

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Molekulární mechanismus účinku sulfanu v průběhu
meiotického zrání prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Andrea Veselá

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Hošková

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Molekulární mechanismus účinku sulfanu v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4.4.2016

Poděkování

Děkuji vedoucí své diplomové práce, Ing. Kristýně Hoškové. Dále bych touto cestou ráda poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za jeho podnětné rady, vstřícný přístup, cenné připomínky, trpělivost a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych mu velmi ráda poděkovala za možnost vypracování experimentální části mé diplomové práce v laboratořích na KVD, stejně tak za jeho pomoc a vedení při laboratorní práci. Děkuji také kolektivu KVD za vytvoření přátelského a vstřícného pracovního prostředí, především pak za pomoc Ing. Kateřině Zámostné. V neposlední řadě patří obrovské díky i mým rodičům za jejich psychickou a finanční pomoc během studia a mému partnerovi za to, že mi byl po celou dobu studia oporou.

Molekulární mechanismus účinku sulfanu v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů

Souhrn

V současné době jsou reprodukční biotechnologické metody na vzestupu, ale jejich rozvoj a uplatnění v širším managementu reprodukce závisí na získání dostatečného počtu kvalitních oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách. Předpokladem tohoto požadavku je vytvoření optimálních podmínek v průběhu kultivace oocytů.

Pochopení a znalost procesů, ke kterým v oocyту během zrání dochází, je důležitou a nezbytnou podmínkou optimalizace procesu kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách a zisku dostatečného množství kvalitních oocytů v metafázi II. meiotického dělení. Je známo velké množství mechanismů, které zrání oocytů ovlivňují a řídí, nicméně i přesto nelze tvrdit, že by tento proces byl plně objasněn a prostudován. Jedním z faktorů, který má možnou úlohu v regulaci meiotického zrání oocytů je gasotransmitter sulfan (H_2S), důležitá signální molekula endogenního původu.

Na základě studia H_2S byla stanovena hypotéza, že H_2S aktivně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím regulace klíčových signálních kaskád. Cílem práce bylo stanovit zapojení H_2S do regulace signální kaskády MEK1-MAPK, odpovědné za iniciaci a průběh meiotického zrání oocytů, a kaskády MEK1-PARP-1, jako signalizaci podporující životaschopnost buněk. Pro tento účel byly použity prasečí oocyty, které byly kultivovány v modifikovaných médiích s přidavkem specifické kombinace inhibitorů enzymů (3Ki) nebo v kultivačním médiu s donorem H_2S . Oocyty byly následně podrobeny imunocytochemickému barvení, fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu.

Z výsledků je patrné, že H_2S se podílí na regulaci meiotického zrání. Byla potvrzena hypotéza o vlivu endogenní produkce H_2S na průběh meiotického zrání prasečích oocytů a ovlivnění signální kaskády MAPK. Na základě dosažených výsledků je však pravděpodobné, že signální kaskáda MEK1-PARP-1 není H_2S ovlivněna, na rozdíl od MAPK signalizace, zahrnující zmíněnou MEK1 jako nadřazenou kinázu. MAPK kinázová aktivita je v oocytech signifikantně nižší po ošetření 3Ki. Další experimenty jsou pro detailnější pochopení těchto regulačních drah a k vhodnému ověření mechanismu účinku H_2S nezbytné, zejména pak pro úplné objasnění regulace cílových faktorů prostřednictvím post-translační modifikace S-sulhydratací.

Klíčová slova: oocyt, meiotické zrání, sulfan, MEK1, PARP1, MAPK

Molecular mechanism of hydrogen sulfide action during meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

At present reproductive biotechnology methods are on the rise, but their development and application in the broader management of reproduction is dependent on obtaining a sufficient number of quality oocytes cultured *in vitro*. The prerequisite for this requirement is the creation of the optimal conditions in the course of culturing oocytes.

Understanding and knowledge of the processes that occur in oocyte during maturation is an important and necessary condition for optimizing the process of culturing oocytes *in vitro* and gaining a sufficient number of good quality oocytes in metaphase II of meiotic division. A large number of mechanisms that affect and control oocyte maturation are known, however it cannot be claimed that this process has been fully explained and studied. One factor which has a potential role in the regulation of meiotic maturation of oocytes is gasotransmitter hydrogen sulfide (H₂S), a critical signaling molecule of endogenous origin.

The study of H₂S led to the hypothesis that H₂S actively influences the course of meiotic maturation of pig oocytes by regulating key signaling cascades. The aim of this work was to determine the involvement of H₂S in the regulation of the MEK1-MAPK signaling cascade, responsible for the initiation and progress of the meiotic maturation of oocytes and the MEK1-PARP-1 cascade as signaling that supports cell viability. For this purpose, pig oocytes cultured in modified media were used, supplemented with a specific combination of enzyme inhibitors (3Ki) or in a culture medium with donor H₂S. The oocytes were then subjected to immunocytochemistry staining, fluorescence microscopy and image analysis.

The results show that H₂S is involved in the regulation of meiotic maturation. It confirmed the hypothesis of the endogenous production of H₂S in the course of the meiotic maturation of pig oocytes and the influence of the MAPK signaling cascade. Based on the results, it is however likely that the MEK1-PARP-1 signaling cascade is not affected by H₂S, unlike MAPK signaling, comprising the mentioned MEK1 as superior kinase. MAPK kinase activity is significantly lower in oocytes after treatment 3Ki. Further experiments are for a detailed understanding of these regulatory pathways and for the proper verification of the mechanism of the effects of H₂S necessary, in particular for a full understanding of the target control factors by the post-translational modification of S-sulfhydration.

Keywords: oocyte, meiotic maturation, hydrogen sulfide, MEK1, PARP1, MAPK

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle.....	10
3 Literární řešerše.....	11
3.1 Oogeneze.....	11
3.1.1 Embryonální vývoj zárodečných buněk	11
3.1.1.1 Postnatální vývoj oocytů	12
3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocytů	12
3.1.3 Fáze zrání.....	16
3.1.3.1 Regulační mechanismy zrání oocytů.....	17
3.2 Gasotransmitery	21
3.2.1 Sulfan – H ₂ S.....	21
3.2.1.1 Vlastnosti, biosyntéza a katabolismus.....	21
3.2.1.2 Biologické účinky sulfanu na savčí organismus.....	23
3.2.1.3 Účinky sulfanu na reprodukční funkce.....	24
3.2.1.4 Úloha sulfanu v regulaci meiotického zrání oocytů	25
4 Materiály a metodika.....	28
4.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů.....	28
4.2 Kultivace oocytů	28
4.3 Ošetření oocytů během kultivace	29
4.4 Imunocytochemie	29
4.5 Analýza obrazu.....	29
4.6 Histone H1 a Myelin Basic Protein double assay	29
4.7 Statistická analýza.....	30
5 Výsledky.....	31
5.1 Přítomnost MEK1 a PARP-1 v nezralých GV prasečích oocytech	31
5.2 Vliv H ₂ S na expresi MEK1 v prasečích MII oocytech	32
5.3 Vliv H ₂ S na expresi PARP-1 v prasečích MII oocytech.....	34
5.4 Úloha H ₂ S během meiotického zrání prasečích oocytů	36
5.4.1 Vliv H ₂ S na GVBD a úspěšnost meiotického zrání oocytů.....	36
5.4.2 Vliv H ₂ S na průběh meiotického zrání oocytů	38
5.4.3 Vliv H ₂ S na úspěšnost meiotického zrání oocytů.....	40
5.4.4 Ověření účinku 3Ki na meiotické zrání za současného použití Na ₂ S.....	42
5.5 Vliv H ₂ S na kinázovou aktivitu ve zrajících oocytech.....	44
5.5.1 Vliv H ₂ S na kinázovou aktivitu MPF ve zrajících oocytech	44
5.5.2 Vliv H ₂ S na kinázovou aktivitu MAPK ve zrajících oocytech.....	46

6	Diskuze	48
7	Závěr.....	52
8	Seznam použité literatury.....	53

1 Úvod

Proces reprodukce je důležitou součástí života každého živého jedince. Pokud se navíc zaměříme na hospodářská zvířata, je reprodukce a užitkovost hlavní selekční podmínkou úspěšného chovu a hlavním aspektem stránky ekonomiky a managementu. Vedle základních chovatelských opatření, která vedou k zušlechťování stáda a mezi něž řadíme selektivní výběr vhodných jedinců, zažívají v současné době poměrně rychlý rozvoj i metody biotechnologické. Ty nám umožňují od geneticky nejlepších jedinců získat mnohonásobně větší počet potomků, než jaký by byli schopni zplodit přirozenou cestou, čímž se zvyšuje frekvence požadovaných genů v populaci. Součástí reprodukčních biotechnologických metod je i získávání oocytů a jejich následná kultivace v *in vitro* podmínkách za účelem meiotického zrání oocytů. Právě pochopení a znalost procesů, ke kterým v oocyту během zrání dochází, je důležitou a nezbytnou podmínkou úspěchu těchto metod a jejich rozvoje a širšího uplatnění a to nejen v oblasti chovu hospodářských zvířat, ale i v oblasti humánní medicíny a asistované reprodukce člověka. V neposlední řadě představuje *in vitro* zrání oocytů důležitý nástroj studia mechanismů regulujících buněčný cyklus a gametogenezi.

Během meiotického zrání oocyту, které je součástí procesu oogeneze, probíhají procesy a děje, jejichž výsledkem je vznik oplození schopného oocyту. Tím umožňují vznik a vývoj nového a životaschopného jedince. Tyto komplikované procesy jsou ovlivňovány celou řadou faktorů. Funkce některých z nich je velmi dobře prostudována, zatímco funkce jiných zůstává zatím neobjasněna. Pro správný a plnohodnotný vývoj oocytů v *in vitro* podmínkách je nicméně nezbytné tyto procesy plně pochopit a umožnit tak vytvoření optimálních *in vitro* podmínek.

V poměrně nedávné době bylo zjištěno, že na regulaci vývoje oocyту se mimo jiné podílí i skupina endogenních plynných molekul, tzv. gasotransmiterů. Vedle oxidu dusnatého (NO) a oxidu uhelnatého (CO) je v současné době intenzivně studována úloha sulfanu (H_2S). Až v roce 1996 byla prokázána jeho role ve fyziologické funkci mozku (Abe *et* Kimura, 1996) a následně se ukázalo, že H_2S má vliv na řadu biologických dějů a indukuje řadu fyziologických procesů dosud plně neobjasněnými mechanismy (Kimura, 2010). V současné době je prokázáno, že H_2S hraje důležitou roli za fyziologických i patofyziologických podmínek v centrální nervové soustavě, v kardiovaskulárním systému, hladkém svalstvu a stejně tak v samčí i samičí reprodukční soustavě a reprodukci samotné. Bylo prokázáno, že signální molekula H_2S sehrává určitou roli v procesu meiotického zrání oocytů, nicméně poznatky o jeho přesné úloze a možném využití při zlepšování kvality *in vitro* dozrálých

oocytů jsou velmi omezené. K plnému objasnění jeho regulační úlohy je proto zapotřebí dalších experimentů.

