Jersey 07110-1199, Mol Cell Biol. 1992 February, 12(2):444-454

SAIFUDEEN, Y.-DIPP, S.-FAN, H.-EI-DAHR, S. S. (2005): *Combinatorial control of the bradykinin B2 receptor promoter by P53, CREB, KLF-4, and CBP: Implications for terminal nephron differentiation*. Am J Physiol Renal Physiol., 288 (5 57-5) 899-909.

SAITOH, M.- NISHITOH, H.-FUM, M.-TAKEDA, K.-TOBIUME, K.-SAWADA, Y.-KAWABATA, M.MIY AZONO, K.-ICHIJO H .. (1998): *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK)*. Biochemistry., 17(9), 170.

SAN MIGUEL, S.M.- NAMDAR-ATTAR, M.- NOH, T.- FRENKEL, B.- BAB, I. (2005): *ERK1/2-activated de novo Mapkapk2 synthesis is essential for osteogenic growth peptide mitogenic signaling in osteoblastic cells*. Journal of Biological Chemistry., 280(45), 37495-37502.

SANISLÓ, P. - SIROTKIN, AV. - HETENYI, L. - PIVKO, J.- SCHAEFFER, R.J. (2003): *Účinnok inzulínu podobného rastového faktora-I a rozličných proteínkináz v regulácii proliferácie a steroidogenézy ovariálnych buniek ošipáných in vitro*. Acta fytotechnica et zootechnica 6, 1047-56.

SASAKI, T., MAIER, B., BARTKE, A., SCRABLE, H. (2006) *Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal*. Aging Cell 5, 413-422

SASSON, AR- GULIZIA, J.M.- GALVA, A- ANDERSON, J.- THOMPSON, J. (2006): *Pancreaticoduodenectomy for suspected malignancy: have advancements in radiographic imaging improved results?* Am J Surg. 2006 Dec;192(6), 888-93.

SCOTT, G- JACOBS, S- LEOPARDI, S.- ANTHONY, F.A.- LEARN, D.- MALAVIYA, R. PETLAND, A (2005): *Effects of PGF<sub>2a</sub> on human melanocytes and regulation of the FP receptor by ultraviolet radiation*. Experimental Cell Research., 304(2), 407-416

SEKLA, B., ŠANTAVÝ, F., FRANKENBERG, Z.: *Obecná biologie*, Praha, Státní zdravotnické nakladatelství, 1962, 420s

- SERHAN, C.N.-LEVY, B. (2003) : *Success of prostaglandin E2 in structure-function is challenge for structurebased therapeutics*. Proc Natl Acad Sci USA 100(15), 9044-9.
- SHANKAR, D.B. - SAKAMOTO ,K.M. (2004) *The role of cyclic-AMP binding protein (CREB) in leukemia cell proliferation and acute leukemias*. Leuk Lymphoma., 45(2), 265-70.
- SHANKAR, E.M.- MOHAN, V.- PREMALATHA, G.- SRINIV ASAN, R.S.- USHA, AR. (2005): *Bacterial etiology of diabetic foot infections in South India*. Eur J Intern Med. 16(8), 567-70.
- SHAO, J.-SHENG, G.G.-MIFFLIN, R.C.-POWELL, D.W.-SHENG, H. (2006) : *Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis*. Cancer Res. 66(2), 846-55
- SHAYWITZ, A.J.- DOVE, S.L.- KORNHAUSER, J.M.- HOCHSCHILD, A-GREENBERG, M.E. (2000): *Magnitude of the CREB-dependent transcriptional response is determined by the strength of the in tel' action between the kinase-inducible domain of CREB and the KIX domain of CREB-binding protein*. Mol Cell BioI. 20(24), 940922.
- SHENG, L.- LID, D.Y- SHEN, K (2003): *Preliminary study on pathway of follicle-stimulating hormone on human epithelial ovarian cancer cell proliferation*. Zhonghua fu chan ke za zhi., 38(12), 752-755.
- SHIMAD, M.- TERADA, T. (2002): *FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes*. Mol Hum Reprod., 8(7), 6128.
- SHIRHEV, S.V.- KUKLINA, E.M.- YARILIN, A.A. (2003): *Reproductive hormones in the regulation of apoptosis ofneutrophils*. Biochemistry (Moscow) .,68(6),688-695.
- SHIRHEV, S.V.- KUKLINA, E.M.- Y ARILIN, A.A. (2003): *Role of reproductive hormones in control of apoptosis ofT-lymphocytes*. Biochemistry (Moscow) .,68(4),470-475.
- SCHLOSSER, S.F.- ALMEIDA, O.F.X.- PATCHEV, V.K.- YASSOURIDIS, A.- ELANDS, J. (1994): *Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat*

*pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V(lb) type. Endocrinology., 135(5),2058-2063 .*

SCHWER,B.,VERDINO,E.(febr.2008) „*Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins*“.Cell Metabolism.7(2):104-12DOI:10.1016/i.cmet2007.11.006. PMID 18249170

SCHULZ, R. W.- van DIJK, W.- BOGERD, J. (2003): *Sertoli cell proliferation and FSH signalling in African catfish, Clarias gariepinus*. Fish Physiology and Biochemistry., 28(1-4), 223-224.