Přestože se složení kultivačních médií snaží plně respektovat prostředí vaječníku samice, tato simulace je za současného stavu poznání stále nedokonalá a stává se tak limitujícím faktorem úspěšnosti zrání savčích oocytů. Studium H_2S , jako faktoru regulujícího meiotické zrání, může vést k preciznější suplementaci kultivačních médií, lepšímu pochopení procesů v samičích reprodukčních orgánech a dalšímu rozvoji biotechnologických reprodukčních metod.

2 Vědecká hypotéza a cíle

Byla stanovena hypotéza, že gasotransmitter H_2S aktivně ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů prostřednictvím regulace klíčových signálních kaskád.

Cílem této práce je zhodnotit:

- 1) vliv endogenní produkce sulfanu na průběh meiotického zrání;
- 2) zapojení sulfanu do regulace signální kaskády MEK1-MAPK regulující meiotické zrání;
- 3) zapojení sulfanu do regulace signální kaskády MEK1-PARP-1 regulující stabilitu genomu.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze neboli vznik samičích pohlavních buněk probíhá ve folikulech vaječníků (Kempisty *et al.*, 2011). Mechanismy oogeneze se u různých živočišných druhů významně odlišují. U některých druhů, jako jsou mořští ježci nebo žáby, samice vyprodukují stovky nebo tisíce vajíček najednou, zatímco u druhů jiných, např. u primátů a většiny savců je počet vyprodukovaných oocytů početně omezený (Gilbert, 2000). U prasat, podobně jako u skotu nebo primátů, začíná oogeneze velmi brzy během prenatálního vývoje a ve fetálním ováriu se současně nacházejí oogonie v mitotické profázi vývoje, meiotické oocyty a primordiální folikuly (Bielańska-Osuchowska, 2006).

3.1.1 Embryonální vývoj zárodečných buněk

Gonády samců i samic jsou prvotně založeny jako párové genitální lišty, *plicae genitalis*. Vznikají proliferací základu gonád coelomového epitelu a kondensací mesenchymu uloženého pod ním. Velmi brzy během embryonálního vývoje dochází k osídlení základu gonád primordiálními zárodečnými buňkami (PGCs - Primordial Germ Cells) (Sadler, 2011). Tyto prvopohlavní buňky jsou základem pro pozdější vznik gamet (Kempisty *et al.*, 2011).

V časném vývojovém stádiu se PGCs objevují mezi entodermovými buňkami ve stěně žloutkového vaku, v blízkosti *allantois*. Améboidními pohyby migrují dorsálním mesenteriem zadního střeva a vcestují tak do genitální lišty (Sadler, 2011). Dle Bielańska-Osuchowsky (2006) se u prasnice tyto primordiální zárodečné buňky objevují v genitální liště asi 24. den embryonálního vývoje, Hunter (2000) ve své práci nicméně zmiňuje, že prvotní zárodečné buňky jsou přítomny již 18. den po oplození. Během migrace do pohlavních lišt, stejně jako po osídlení gonád, podstupují PGCs mnohonásobné mitotické dělení (Sadler, 2011).

Díky mitotickému dělení dochází ke zvýšení počtu zárodečných buněk a tyto mitoticky pomnožené buňky jsou označovány jako oogonie (Hunter, 2000). Jedná se o větší buňky zaobleného kulovitého tvaru vyplněné hyaloplasmou (čirá, tekutá, homogenní základní hmota buněčné plazmy), v níž jsou volně rozptýlené polyribozomy a mitochondrie. Mitochondrie oogonií jsou kulovitého tvaru s úzkými, téměř trubkovitými krystami. Jádro je bohaté na nukleoplasmu a heterochromatin. Jádro může obsahovat jedno nebo více jadérek, které jsou tvořeny fibrilární a granulární složkou (Bielańska-Osuchowska, 2006). U prasat se

počet zárodečných buněk výrazně zvyšuje od 20. dne vývoje plodu, kdy počet zárodečných buněk dosahuje 5 000, až k počtu 1 100 000 u 50 denních plodů. Přibližně v této fázi vývoje mitotická aktivita ustává (Hunter, 2000). Převažující část zárodečných buněk během tohoto období podléhá atrezii, zatímco zbývající oogonie podstupují první meiotické dělení (Gilbert, 2000).

První meiotické dělení je zastaveno v diplotenní fázi profáze I. Mluvíme o tzv. prvním meiotickém bloku, v němž oocyty I. řádu přetrvávají po dobu několika let a k znovuoobnovení meiózy dochází až v období puberty (Liang *et al.*, 2007). Dle Huntera (2000) je meióza I u prasat zahájena již kolem 40. dne vývoje. Bielańska-Osuchowska (2006) uvádí, že první oocyty v profázi prvního meiotického dělení jsou ve vaječnicích pozorovány od 47. dne. Všechny oogonie jsou plně přeměny v oocyty I. řádu asi 35. den po narození (Hunter, 2000).

3.1.1.1 Postnatální vývoj oocytů

Dle bývalého dogma reprodukční biologie, které přetrvávalo v minulých desetiletích, se zárodečné buňky množí pouze v období prenatalního vývoje samice a savci tak ztrácejí schopnost obnovy zárodečných buněk během fetálního vývoje (Zuckerman, 1951). Dle tohoto předpokladu je při narození jedince ustanovená pevná rezerva zárodečných buněk uzavřených ve folikulech a během postnatálního života jedince dochází už jen ke snižování tohoto počtu. Nicméně, o několik desetiletí později bylo Johnsonem *et al.* (2004) toto tvrzení vyvráceno, když ve své studii prokázali, že u mladých a dospělých myší jsou přítomny mitoticky aktivní zárodečné buňky. Tyto buňky jsou schopny v ovariálních folikulech doplnit oocyty zaniklé ovulací nebo atrezií. Na základě tohoto tvrzení byly provedeny další rozsáhlé studie (Perez *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007), které prokázaly, že atrezie oocytů u postnatálních folikulů myší je natolik rychlá, že by u dospělých jedinců nemohla být zachována plodnost v případě, že by závisela pouze na počtu oocytů při narození. Za zdroj zárodečných kmenových buněk je považována kostní dřev, z níž se buňky dostávají do specifických segmentů vaječníků (rezidentní folikuly), jež jim napomáhají v přeměně v oocyty (Woodruff, 2008).

3.1.2 Folikulogeneze a fáze růstu oocytů

Folikulogeneze

Funkční jednotkou vaječníků je folikul. Ten se skládá z jedné nebo více vrstev granulóznic buněk obklopujících oocyt (Gougeon, 1996). Tento folikul vzniká procesem zvaným folikulogeneze. Jedná se o vysoce selektivní proces, který patří převážně do postnatální fáze vývoje oocytu. Jde o časově náročné změny, během kterých se určitý počet

primordiálních folikulů vyvíjí až do stadia specializovaného Graafova folikulu, tedy stádia ovulačního (Mehlmann, 2005).

Folikulogeneze probíhá v kůře vaječníků, v níž jsou přítomné folikuly v různém rozsahu velikostí. Existují celkem čtyři hlavní regulační činnosti související s tímto procesem. Jedná se o nábor primordiálních folikulů, vývoj preantrálních folikulů, selekce a vývoj Graafova folikulu a atrézie (Wassarman, 1998).

První fází folikulogeneze je nábor primordiálních folikulů, během něhož je omezený počet primordiálních folikulů rekrutován k růstu (Erickson, 2008). Primordiální folikul je složený z malého, dosud nedorostlého primárního oocytu ve stádiu profáze I, jedné vrstvy dlaždicových folikulárních (granulózniých) buněk a bazální membrány folikulu (Gougeon *et al.*, 1987). Počet primordiálních folikulů u prasete čítá při narození asi 500 000 (Black *et al.*, 1968) a klesá k počtu 420 000 v pubertě (Gosden *et al.*, 1987). Prvním histologickým, viditelným ukazatelem náboru folikulu je okamžik, kdy se některé zrnité granulózní buňky plochého dlaždicového tvaru mění ve tvar kubický (Gougeon *et al.*, 1987). Změna tvaru je následována syntézou DNA a mitózou granulózniých buněk (Erickson, 2008) a výsledkem je vznik preantrálního folikulu (Park *et al.*, 2004).

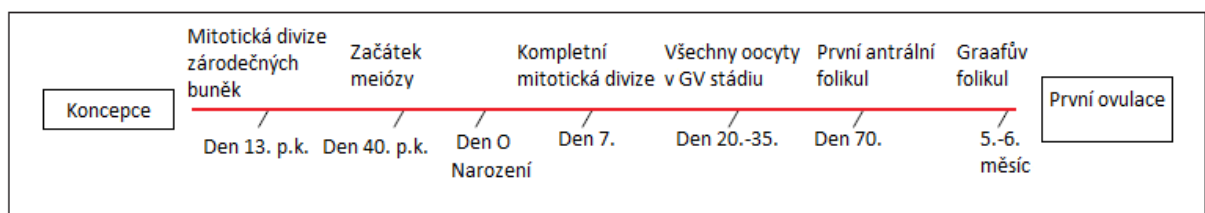
Preantrální folikul je charakteristický růstem a dalším vývojem oocytu v něm se nacházejícím (Park *et al.*, 2004). Do preantrálních folikulů řadíme primární a sekundární folikuly, lišící se od sebe počtem vrstev granulózniých buněk, rozvojem *theca folliculi* a přítomností dutin (*antra*). U primárního folikulu dochází k již zmíněnému intenzivnímu růstu, intenzivnímu mitotickému dělení buněk a přeměně granulózniých buněk na kubické (Erickson, 2008). O sekundárním folikulu hovoříme v okamžiku, kdy je oocyt obklopen dvěma a více vrstvami folikulárních buněk a zároveň vznikají intracelulární dutiny vyplněné folikulární tekutinou. Tyto dutinky posléze splývají, až vytvoří jednotnou dutinu – *antrum folliculi* (Sládeček, 1986).

Po vzniku sekundárního folikulu následuje předposlední fáze folikulogeneze, kterou je selekce a vývoj folikulu terciálního (Sládeček, 1986). V této fázi se již jedná o antrální folikul, pro který je příznačný rychlý růst (Park *et al.*, 2004). Do *antra folliculi* se vyklenuje výstupek folikulárních buněk obklopujících vlastní oocyt – vejconosný hrbolek tvořený kumulárními buňkami (*cumulus oophorus*). Dobře patrná *zona pellucida* odděluje oocyt od přilehlé, první vrstvy folikulárních buněk, které jsou cylindrické a nazývají se *corona radiata*. Během této fáze se antrum rozdělí na dvě oddělené vrstvy granulózniých buněk – murální granulózní buňky tvořící vnější vrstvy a kumulární buňky obklopující oocyt (Hirshfield, 1991). Vnitřní vrstva, *theca folliculi interna*, je tvořena polyedrickými epiteloidními buňkami.

Theca folliculi externa je tvořena koncentricky uspořádaným vazivovým stromatem, přivádějícím k folikulu cévy a nervy (Jelínek *et al.*, 1990). Oocyt v tomto folikulu dorůstá do plné velikosti (oocyt prasnice dosahuje asi 120 – 130 µm), ale zůstává v profázi I (Pincue *et Enzmann*, 1935).

Mechanismy regulující růst a vývoj folikulu jsou pod kontrolou měnících se koncentrací hormonů a růstových faktorů (Cox, 1997; Kumar *et al.*, 1997). Růstové faktory nacházející se ve folikulární tekutině potlačují meiózu oocyty a ovariální folikul tak udržuje oocyt v profázi I. Pokud je oocyt z tohoto antrálního folikulu odstraněn, samovolně obnoví meiózu a postupuje do metafáze II (Pincue *et Enzmann*, 1935). Na endokrinní úrovni je folikulogeneze řízena centrální nervovou soustavou, konkrétně předním lalokem hypofýzy a následnou kaskádou ovariálních mechanismů. Specializované neurony hypotalamu vylučují v určitých pulzech GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) a uvolňují ho do portálních cév. GnRH ovlivňuje FSH (Follicle-Stimulating Hormone) a LH (Luteinizing Hormone), které přímo ovlivňují buňky ovariálního folikulu. Na gonadotropinu závislý je folikul antrální (tedy sekundární), naopak preantrální folikul je ke gonadotropinu independentní (Park *et al.*, 2004). Přestože jsou GnRH, FSH a LH při regulaci tvorby folikulů velmi důležité, hormony a růstové faktory, které jsou samy produkty folikulu, mohou lokálně FSH a LH modulovat (zesilovat nebo zeslabovat jejich působení). Jedná se autokrinní/parakrinní systém rozvíjejících se folikulů. Předpokládá se, že tento lokální regulační systém hraje důležitou roli v komplexních mechanismech, kterými se řídí časování folikulogeneze a toho, zda se folikul stává dominantním nebo podléhá atrezii (Erickson, 2008).

Celkové časové rozpětí, které je potřeba pro vývoj primordiálního folikulu do antrálního stádia, je 84 dní a dalších 19 dní je třeba k dosažení do předovulačního stádia. První antrální folikuly byly u prasat pozorovány již 70 dní po porodu (Obr. 1) (Mauleon, 1978).

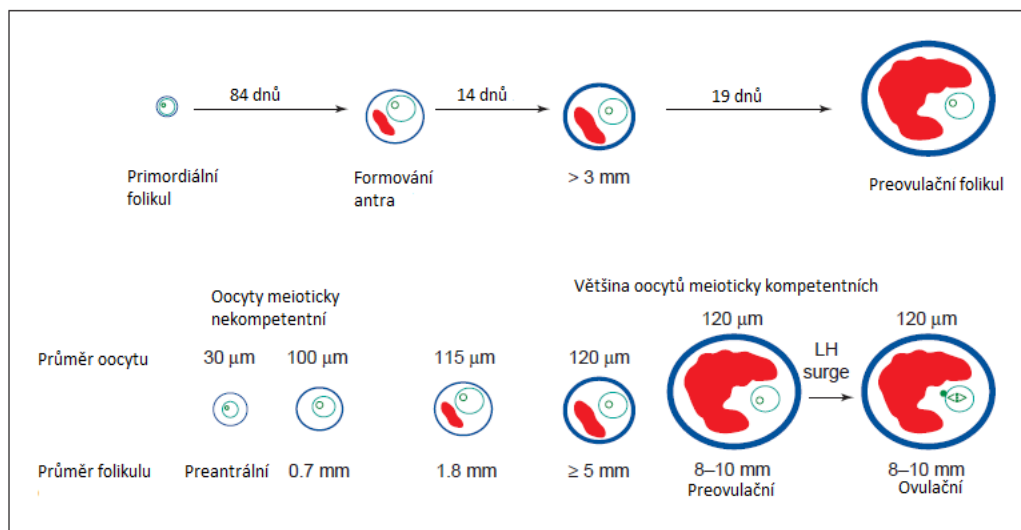


Obrázek 1: Načasování vývoje ovárií u prasat od početí do první ovulace. Meióza (40 dní po páření) a mitotická divize (7 dní po porodu) vztahující se k oocyty (upraveno dle Hunter, 2000).

Fáze růstu oocytů

Během fáze růstu oocyt prodělává četné morfologické a funkční změny, z nichž mnohé zahrnují interakce mezi samotným oocytem a folikulárními buňkami, které ho obklopují. Růst oocytů u savců probíhá ve dvou charakteristických fázích. Při první fázi oocyt roste v rámci rostoucího folikulu, zatímco během druhé rostoucí fáze zůstává velikost oocyty neměnná i přes pokračující folikulární růst (Obr. 2) (Hunter, 2000).

Během růstové fáze se oocyty prasete v průměru zvětšují ze stávajících 30 μm na 120 μm a růstová fáze je ukončena v 1,8 mm velkých folikulech (Obr. 2) (Motlik *et* Fulka, 1986).



Obrázek 2: Folikulární a oocytární růst u prasat (upraveno dle Hunter, 2000).

První meiotické dělení mohou dokončit pouze zcela dorostlé oocyty (Moor *et* Warnes, 1978), které jsou tzv. plně meioticky kompetentní (Hampl *et* John, 1995). Oocyty se nacházejí v diplotenní fázi profáze prvního meiotického zrání a zůstávají tak – v závislosti na druhu – několik měsíců nebo let. Výstup z profáze I je charakteristický pro období puberty díky vlivu pohlavních hormonů (Liang *et al.*, 2007).

Interakce mezi oocytem a kumulárními buňkami zprostředkovávají mezibuněčné spoje typu *gap junctions*, které jsou nezbytné pro růst oocyty. Interakce mezi kumulárními buňkami a oocytem přes tyto spoje umožňují zásobení oocyty aminokyselinami, fosfolipidy a nukleosidy (Hunter, 2000). Tempo růstu oocyty nadále přímo souvisí s množstvím granulóznic buněk na něj navázaných (Eppig *et al.*, 1996; Hunter, 2000). Tyto buňky zvětšují povrch oocyty, čímž se zvýší i rychlost vstupu malých molekul důležitých pro růst, vývoj a regulaci oocyty z folikulární tekutiny (Hunter, 2000). Růst oocyty a jeho diferenciaci je obvykle spojena s hypertrofií a znásobením folikulárních somatických buněk primárního preantrálního folikulu. Zvýšení velikosti oocyty přímo koresponduje se zvýšením obsahu

proteinů, neboť rostoucí oocyty akumulují prostředky nezbytné pro pozdější zrání, oplození a pre-implantační rozvoj embrya (Eppig *et al.*, 1996). Mezi bílkoviny intenzivně syntetizované během růstové fáze patří např. i glykoproteiny zony *pellucida*. Jedná se o specializovaný extracelulární matrix plnicí v oocytu řadu funkcí (Wassarman, 1988). U prasat se *zona pellucida* skládá ze 4 základních glykoproteinů ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Gupta *et al.*, 2007), které jsou syntetizovány, zpracovávány a vylučovány samotným oocytem (Wassarman, 1988).

3.1.3 Fáze zrání

Meióza neboli meiotické dělení je proces nezbytný pro sexuální rozmnožování. Vznikají při ní gamety, buňky vysoce specializované k rozmnožování, u nichž je počet chromozómů zredukován na polovinu – obsahují tedy jedinou kopii genetické informace. Tato redukce je nezbytná, protože splnutím samčí a samičí gamety při oplození dojde k obnovení diploidního počtu chromozómů v buňkách embrya (Alberts *et al.*, 2005) U většiny živočišných druhů, rovněž tak u prasnic, je vývoj oocyty během meiózy opětovně pozastavován v určitých fázích meiotického dělení. Mluvíme o prvním a druhém meiotickém bloku. První meiotický blok probíhá ještě v období před narozením, kdy je meióza oocytů spontánně přerušena v profázi prvního meiotického, také označovaného jako redukčního, dělení (PI). Tyto nezralé oocyty jsou morfologicky charakteristické výrazným jádrem nazývaným zárodečný váček (GV). Druhý meiotický blok nastává v metafázi druhého meiotického dělení. V tomto bloku oocyt přetrvává až do okamžiku oplození (Tosti, 2006).

Právě doba progrese mezi prvním a druhým meiotickým blokem je definována jako meiotické zrání oocyty (Tosti, 2006). Přejít mezi těmito fázemi je umožněn díky rozpadu zárodečného váčku. Události, které během zrání probíhají, mají zásadní a klíčovou roli pro procesy následující – tedy pro ovulaci, oplození a následný vývoj embrya (Tosti *et al.*, 2013). Toto meiotické zrání oocyty je ovlivňováno řadou vnitřních i vnějších faktorů (Motlik *et al.*, 1997) a u prasečích oocytů trvá v *in vitro* podmínkách přibližně 44 – 48 hod (Hurk *et Zhao*, 2004). Obnovení meiotického zrání je umožněno odstraněním inhibičního signálu (Tosti, 2006). Důležitým faktorem, zodpovědným za rozpad zárodečného váčku (GV), obnovení meiózy a vystoupení z prvního meiotického bloku je M-fázi podporující faktor MPF (M-Phase /M-Phase Promoting Factor) (Masui, 2001), komplex kinázové podjednotky CDK1 (také známý jako CDC2) a regulační podjednotky cyklinu B. Nízká hladina těchto podjednotek je klíčovým faktorem pro udržení meiotického bloku (Von Stetina *et Orr-Weaver*, 2011). Jak uvádí Eppig *et Downs* (1984), v řadě studií bylo prokázáno, že udržení

nízké hladiny CDK1 a cyklinu B souvisí se zvýšenou hladinou druhého posla cAMP (Cyclic Adenosine MonoPhosphate). Právě cAMP tedy patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující inaktivaci CDK1 a cyklinu B (Von Stetina *et* Orr-Weaver, 2011). V případě snížení koncentrace cAMP dojde k rozpadu zárodečného váčku a znovuoobnovení meiózy, která postupuje až do metafáze II, v níž dochází k druhému meiotickému bloku přetrvávajícímu až do splynutí pohlavní buňky se spermií (Eppig, 1996).

Zrání oocytů zahrnuje koordinované jaderné a cytoplazmatické modifikace. Jedná se o velice složité procesy a jejich souhra je regulována kaskádou chemických reakcí. Jaderné zrání je charakteristické rozpadem zárodečného váčku a přítomností dvou pólových tělísek a je zakončeno přestupem do dalších fází meiózy. Cytoplazmatické zrání je oproti jadernému zrání méně prozkoumaný proces, který zahrnuje morfologické a funkční změny týkající se a) přemístění organel; b) transkripční modifikace mRNA; c) modifikace propustnosti plazmatické membrány; d) změny v profilu exprese regulačních proteinů buněčného cyklu (Tosti, 2006). Cytoplazmatické zrání je proces, během kterého se oocyt připravuje k aktivaci a preimplantačnímu vývoji (Eppig, 1996). Je rovněž důležitý pro podporu kapacity k oplození a brzkému embryonálnímu vývoji (Motlik *et al.*, 1997).

3.1.3.1 Regulační mechanismy zrání oocytů

Jak připomínají Hampl *et* John (1995), meiotické zrání u savčích oocytů nastává na přechodu mezi profází I a metafází II. Zpočátku je tato progresse udržována vnitřními faktory oocytu. Jedná se o nedostatek faktorů potřebných k pokračování do M-fáze a působení inhibičních faktorů. Podmínkou pokračující meiózy je plně dorostlý oocyt – ten je již plně kompetentní k tomu, aby započal a dokončil první meiotické zrání, tedy vydělil první pólové tělísko a vstoupil do metafáze II (Wassarman, 1998).