SIBLEY,D.R.a i.:*Endocrin.Rev.*,1988,38-56s

SIROTKIN,A.:*Biologicky aktivne látky v bunkách vaječníkocicavcov*.Nitra:Agrotár,1988,34s

SIFER, C- BLANC-LA YRAC, G.- BRINGUIER, A.F.- PORCHER, R- MADELENAT, P.- FELDMANN, G.E.- BENIFLA, J.L. (2003): *Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist and Follicle Stimulating Hormone on the incidence of apoptosis in human luteinized granulosa cells*. European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology., 110(1), 43-48.

SIMONI, M.- GROMOLL, J.- NIESCHLAG, E. (1997): *The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*. Endocrine Reviews., 18(6), 739-773.

SINGH, J.- HANDELSMAN, D. J. (1996): *The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice*. Journal of Andrology., 17(4), 382-393.

SIROTKIN, A. V. (1998): *Isolated porcine ovaria follicles as a model for the study of hormone and growth factor action on ovaria secretory activity*. Journal of endocrinology., 313-321.



SIROTKIN, A. V. – NITRAY, J. (1992): *The interrelationships between nonapeptide and steroid hormones secretion by bovine granulosa cells in vitro*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology., 43(6), 529-534.

SMITH, L. E. (2005): *IGF-1 and retinopathy of prematurity in the preterm infant*. Biol Neonate., 88(3), 234-44.

SONE, A. – OSAMURA, M. J. (2005): *Practices for managing a flare of long-standing rheumatoid arthritis: survey among French rheumatologists*. Clin Exp Rheumatol. 23(1), 36-42.

SPENCER, T. E. – BAZER, F. W. (2002): *Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library., 7(1), 1879-1898.

SPICER, L.J., ECHTERNCAMP, S.E.: *The ovarian insulin and insulin – like growth factor system with emphasis on domestic animals*. In: Domestic Animal Endocrinology, 12, 1995, 223-245s.

STANEK, I.: *Embryológia človeka*, Bratislava, Slovenská akadémia vied a umení, 1952, 441s

STENSO, W. F. (2007): *Prostaglandins and epithelial response to injury*. Curr Opin Gastroenterol. 23(2), 107-10.

SUOMAINEN, L. – DUNKEL, L. – KETOLA, I. – ERICSSON, M. – ERKILLA, K. (2004): *Activator protein-1 in human male germ cell apoptosis*. In: Mol Hum Reprod., 10(10), 743-53.

SUZUKI, M. – Youli, R. J. – TJANDRA, N. (2003): *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization*. Cell Biochemistry., 103(4), 645-54.

SUZUKI, S. – CHUANG, L. F. – DOI, R. H. (2003): *Morphine suppresses lymphocyte apoptosis by blocking p53 mediated death signaling*. Biochemical and Biophysical Research Communications., 308(4), 802-808.

TANAKA, M. – MYAZAKI, T. – TANIGAKI, S. – KASAI, K. – MINEGISHI, K. – ISHIMITO, H. – YOSHIMURA, Y. (2000): *Participation of reactive oxygen species in PGF2 $\alpha$ -induced apoptosis in rat*. J Reprod Fertil. 120(2), 239-45.

TELLERIA, C.M., GOYENECHÉ, A.A., STOCCO, C.O., GIBORI, G. (2004) *Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of rat luteal function: potential roles as survival factor and inhibitor of 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase*. Journal of Molecular Endocrinology 2(2), 365-83

THOMSON, P. A. – JELINEK, D. F. – LIPSKY, P. E. (1984): *Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E2*. J Immunol. 133(5), 2446-53.

TOBEY, R. A. – VALDEZ, Y. E. – LEHNERT, B. E. (1990): *Proliferation of rat and human lung fibroblasts following exposure to prostaglandin E2*. Exp Lung Res. 16(3), 235-55.

TSAI-TURTON, M. – LUDERER, U. (2006): *Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles*. Endocrinology., 147(3), 1224-36.

UHRÍN, V., UHRÍN, P.: *Základy molekulárnej biológie*, Nitra: VŠP, 1995

VIGGIANO, M. – FRANCHI, A. M. – ZICARI, J. L. – RETTORI, V. – GIMENO, M. A. – KOZŁOWSKI, G. P. – GIMENO, A. L. (1989): *The involvement of oxytocin in ovulation and in the outputs of cycle-oxygenase and 5-lipoxygenase products from isolated rat ovaries*. Prostaglandins. 37(3), 367-78.