Vzhledem k tomu, že zralý, oplození schopný oocyt má v reprodukčním traktu samice poměrně krátkou životnost, načasování meiotického bloku, stejně jako celý průběh zrání oocytu musí být přísně řízen a usměrňován (Mehlman, 2005). K tomu slouží mnohé regulační mechanismy.

cAMP (cyklický adenosin 3'5'monofosfát)

cAMP (Cyclic Adenosine MonoPhosphate) je derivátem molekuly ATP a v buňkách plní úlohu tzv. druhého posla (Star *et al.*, 1988) a to u prokaryotických i eukaryotických buněk (Lennarz *et al.*, 2004). Přeměnu ATP na cAMP katalyzuje enzym adenylát-cykláza, který se nachází na vnitřní straně plazmatické membrány a je ukotven ve vnitřním prostoru

buňky (Rashman *et al.*, 2013). Štěpení cAMP naopak zajišťuje enzym fosfodiesteráza, jež cAMP rozštěpí na jednoduchý AMP (Adenosine MonoPhosphate) (Campbell *et* Reece, 2008).

Jak již bylo zmíněno, cAMP udržuje oocyt v meiotickém bloku a opětovné zahájení meiózy následuje až po poklesu intra-oocytární koncentrace tohoto cyklického nukleotidu (Dekel, 2005). Vysoká hladina cAMP zabraňuje meiotickému zrání prostřednictvím ovlivnění aktivity CDK/cyklin B proteinového komplexu, taktéž známého jako M-fázi podporující faktor MPF. Zvýšená hladina cAMP v oocytu má za následek fosforylaci kinázové podjednotky MPF (Von Stetina *et* Orr-Weaver, 2011) CDK1, čímž činí celý komplex MPF neaktivní. Naopak snížení hladiny cAMP na počátku fáze zrání oocytu vede k defosforylaci podjednotky CDK1 a MPF komplex se stává aktivním, díky čemuž oocyt může znovu vstoupit do meiózy. Jednotlivé kroky, prostřednictvím nichž cAMP aktivuje či deaktivuje MPF, jsou stále předmětem studia. Hlavními regulátory jsou protein kináza A (PKA), která prostřednictvím zatím blíže nespecifikovaných kroků reguluje činnost fosfatázy CDC25 a kinázy WEE1. CDC25 defosforyluje podjednotku MPF CDK1, zatímco WEE1 tuto podjednotku fosforyluje (Mehlman, 2005). Význam této fosfatázy zdůrazňuje ve své práci Lincoln *et al.* (2002). Uvádí, že oocyty myši, které postrádaly zmíněný gen CDC25, nebyly schopny aktivovat komplex MPF a postoupit tak do další fáze meiózy.

cAMP, tvořený buňkami ovariálních folikulů, je přenášen k oocytům prostřednictvím spojů *gap junctions*. Zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (LH) vede k přerušení těchto spojů mezi oocyttem a kumulárními buňkami, čímž se v oocytu sníží koncentrace cAMP a výsledkem je výstup z meiotického bloku (Dekel, 2005)

MPF (M fázi podporující faktor)

První meiotický blok je ovlivňován výše zmíněným M-fázi podporujícím faktorem MPF (M-Phase/Maturation-Promoting Factor). Jedná se o heterodimer složený z kinázové a regulační podjednotky. Kinázovou, neboli katalytickou podjednotkou je cyklin dependentní kináza CDK1, známá taktéž pod označením p34^{cdc2}; podjednotkou regulační je cyklin B (Hampl *et* John, 1995).

Aktivaci komplexu CDK1/cyklin B způsobuje fosfatáza CDC25C prostřednictvím defosforylace tyrosinu 15. Tento komplex následně migruje do jádra, kde slouží jako impuls pro výstup z meiotického bloku (Ford *et* Parde, 1999). Naopak činnost této fosfatázy je regulována prostřednictvím protein kinázy A (PKA), čímž je znemožněna aktivace komplexu MPF a oocyt přetrvává v meiotickém bloku (Mehlman, 2005).

Vystoupení z prvního meiotického bloku, rozpad GV a přestup do další fáze meiózy je umožněn díky vysoké koncentraci MPF. Naopak nízká hladina CDK/cyklin B proteinového komplexu zapříčiňuje přetrvávání meiotického bloku u nekompetentních oocytů (Hampl *et al.*, 1995). Je důležité, aby k aktivaci CDK1/cyklin B nedošlo předčasně. Tím by byl zahájen vstup do další fáze meiotického zrání ještě před dokončením jiných nezbytných událostí buněčného cyklu. Proto je fosforylace tyrosinu 15 přísně kontrolována (Hoffmann, 1993).

Množství a aktivita komplexu mitotického cyklinu B a CDK1 hraje důležitou roli pro správný průběh buněčného cyklu (Ito, 2000). MPF je fyziologický faktor odpovědný za vyvolání vstupu do M-fáze (Hunt, 1989).

MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy)

Mitogenem aktivované protein kinázy MAPK (Mitogen Aktivované Protein Kinase), patří do rodiny serin/treoninových kináz (Fan *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2007), jsou enzymy, které přenášejí signál z buněčné membrány do jádra buňky v odezvě na řadu extracelulárních podnětů. Některé z kináz jsou proto také známé pod označením ERK (Extracelulární signál-Regulované Kinase) – kináza regulovaná extracelulárním signálem (Inoue *et al.*, 1998). Platí, že jeden nebo více z MAPK kaskád využívají ve svém širokém repertoáru signálních transdukčních mechanismů téměř všechny receptory buněčného povrchu (Robinson *et al.*, 1997).

Savčí buňky obsahují tři hlavní skupiny MAP kináz: a) ERK (Extracelulární signál-Regulované Kinase); b) JNK (c-Jun N-terminální Kináza, také známá jako SAPK – Stresem Aktivovaná Proteinkináza) a c) p38/HOG1 MAP kináza (Kyriakis *et al.*, 2001).

Aktivace MAPK probíhá kaskádovitě a zahrnuje procesy fosforylace proteinů (Liang *et al.*, 2007). Každá MAPK je aktivována fosforylací treoninových a serinových zbytků MAPK kinázami ze skupiny MAPKK (MAP kináza kinázy, také MKK či MEK1). MAPKK jsou opět aktivovány fosforylací na dvou serinových zbytcích - MAPKKK (MAP kinázou kinázy kinázy, také MKKK či MAP3K) (Gotoh *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2004). Je navíc dokázáno, že jedna ze tříd MAP kináz, výše zmiňovaný ERK, může být taktéž aktivována nebo inhibována prostřednictvím cAMP (Katz *et al.*, 2000). cAMP může inhibovat ERK mnoha různými způsoby, z nichž většina zahrnuje cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA) a inhibici signálních kaskád transkripčních faktorů Ras a Raf-1 (Stork *et al.*, 2002). Proliferaci buněk naopak stimuluje prostřednictvím aktivace ERK (Katz *et al.*, 2000), při níž

dojde ke zvýšení kinázové aktivity ERK1 a ERK2 v cytoplazmě i v jádře (Cameron *et al.*, 1996).

Aktivované MAP kinázy fosforylují pestrou škálu membránových, cytoplazmatických, jaderných a cytoskeletálních substrátů, translokují se do jádra a zde fosforylují a aktivují jaderné transkripční faktory spojené se syntézou DNA a buněčným dělením. Slouží tedy jako regulátory širokého spektra dějů probíhajících v buňce – přímo ovlivňují expresi genů ale i programovanou buněčnou smrt, apoptózu (Fořtová *et al.*, 2009).

Na regulaci meiózy u savčích oocytů mají vliv především 2 známé izoformy MAPK – ERK1 a ERK2. Právě ERK cesta je důležitá pro kontrolu přechodu G0-G1 fáze buněčného cyklu, správný průběh buněčné mitózy nebo meiózy, a tedy pro buněčnou proliferaci a diferenciaci (Meloche *et Pouysségur*, 2007).

Aktivita MAPK je během meiotického zrání a druhého meiotického bloku udržována na vysoké úrovni. Ke snížení dochází až v okamžiku vystoupení z druhého meiotického bloku, díky průniku spermie do vajíčka – fertilizaci (Ito *et Kashiwazaki*, 2012).

Aktivace MAPK během meiotického zrání oocytu je druhově specifická (Hurk *et Zhao*, 2005). Zatímco u myších oocytů je MAP kináza aktivovaná asi 3 hodiny po fázi GVBD (Verlhac *et al.*, 1994), u oocytů prasečích se objevují první fosforylované formy ERK1 a ERK2 už po 16 – 20 hodinách kultivace a plně fosforylované jsou po 24 hodinách (Chesnel *et al.*, 1995). U prasat, stejně jako u skotu, je tedy MAP kináza aktivovaná ve stejném okamžiku, kdy probíhá proces GVBD, případně těsně po něm (Motlik *et al.*, 1997). To dle Lazara *et al.* (2002) naznačuje, že činnost MAPK u savčích oocytů neovlivňuje časné meiotické události a není tedy nutná pro aktivaci MPF a GVBD. Oproti tomu při studiu oocytů žab druhu *Xenopus laevis* bylo zjištěno, že aktivace MAPK předchází procesu GVBD a je tedy v tomto případě nutná pro opětovné zahájení meiózy a pro udržení druhého meiotického bloku (Dekel, 2005). Dle Lianga *et al.* (2007) lze tedy předpokládat, že u nižších obratlovců hraje MAPK za fyziologických podmínek v procesu zrání oocytů dominantní roli. Zároveň však dodává, že i přes obecně rozšířený fakt, že MAPK v oocytech savců není nezbytná pro aktivaci MPF a GVBD, umělá aktivace MAPK může znovuzahájit meiózu. Je zřejmé, že počáteční malé množství aktivní MAPK sehrává při GVBD důležitou roli.

MAPK je mimo jiné důležitá pro činnost MPF (Hurk *et Zhao*, 2005). Jak uvádí Cameron *et al.* (1996), u prasečích oocytů bylo dokázáno, že vlivem působení fyziologických koncentrací LH se zvyšuje enzymatická aktivita ERK1 i ERK2 v jádře. LH totiž působí na uzavření spojů typu *gap junctions*, díky čemuž se cAMP, jež je tvořený ve folikulech,

nedostane k oocytům (Dekel, 2005). Snížení hladiny cAMP vede v oocytu k defosforylaci podjednotky MPF a celý komplex MPF se tímto stává aktivním (Mehlman, 2005).

3.2 Gasotransmitery

Pro vývoj zralých a oplození schopných oocytů je nezbytný správný průběh všech fází oogeneze včetně zrání oocytů (Wassarman, 1998). Bylo zjištěno, že na regulaci vývoje oocytu se mimo jiné podílí i skupina endogenních plyných molekul, tzv. gasotransmiterů (Wang, 2002; Wu *et* Wang, 2005). Jedná se o malé molekuly plynů volně dostupné přes plazmatickou membránu. Jejich efekt proto není závislý na žádných membránových receptorech. Jsou produkovány endogenně a enzymaticky a jejich syntéza je regulována prostřednictvím celé řady enzymů, jež gasotransmitery uvolňují z aminokyselin. Tyto enzymy se vyskytují v řadě izoform a jsou uvolňovány na základě potřeb buňky. Specifické funkce gasotransmiterů jsou plně závislé na jejich fyziologicky účinných koncentracích (Wang, 2002).

První objevenou molekulou plynu, jež v organismu plní významnou biologickou roli, byl oxid dusnatý (NO). Bylo prokázáno, že EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor), který má za následek relaxaci hladkého svalstva a cévních stěn, je ve skutečnosti právě NO (Wang, 2002). Další studie navíc potvrdily významnou úlohu NO v procesu vývoje a zrání oocytů (Nakamura *et al.*, 2002; Chmelíková *et al.*, 2010). Zapojení gasotransmiterů v procesech reprodukce bylo později potvrzeno také u oxidu uhelnatého (CO) a sulfanu (H₂S) (Lowicka *et* Beltowaki, 2007).

3.2.1 Sulfan – H₂S

Po řadu let byl H₂S považován jen za toxický plyn (Yant, 1930; Mustafa *et al.*, 2009a; Lindenmann, 2010), jež při vysokých koncentracích způsobuje poškození dýchací a centrální nervové soustavy a následnou smrt (Yant, 1930). Až v roce 1996 byla prokázána jeho role ve fyziologické funkci mozku (Abe *et* Kimura, 1996) a následně se ukázalo, že H₂S má vliv na řadu biologických dějů a indukuje řadu fyziologických procesů dosud plně neobjasněnými mechanismy (Kimura, 2010).

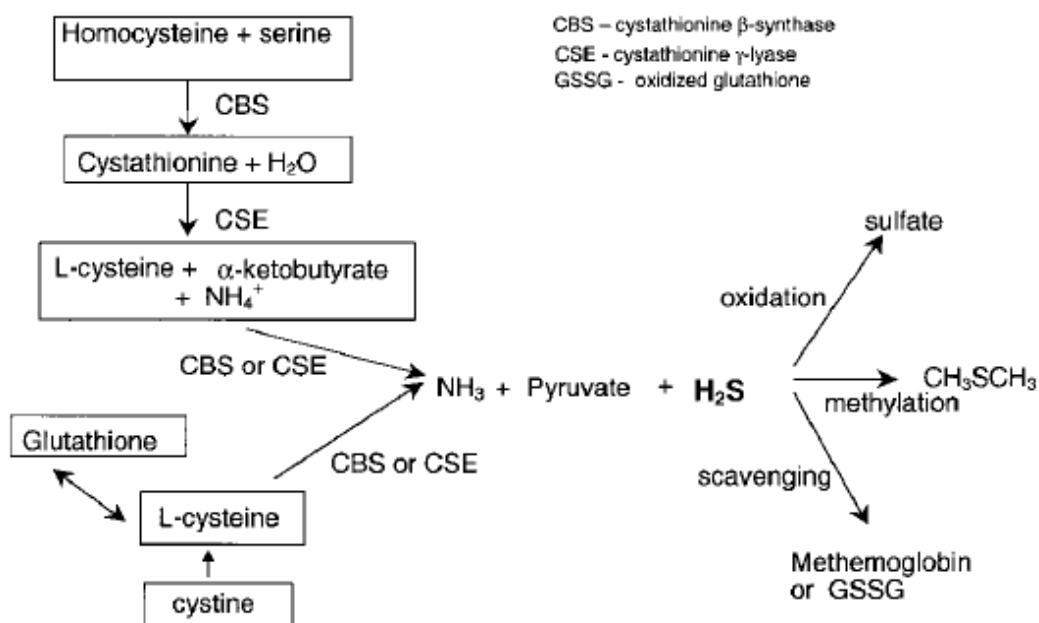
3.2.1.1 Vlastnosti, biosyntéza a katabolismus

H₂S je bezbarvý, hořlavý, silně zapáchající plyn (Yant, 1930), dobře rozpustný ve vodě. Asi jedna třetina ho zůstává ve vodě nedisociovaná, zbytek je disociován na HS⁻, S²⁻ a proton. V lipofilním prostředí je H₂S rozpustný přibližně 5x více než v prostředí vodném, a

právě tato vlastnost mu umožňuje přestupovat přes buněčné membrány a účastnit se tak důležitých fyziologických pochodů (Stárka, 2004).

V savčích tkáních je H₂S vyráběn v nízkých koncentracích (50 – 160 μM) (Furne *et al.*, 2001) třemi enzymy (Obr. 3). Ve většině tkání je tvořen především z L-cysteinu (Lowicka *et Beltowaki*, 2007; Šmelcová *et Tichovská*, 2011; Nevoral *et al.*, 2014) působením enzymů cystathionin β-syntázy CBS (Cystathionine β-Synthase), která se vyskytuje především v ledvinách, játrech a prostatě (Abe *et Kimura*, 1996) a cystathionin γ-lyázy CSE (Cystathionine γ-Lyase), jež je přítomná v ledvinách, játrech, tenkém střevě a žaludku (Ishii *et al.*, 2004). Oba působí pouze za přítomnosti pyridoxal 5'-fosfátu (vitamin B₆) jako kofaktoru (Lowicka *et Beltowaki*, 2007). Třetí a poslední objevený enzym působící na expresi H₂S v mozku je 3-merkaptopyruvát sulfur-transferáza 3MPST (3-Mercaptopyruvate SulfurTransferase) (Šmelcová *et Tichovská*, 2011).

H₂S je většinou metabolizován na sulfát a thiosulfát oxidačním metabolismem v mitochondriích (Obr. 3). Velmi malá část H₂S je methylována v cytosolu konvertována na méně toxické látky jako je methylmerkaptan a dimethylsulfát. Tyto metabolity jsou vylučovány prostřednictvím gastrointestinálního ústrojí, ledvinami a plicemi a to během 24h, tudíž endogenně produkovaný H₂S se za fyziologických podmínek neakumuluje v organismu v míře toxického ohrožení buněk. Další cesta eliminace sulfanu je jeho vazba na hemoglobin, podobně jako je tomu u CO nebo NO (Obr. 3) (Stárka, 2004).



Obrázek 3: Endogenní enzymatická produkce H₂S a jeho metabolismus (upraveno dle Wang, 2004).

3.2.1.2 Biologické účinky sulfanu na savčí organismus

H₂S je důležitou signální biologickou molekulou endogenního původu (Stárka, 2009). Je zapojen do regulace vaskulárního tonu, kontraktility myokardu, neurotransmise a sekrece inzulínu. Při jeho nedostatku byla u různých zvířecích modelů pozorována arteriální a plicní hypertenze, Alzheimerova choroba, jaterní cirhóza a poškození žaludeční sliznice. Exogenně podávaný H₂S zmírňuje myokardiální dysfunkci a poškození sliznice žaludku vyvolané protizánětlivou léčbou (Lowicka *et Beltowaki*, 2007), vede ke zmírnění plicní hypertenze, snížení adherence leukocytů v krevních cévách a ke snížení restenózy krevních cév (Mustafa *et al.*, 2009b).

Endogenní H₂S patří mezi molekuly, které se účastní procesu předávání informací mezi nervovými buňkami, čímž je zapojen do procesu formování paměti a učení (Abe *et Kimura*, 1996). Jeho vysoké koncentrace se nacházejí v mozku potkana, skotu i člověka (Eto *et al.*, 2002). Je dokázáno, že H₂S reguluje membránové iontové kanály v mozkové tkáni i aktivitu mnoha enzymů, které mají vliv na mozkovou činnost (Abe *et Kimura*, 1996), zvyšuje intracelulární kalciové ionty a indukuje kalciovou vlnu v sousedních astrocytech, čímž zprostředkovává přenos signálu mezi neurony a gliemi (Nagai *et al.*, 2004). Kromě funkce přenašeče signálu plní H₂S i funkci ochrannou. Působí jako antioxidant a snižuje vliv oxidačního stresu na nervové buňky (Kimura *et Kimura*, 2004; Lowicka *et Beltowaki*, 2007).

Nezastupitelnou roli hraje H₂S i v kardiovaskulárním systému (Wang, 2004; Šmelcová *et Tichovská*, 2011). Zhao *et al.* (2001) potvrdili vazorelaxační účinek H₂S na hladkosvalové buňky, prostřednictvím kterého reguluje kontraktilitu cév a působí tak ke snižování krevního tlaku. Vazorelaxační účinek je zprostředkován stimulací ATP-dependentních K⁺ kanálů, tzv. K_{ATP} (ATP-sensitive potassium channels) v buňkách hladkého svalstva (Wang, 2004; Lowicka *et Beltowaki*, 2007) a následnou membránovou hyperpolarizací, čímž zabraňuje vstupu kalciových iontů a relaxuje tak vaskulární tkáň (Yang *et al.*, 2004). H₂S mění aktivitu těchto kanálů přímo, tedy bez zapojení druhých posílů (Wang, 2004).

Ukazuje se taktéž, že H₂S může sehrávat určitou roli při zánětlivých procesech (Mustafa *et al.*, 2009b). Je známo, že proliferace T-lymfocytů je inhibována sirnými termálními vodami přidanými do kultivačního média (Valitutti *et al.*, 1990). Jako odpověď na poškození tkáně totiž H₂S uvolňuje nesteroidní protizánětlivé látky NSAIDs (Sulfide-releasing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs) (Mustafa *et al.*, 2009b). První událostí, která nastává při zánětlivém procesu, je adherence leukocytů k endotelu cév. Je dokázáno, že podáním inhibitoru CSE b-CNA se tato endoteliální přilnavost výrazně zvyšuje (Zanardo *et al.*, 2006) a naopak při exogenním podání H₂S dochází ke snížení této adherence, snížení otoku a viscerální bolestivosti (Distrutti *et al.*, 2006). V poslední době je proto věnována pozornost H₂S také v souvislosti s hemoragickým šokem (Mok *et al.*, 2004).

O H₂S je tedy prokázáno, že hraje důležitou roli za fyziologických i patofyziologických podmínek v centrální nervové soustavě, v kardiovaskulárním systému, hladkém svalstvu a stejně tak v samčí i samičí reprodukční soustavě a reprodukci samotné (Stárka, 2004).

3.2.1.3 Účinky sulfanu na reprodukční funkce

V samčím i samičím reprodukčním systému byly detekovány enzymy regulující endogenní výrobu H₂S, na základě čehož bylo zjištěno, že H₂S ovlivňuje i celou řadu reprodukčních funkcí (Šmelcová *et Tichovská*, 2011).

Vliv na samčí reprodukční soustavu

Účinky H₂S na samčí reprodukční systém byly sledovány především ve spojitosti s erekcí pyje (Šmelcová *et Tichovská*, 2011). V kavernózních těliscích penisu králíků byla prokázána endogenní tvorba H₂S, na základě čehož je předpokládán jeho farmakologický pro-erektilní účinek (Srilatha *et al.*, 2007). Jak bylo uvedeno výše, H₂S se zároveň podílí na relaxaci hladkého svalstva v krevních cévách, což je jedna ze základních a nezbytných

podmínek erekce. Zároveň lze předpokládat, že H₂S se podílí na regulaci funkce varlat, kde byla u potkanů prokázána přítomnost H₂S produkujících enzymů. Enzym CBS je přítomen hlavně v Leydigových, Sertoliho a zárodečných buňkách, zatímco enzym CSE byl detekován pouze v buňkách Sertoliho a nezralých zárodečných buňkách (Sugiura *et al.*, 2005).