VILČEK, F., ČINČURA, F., FERÁK, V., GOLAIŠ, F., KETTNER, M., KOLÉNY, M., ORSZÁHG, I., PECIAR, V., POSPÍŠIL, M., F., VLČEK, D.: *Prehľad biológie*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, 2002, 310s. ISBN 80-08-03351-7

VINZE, M. – SHARMA, M. K. – SINGH, D. (2001): *Effect of follicular fluid proteins and gonadotropins on progesterone secretion by buffalo granulosa cells in vitro*. *Biology of Reproduction*, 61(6), 420-426.

VILČEK, F., ČINČURA, F., FERÁK, V., GOLAIS, F., KETTNER, M., KOLÉNY, M., ORSZÁGH, I., PECIAR, V., POSPÍŠIL, M., F., VILČEK, D.: *Prehľad biológie*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, 2002, 310s. ISBN 80-08-03351-7

VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*, Praha: Academia, 1996, 507s

WADE, N.: "The quest for away around aging". *Health and science*. International Herald Tribune. [http://www.iht.com/articles/2006/11\\_zdroj](http://www.iht.com/articles/2006/11_zdroj) 2008-11-30

WANG, Y., CHAN, S., TSANG, B.K. (2002) *Involvement of inhibitory nuclear factor-kappaB (NFkappaB)-independent NFkappaB activation in the gonadotropic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro*. *Endocrinology*, 143(7), 2732-40

WANG, J., HOL, PAN Y, LING E, PASINETTI, GM.: *Biochim. Biophys Acta*. 2009 Nov. 26

WU, S., FLINT, J.K., REZVANI, G., DE LUCA, F. (2007) *Nuclear Factor-kB p65 facilitates longitudinal bone growth by inducing growth plate chondrocyte proliferation and differentiation and by preventing apoptosis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 33698–33706

XIAO, C.W., ASSELIN, E., TSANG, B.K. (2002) *Nuclear factor kappaB-mediated induction of Flice-like inhibitory protein prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in rat granulosa cells*. *Biology of reproduction* 67(2), 436-41

XIE, M. – ZHANG, C. – ZENG, W. – MI, Y. (2004): *Effects of follicle-stimulating hormone and 17β-estradiol on proliferation of chicken embryonic ovarian germ cells in*

*culture*. Comparative Biochemistry and Physiology – Molecular and Integrative Physiology., 139(4), 521-526.

YACOBI, K. – WOJTOVICZ, A. – TSAFRIRI, A. – GROSS, A. (2004): *Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture*. Endokrinology., 145(4), 1943-1951.

YAMMAMOTO,H.,SCHOAJANS,K.,AUWERX,J.(AUG.2007)“*Sirtuins functions in health and disease*“,Mol.endocrinol.21(8):1745-55DOI:10.1210/ml.2007-2009 PMID 17456799

YAU, A. H. – ZAHRADKA, P. (2003): *PGE2 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor*. Molekular and Cellular Endokrinology., 203(1-2), 77-90.

YUN C. H. – TANG, Y. H. – FENG, Y. M. – AN, X. M. – CHANG, W. R. – LIANG, D. C. (2004): *A crystal structure of mini IGF-1(2): An analysis of the disulfide isomerization property of IGF-1 based on the three-dimensional structure*. Biochemical and Biophysical Research Communications 326(1), 52-59

ZAHEER, A. – YOREK, M. A. – LIM, R. (2001): *Effects of glia maturation factor overexpresion in primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion*. Neurochemical Research., 26(12), 1293-1299.

ZÁHRADNÍK,P., KOLLÁROVÁ,M.: *Prehľad chémie*. Organická chémia a biochémia. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava,2002, 322s. ISBN 80-08-03349

ZHANG, W. – HU, Y. – LIN, T. R. – FAN, Y. – MULHOLLAND, M. W. (2004): *Stimulation of neurogenesis in rat nucleus of the solitary tract by ghrelin*. Peptides., 26(11), 2280-2288.

ZHANG, W – LIN, T. R. – HU, Y. – FAN, Y. – ZHAO, L. – STUENKEL, E. L. – MULHOLLAND, M. W. (1994): *Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus*. Journal of Physiology., 559(3), 729-737.