Vliv na samičí reprodukční soustavu

Bylo zjištěno, že enzymy CBS a CSE hrají důležitou roli i v reprodukci samic. Tyto enzymy byly detekovány v děloze, plodových obalech i placentě (Patel *et al.*, 2009). Liang *et al.* (2006) prokázali přítomnost enzymu CBS ve folikulárních buňkách myši, nikoliv ale v jejích oocytech.

Důležitost enzymu CBS pro reprodukční funkce samice dokázali Liang *et al.* (2006) ve svém experimentu na myších s vyblokováním genem pro CBS. Tyto myši měly prokazatelně nižší počty rozvíjejících se folikulů, kratší a nepravidelné estrální cykly.

Nezbytnost H₂S v reprodukci samic spočívá i v jeho úloze při porodu. H₂S je zapojen do regulace kontraktility děložního svalu. Nízké dávky H₂S snižují děložní stahy, čímž dochází k oddálení porodu a jeho prodloužení. Ionty H₂S brání vázání oxytocinu na jeho receptory (Sidhu *et al.*, 2001). H₂S navíc uvolňuje hladké svalstvo reprodukčního systému prostřednictvím ovlivnění signálních drah NO a zvýšením propustnosti K_{ATP} kanálů (Srilatha *et al.*, 2009).

Přestože nebyla prokázána přítomnost enzymu CBS přímo v oocytu, výsledkem potlačení jeho sekrece v kumulárních buňkách bylo potlačení meiotického zrání oocyty a zpomalení zrání v podmínkách *in vitro*. Přítomnost zbývajících dvou enzymů, CSE a 3MPST, byla v prasečích oocytech prokázána (Liang *et al.*, 2006). Ukazuje se tedy, že H₂S je důležitým buněčným poslem během meiotického zrání savčích oocytů a dostatečné kumulární expanze (Nevoral *et al.*, 2015).

3.2.1.4 Úloha sulfanu v regulaci meiotického zrání oocytů

V současné době je znám pozitivní vliv exogenně dodávaného H₂S na oocyty (Nevoral *et al.*, 2014). Vliv exogenně dodávaného H₂S může být demonstrován mimo jiné i na procesu prodloužené kultivace *in vitro* dozrálých oocytů, kdy dochází k tzv. stárnutí. Bylo prokázáno, že k významnému poklesu endogenního H₂S dochází během prvních 24 hodin prodloužené kultivace oocytů a to o celých 29 % oproti oocytům v metafázi II. Prostřednictvím inhibice enzymů produkujících H₂S byly urychleny známky stárnutí a výrazně se zvýšil poměr fragmentovaných oocytů, které podlely programované buněčné smrti. Dodáním exogenního

H₂S byly naopak potlačeny projevy stárnutí, byly zároveň vyvráceny účinky inhibitorů H₂S a došlo ke kompletnímu potlačení fragmentace oocytů (Krejčová *et al.*, 2015). Lze tedy tvrdit, že exogenně dodávaný H₂S má protektivní účinek na oocyty kultivované v podmínkách *in vitro*, ve smyslu potlačení nežádoucích procesů vedoucích k buněčné smrti (Zhao *et al.*, 2014).

Jak bylo uvedeno, Liangem *et al.* (2006) byl podrobně studován vliv jednoho ze tří známých enzymů produkujících H₂S – enzymu CBS – na meiotické zrání oocytů. Ačkoli nebyla prokázána přítomnost CBS přímo v samotném oocytu, enzym je všudypřítomně uvolňován v ovariálních buňkách s nejvyšší produkcí v buňkách folikulárních. V pozdních antrálních folikulech se produkce CBS výrazně navyšuje v granulózních buňkách nacházejících se v blízkosti antra a v samotných buňkách obklopujících oocyt. PCR (Polymerase Chain Reaction) metodou bylo navíc prokázáno, že CBS mRNA se nachází ve folikulech ve všech fázích *in vitro* zrání. Důsledkem potlačení sekrece CBS v buňkách obklopujících oocyt a tudíž následné absence H₂S bylo zpomalení meiotického zrání oocytu v *in vitro* podmínkách. Úloha CBS v oocytech pravděpodobně spočívá ve skutečnosti, že substrátem tohoto enzymu je aminokyselina homocystein (Liang *et al.*, 2006). Jak uvádí Liang *et al.* (2007), ze studií zabývajících se *in vitro* zráním vyplývá jasný vztah mezi koncentrací homocysteinu ve folikulární tekutině a průběhem zrání oocytu. Homocystein, vznikající z aminokyseliny methioninu, je ve vyšších dávkách toxický a enzym CBS svou funkcí koncentraci homocysteinu ve folikulární tekutině potlačuje (Liang *et al.*, 2007), čímž zajišťuje příznivé prostředí pro samotný průběh zrání.

První studie zabývající se vlivem exogenně podávaného H₂S na meiotické zrání oocytů byla studie Nevorala *et al.* (2014). Bylo zjištěno, že exogenní dárce H₂S, sulfid sodný (Na₂S), urychluje zrání oocytu *in vitro* v závislosti na dodávaném množství. Současně tento donor pozitivně ovlivňuje kumulární expanzi působením na produkci kyseliny hyaluronové, která je nezbytná pro správný vývoj oplození schopných oocytů. Koncentrace dodávaného donoru H₂S v tomto experimentu byly srovnatelné s jeho fyziologickými hodnotami ve tkáních, z čehož vyplývá, že účinky Na₂S nebyly výsledkem toxicity H₂S, nýbrž jeho fyziologické funkce jako gasotransmiteru. Z výsledků dřívějších studií vyplývá, že k urychlení meiotického zrání oocytů dochází brzkým zvýšením aktivity MPF a MAPK. Je navíc známo, že H₂S má prostřednictvím procesu S-sulfhydratace vliv na aktivitu celé řady faktorů a to včetně kináz (Nevoral *et al.*, 2014). Jedná se o post-translační mechanismus, během něhož dochází k dodatečnému přiřazení síry k thiolové skupině a při němž je skupina

–SH nahrazena skupinou –SSH (Gadalla *et Snyder*, 2010; Zhao *et al.*, 2014). Tento proces řídí a ovlivňuje řadu metabolických procesů v buňce (Mustafa *et al.*, 2009a). V nedávné studii provedené Zhao *et al.* (2014) bylo prokázáno, že H₂S má schopnost sulfhydratovat mimo jiné i MEK1, jež je součástí kaskády vedoucí k aktivaci MAPK a MPF, důležitých kináz a regulačních mechanismů meiotického zrání. MEK1 je sulfhydratován na cystein 341, který vede k aktivaci PARP-1 (Poly ADP-Ribosa), enzymu, jež je zodpovědný za reparaci poškozené DNA. Sulfhydratace MEK1 umožňuje translokaci fosforylovaného ERK1 a 2 – podtříd MAPK nezbytných pro správný průběh buněčné meiózy – do jádra, kde přímou interakcí aktivují PARP-1. Naopak mutace MEK1 znemožňuje fosforylaci ERK1 a 2 (Zhao *et al.*, 2014), čímž je narušena buněčná mitóza a meióza, ale i buněčná proliferace a diferenciacce (Meloche *et Pouysségur*, 2007). Lze tedy předpokládat, že právě procesem S-sulfhydratace MEK1 H₂S významně zasahuje do aktivace MAPK a MPF a tím výrazně ovlivňuje meiotické zrání oocytů.

4 Materiály a metodika

4.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů

Prasečí vaječníky byly získány od šesti až osmi měsíčních necyklujících prasniček, kříženců plemen Landrace a Large White z místních jatek (Jatky Plzeň a.s., Plzeň, Česká Republika). Vaječníky byly udržovány při fyziologických 39 °C až do příjezdu do laboratoře. Z ovariálních folikulů s průměrem 2 - 5 mm byly následně aspirací získány kumulo-oocytární komplexy (COCs) za použití aspirační stříkačky a jehly 20G. Pro experiment byly použity pouze plně dorostlé oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

4.2 Kultivace oocytů

Zrání vybraných COCs probíhalo v modifikovaném médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA), které bylo obohaceno o bikarbonát sodný (32,5 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (6,3 mM), eCG (13,5 IU; Equine Chorionic Gonadotrophin): hCG/ml (6,6 IU; Human Chorionic Gonadotrophin) (P.G.600; Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) a 5 % (v/v) fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich, USA).

Tabulka 1: Složení modifikovaného kultivačního média M199.

Roztok NaHCO₃	32,5 mM
Laktát vápenatý	2,75 mM
Gentamicin	0,025 mg/ml
HEPES	6,3 mM
eCG:hCG	13,5 IU:6,6 IU
Fetální hovězí sérum	5 %

COCs následně zrály 16 - 48 hod. ve 4 důlkových Petriho miskách (Nunc, Fisher Scientific, USA), které obsahovaly 1,0 ml kulturního média, při 39 °C ve směsi vzduchu s 5 % CO₂. Na konci kultivace byly COCs ošetřeny 0.1 % bovinní testikulární hyaluronidázou (Sigma-Adrich, USA). Oocyty, takto zbavené kumulárních buněk, byly následně použity pro další analýzy.

4.3 Ošetření oocytů během kultivace

Kultivační médium bylo, za účelem inhibice endogenní produkce sulfanu ve zrajících oocytech, obohaceno o trojkombinaci specifických inhibitorů CBS, CSE a 3-MPST (3Ki): 2 mM oxamovou kyselinu (inhibitor CBS), 2 mM DL-propargylglycin (inhibitor CSE) a 5 mM α -ketoglutarovou kyselinu (inhibitor 3-MPST). Simultánně byly COCs kultivovány 48 hod. v přítomnosti 0,3 mM $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, exogenního donoru sulfanu.

4.4 Imunocytochemie

GV a MII oocyty po ukončení 48h *in vitro* kultivace, zbavené kumulárních buněk, byly fixovány v 2 % formaldehydu po dobu 40 min. Oocyty byly následně permeabilizovány v roztoku 0,1 % Tritonu-X v 1 % NGS (normální kozí sérum, normal goat serum) po dobu 40 min., následně blokovány v 5 % NGS po dobu 25 min. Oocyty byly přes noc inkubovány s králičí polyklonální anti-CBS (ab96252; Abcam, UK), králičí polyklonální anti-CTH (sc-135203, 1:200; Santa-Cruz Biotechnology, USA) a králičí polyklonální anti-3-MPST (ab85377, 1:200; Abcam, UK) při 4 °C. Následující den byly oocyty dvakrát za sebou promyty a inkubovány s kozí sekundární anti-myší/králičí protilátkou IgG (GAM/GAR) konjugovanou s fluorescein-isothiokianátem nebo tetramethylrhodaminem (FITC/TRITC; 1:200; Invitrogen, Fiseher Scientific, USA). Následně byly oocyty opět dvakrát omyty a montovány do Vectashieldu s 4'6'-diamidino-2-fenylindolem (DAPI; VectorLaboratories, USA).

4.5 Analýza obrazu

Snímky byly získány s použitím mikroskopu Ti-U (Nikon, Japonsko) s kamerou Clara Interline CCD (Andor Technology PLC, Severní Irsko) a programu NIS Elements Ar (Nikon, Japonsko). Negativní kontrola byla provedena vynecháním specifické protilátky a tyto snímky byly zpracovány při srovnatelném nastavení optické dráhy. Analýza obrazu a následná 2D dekonvoluce byla provedena prostřednictvím softwaru NIS Elements a intenzita signálu CBS, CTH a 3-MPST byla snížena o bazální intenzitu signálu příslušné negativní kontroly.

4.6 Histone H1 a Myelin Basic Protein double assay

COCs zrály po dobu 24 hod. v čistém kultivačním médiu nebo byly ošetřeny kombinací inhibitorů 3Ki či Na_2S , donorem exogenního H_2S . Assay byla provedena podle Kubelky *et al.* (2000) s drobnými modifikacemi. Oocyty byly čtyřikrát po sobě promyty v

PBS-PVA a přeneseny do 5 μ l pufru s obsahem 40 mM propansulfonové kyseliny s pH 7,2, 20 mM paranitrofenylového fosfátu, 40 mM b-glycerofosfátu, 10 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 2 mM dothiothreitolu, 0,2 mM Na₃VO₄, 2 mM benzamidinu, 40 mg/ml leupeptinu a 40 mg/ml aprotininu. Vzorky byly okamžitě zmrazeny a skladovány při -80 °C. Následně byly provedeny testy na aktivitu MPF a MAPK prostřednictvím jejich schopnosti fosforylovat vnější substráty, histon H1 (H1) a Myelin Basic Protein (MBP) v daném pořadí. Reakce kinázy byla iniciována přidáním 5 μ l pufru obsahujícím 100 mM 3- [N-morfolino] kyseliny propansulfonové s pH 7,2, 20 mM para-nitrofenylového fosfátu, 40 mM b-glycerofosfátu, 20 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 5 mM inhibitor cAMP-dependentní protein kinázy, 2 mM benzamidinu, 40 mg/ml leupeptinu, 40 mg/ml aprotininu, 600 mM ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/ml) a 500 mikroCi/ml ATP (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK). Reakce byla prováděna po dobu 30 min. při teplotě 30 °C a ukončena přidávkem 10 ml Laemmli vzorkového pufru s vařením vzorku po dobu 3 min. Po elektroforéze na 15 % SDS PAGE gelech byl barven modří Coomassie Blue R250. Fosforylované histony H1 a MBP signály byly zviditelněné softwarem MultiGauge 2.0 (FUJI FILM, Japonsko) a vztaženy k metafázi I u kontrolní skupiny oocytů po 24 hod. kultivace, kdy se předpokládá vrchol kinázové aktivity.

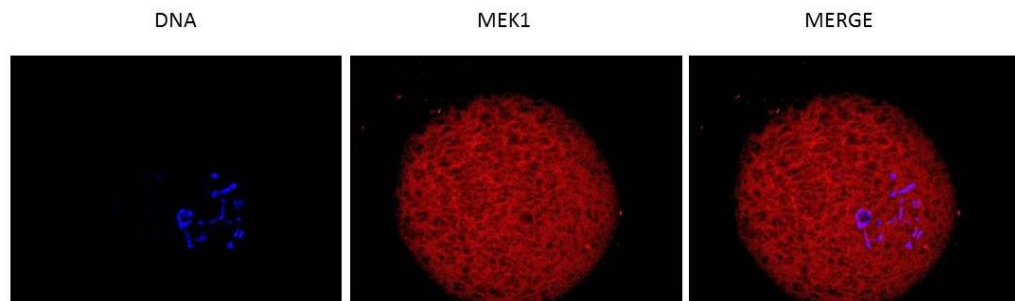
4.7 Statistická analýza

Získaná data byla analyzována prostřednictvím generálních lineárních modelů (GLM) v softwaru SAS (SAS, Institute, USA). Pro stanovení významných rozdílů mezi skupinami byl použit Schéffeho test. Statisticky významné rozdíly byly detekovány na hladině významnosti $P < 0.05$.

5 Výsledky

5.1 Přítomnost MEK1 a PARP-1 v nezralých GV prasečích oocytech

Přítomnost proteinů MEK1 (MAPK kináza) a PARP-1 byla zjišťována v nezralých GV prasečích oocytech prostřednictvím fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu. Reprezentativní oocyty s detekovanou kinázou MEK1 jsou zobrazeny na Obrázku 1. Reprezentativní oocyty s detekovanou kinázou PARP-1 jsou zobrazeny na Obrázku 2.



Obrázek 1: Reprezentativní GV oocyty s detekovanou kinázou MEK1.

Merge: DNA + MEK1. Měřítko = 50 μm .



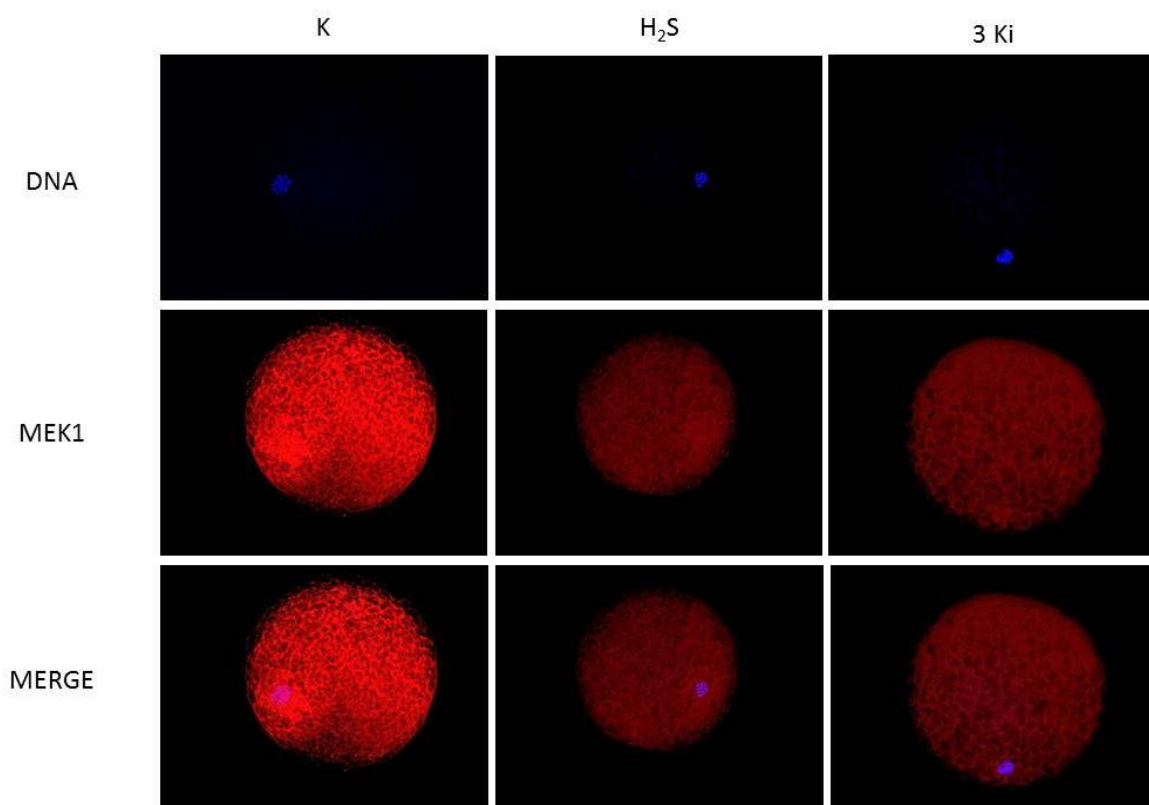
Obrázek 2: Reprezentativní GV oocyty s detekovaným proteinem PARP-1.

Merge: DNA + PARP-1. Měřítko = 50 μm .

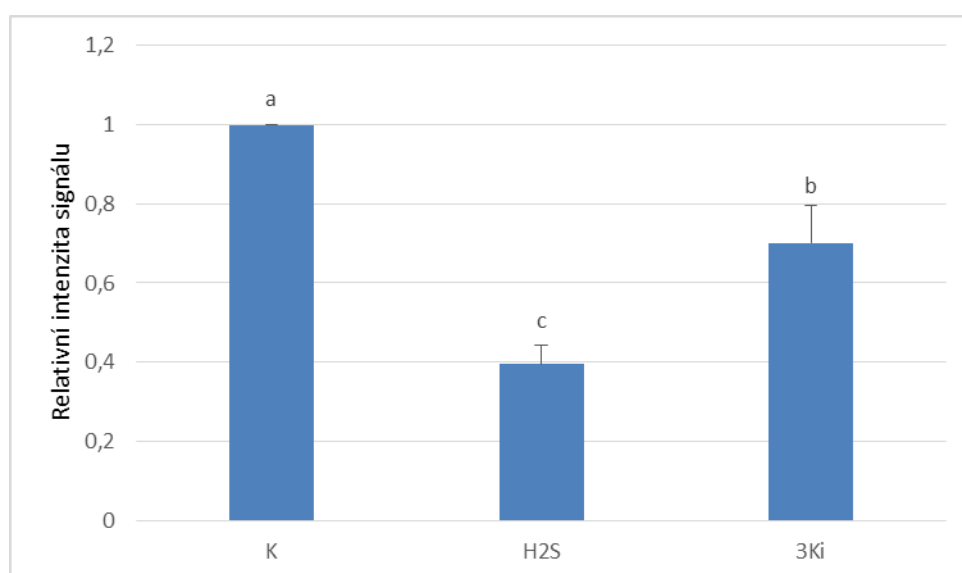
5.2 Vliv H₂S na expresi MEK1 v prasečích MII oocytech

Cílem experimentu bylo zjistit přítomnost MEK1 v dozrálých MII oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace. Pro tento účel byly vytvořeny tři skupiny oocytů: 1) kontrolní skupina oocytů kultivovaná v čistém kultivačním médiu (K), 2) oocyty kultivované v kultivačním médiu s Na₂S, donorem exogenního H₂S a 3) oocyty kultivované v kultivačním médiu s přidavkem kombinace specifických inhibitorů enzymů endogenně uvolňujících H₂S (3Ki). Oocyty byly po ukončení kultivace a dosažení stádia MII meiotického zrání fixovány a podrobeny imunocytochemické analýze. Intenzita signálu byla vyjádřena relativně ke kontrolní skupině oocytů (K = 1,00).

Z výsledků je patrné, že nejvyšší intenzitu signálu vykazuje skupina kontrolních oocytů (1,00 ± 0,00). Ve skupině oocytů s donorem H₂S dosahuje tato intenzita 0,39 (± 0,05). Ve skupině oocytů kultivovaných s přidavkem 3-kombinace inhibitorů (3Ki) dosahuje intenzita signálu hodnoty 0,70 (± 0,09). Reprezentativní oocyty jednotlivých experimentálních skupin s detekovanou kinázou MEK1 jsou zobrazeny na Obrázku 3. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 1.