ZHAO,K.,HARSHAW,R.,CHAI X,MARMORSTEIN,R.(June 2004). „*Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD<sup>+</sup>-dependent SIR2 histone protein deacetylases*“.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.101(23):8563-8.DOI:10.1073/pnas.041057101:PMID 15150415

## **PRÍLOHY**

**Tabuľka č.: 1**

**Experiment č.: 557- 2** Vplyv transfekcie cDNA konštrukciami vyvolávajúcimi overexpresiu p53, NF kappaB (p50 a p65) sirtuínu a ich kombinácií na výskyt apoptózy ( expresiu caspázy3) a proliferáciu ( expresiu MAPK/ERK 1,2) kultivovaných buniek ošípaných

Transkripčný faktor	Sirtuín	% buniek obsahujúcich			
		Caspáza 3		MAPK/ERK 1,2	
(kontrol)	-	2,68 ± 1,68	(88)	49,15 ± 7,14	(65)
p53	-	2,49±0,89	(49)	32,38 ± 11,37 <sup>a</sup>	(136)
p 50	-	4,10 ± 2,90 <sup>a</sup>	(256)	30,64 ± 8,06 <sup>a</sup>	(137)
p 65	-	2,47 ± 0,87	(139)	27,28 ± 7,10 <sup>a</sup>	(167)
(kontrol)	+	2,47 ± 1,47	(53)	10,0 ± 7,29 <sup>b</sup>	(58)
p 53	+	6,28 ± 1,88 <sup>a,b</sup>	(120)	21,86 ± 8,19 <sup>b</sup>	(68)
p 50	+	14,56 ± 1,08 <sup>a,b</sup>	(462)	15,84 ± 7,27	(61)
p 65	+	1,81 ± 1,31	(58)	53,56 ± 14,71 <sup>a,b</sup>	(67)

**VYSVETLIVKY:**

- Uvedené čísla sú (priemer ± smerodajná odchýlka)
- V zátvorkách (...) – celkový počet analyzovaných buniek
- a- vplyv transkripčného faktora: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre transkripčné faktory
- b- vplyv sirtuínu: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre sirtuín

**Tabuľka č.: 2**

**Experiment č.: 547 -1 SIRT** Vplyv hormónov FSH, oxytocínu a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných

Hormón	Sirtuín	% buniek obsahujúcich SIRTUÍN	
FSH 0 ng/ml .	-	11,08 ± 8,32	(35)
FSH 1 ng/ml,	-	0 ± 0 <sup>a</sup>	(29)
FSH 10 ng/ml,	-	56,57 ± 17,71 <sup>a</sup>	(36)
FSH 100ng/ml,	-	22,96 ± 10,04	(35)
oxytocín 0 ng/ml,	-	38,92 ± 11,66	(59)
oxytocín 1ng/ml,	-	49,46 ± 21,11	(39)
oxytocín 10 ng/ml,	-	43,34 ± 10,34	(26)
oxytocín 100ng/ml	-	33,43 ± 14,70	(26)
FSH 0 ng/ml,	+	36,17 ± 8,74 <sup>b</sup>	(13)
FSH 1ng/ml	+	0 ± 0 <sup>a</sup>	(28)
FSH 10 ng/ml.	+	0 ± 0 <sup>a, b</sup>	(33)
FSH 100ng/ml	+	5 ± 5 <sup>a, b</sup>	(25)
oxytocín 0 ng/ml	+	0 ± 0 <sup>b</sup>	(34)
oxytocín 1ng/ml	+	0 ± 0 <sup>b</sup>	(29)
oxytocín 10 ng/ml	+	0 ± 0 <sup>b</sup>	(41)
oxytocín 100 ng/ml	+	30,72 ± 18,34 <sup>a</sup>	(14)

#### VYSVETLIVKY:

- Uvedené čísla sú (priemer ± smerodajná odchýlka)
- V zátvorkách (...) – celkový počet analyzovaných buniek
- a- vplyv hormónu: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre hormony
  - b- vplyv sirtuínu: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre sirtuín

#### Tabuľka č.: 3

**Experiment č.: 547- 2** Vplyv rastového faktora IGF-I a génovej konštrukcie pre sirtuín na expresiu sirtuínu v granulóznych bunkách ošípaných

IGF-I	Sirtuín	% buniek obsahujúcich SIRTUÍN	
0ng/ml,	-	14,36 ± 5,04	(54)
1 ng/ml,	-	19,36 ± 6,71	(37)
10ng/ml,	-	17,25 ± 4,4	(72)



100ng/ml,	-	$4,58 \pm 1,98^a$	(92)
0 ng/ml,	+	$3,58 \pm 1,51^b$	(91)
1ng/ml,	+	$11,6 \pm 4,91^a$	(64)
10ng/ml,	+	$0 \pm 0^{a,b}$	(74)
100ng/ml,	+	$0 \pm 0^{a,b}$	(46)

#### VYSVETLIVKY:

- Uvedené čísla sú (priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka)
- V zátvorkách (...) – celkový počet analyzovaných buniek
- a- vplyv rastového faktora: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre rastový faktor
  - b- vplyv sirtuínu: preukazné ( $P < 0,05$ ) rozdiely s zodpovedajúcimi bunkami nepodrobeným transfekcii génovými konštrukciami pre sirtuín