Obrázek 3: Reprezentativní MII oocyty dozrálé *in vitro* s detekovanou kinázou MEK1. K: kontrolní skupina oocytů, H₂S: skupina oocytů s přidavkem exogenního donoru H₂S, 300 μM Na₂S, 3Ki: 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin a 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina, merge: DNA + MEK1. Měřítko = 50 μm.

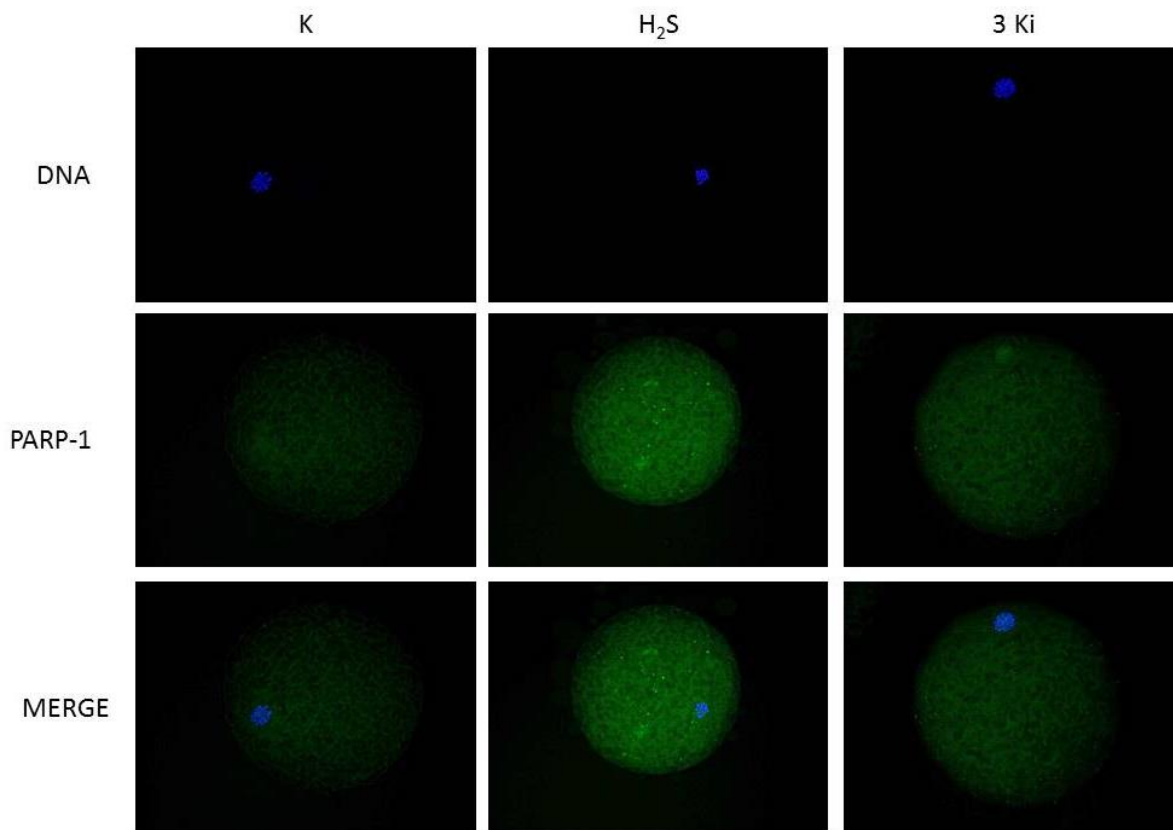


Graf 1: Relativní intenzita signálu MEK1 v MII oocytech dozrálých *in vitro*. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M.^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

5.3 Vliv H₂S na expresi PARP-1 v prasečích MII oocytech

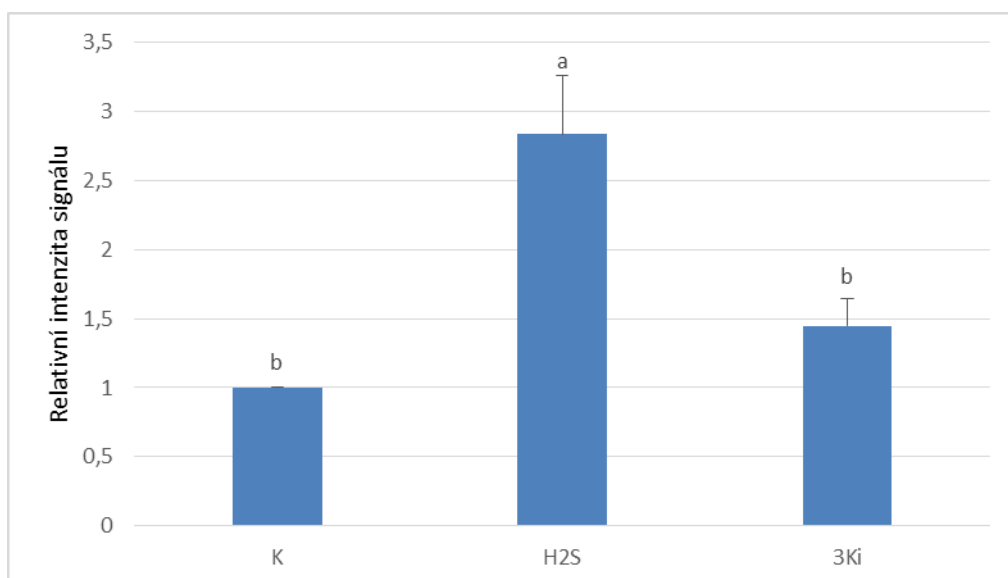
Cílem experimentu bylo zjistit přítomnost PARP-1 v dozrálých MII oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace. Pro tento účel byly vytvořeny tři skupiny oocytů: 1) kontrolní skupina oocytů kultivovaná v čistém kultivačním médiu (K), 2) oocyty kultivované v kultivačním médiu s Na₂S, donorem exogenního H₂S a 3) oocyty kultivované v kultivačním médiu s přidavkem kombinace specifických inhibitorů enzymů endogenně uvolňujících H₂S (3Ki). Oocyty byly po ukončení kultivace a dosažení stádia MII meiotického zrání fixovány a podrobeny imunocytochemické analýze. Intenzita signálu byla vyjádřena relativně ke kontrolní skupině oocytů (K = 1,00).

Z výsledků je patrné, že nejvyšší intenzitu signálu vykazuje skupina oocytů kultivovaná s donorem H₂S. V této skupině dosahuje relativní intenzita signálu 2,83 (± 0,42), čímž se statisticky významně liší od kontrolní skupiny oocytů (1,00 ± 0,00). Skupina oocytů kultivovaná s přidavkem 3-kombinace inhibitorů dosahuje intenzity signálu 1,45 (± 0,09), čímž se signifikantně neliší od skupiny kontrolní (1,00 ± 0,00). Skupina oocytů kultivovaná s donorem H₂S (2,83 ± 0,42) a skupina oocytů kultivovaná s 3-kombinací inhibitorů (1,45 ± 0,09) se navzájem statisticky významně liší. Reprezentativní oocyty jednotlivých experimentálních skupin s detekovanou kinázou PARP-1 jsou zobrazeny na Obrázku 4. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 2.



Obrázek 4: Reprezentativní MII oocyty dozrálé *in vitro* s detekovanou kinázou PARP-1.

K: kontrolní skupina oocytů, H₂S: skupina oocytů s přidavkem exogenního donoru H₂S, 300 μM Na₂S, 3Ki: 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin a 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina, merge: DNA + PARP-1. Měřítka = 50 μm.



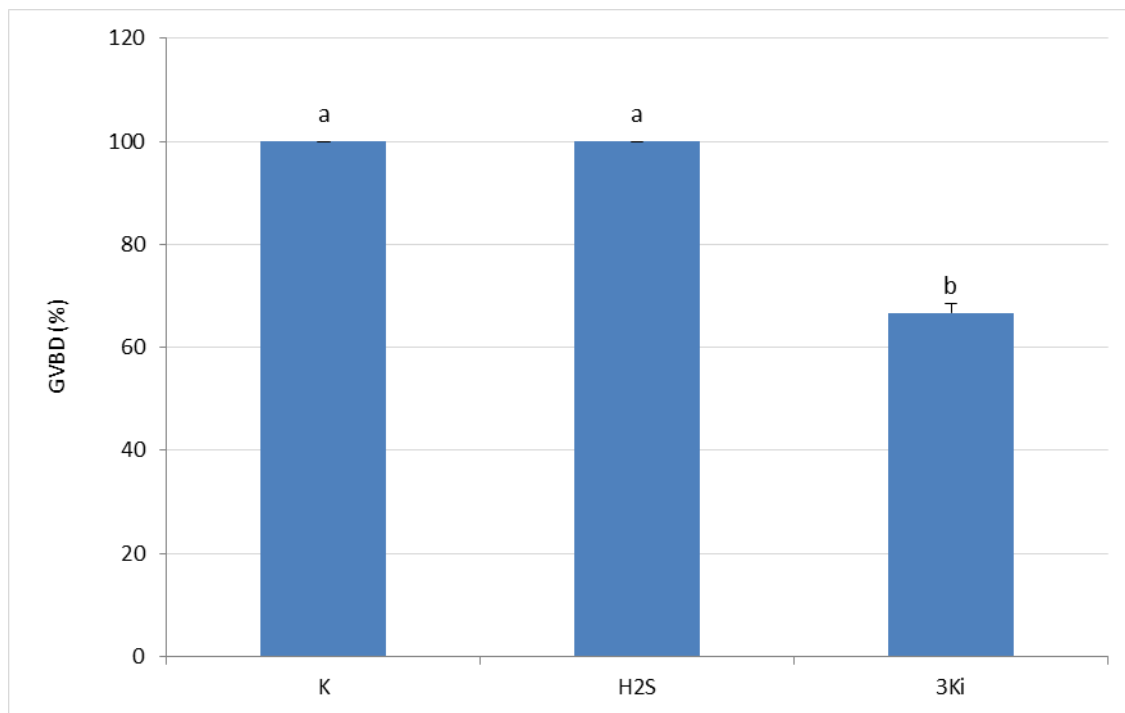
Graf 2: Relativní intenzita signálu PARP-1 v MII oocytech dozrálých *in vitro*. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. ^{a,b}Statisticky významné rozdíly (P<0.05).

5.4 Úloha H₂S během meiotického zrání prasečích oocytů

5.4.1 Vliv H₂S na GVBD a úspěšnost meiotického zrání oocytů

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv endogenně uvolňovaného H₂S a exogenně dodávaného H₂S na znovuzahájení meiotického zrání (GVBD) a jeho průběh (dosažení stádia metafáze I), za použití specifické kombinace inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S (3Ki) přidaných do kultivačního média. Pro tento účel byly použity prasečí oocyty kultivované po dobu 24 hod. *in vitro*. Jako donor exogenního H₂S byl použit 300 μM Na₂S. Jako efektivní 3-kombinace inhibitorů enzymů (3Ki) byla použita 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin a 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina.

Z výsledků experimentu je patrné, že skupina kontrolních oocytů a skupina oocytů s donorem H₂S se navzájem statisticky neliší (100,00 ± 0,00 v kontrolní skupině kontrolní versus 100,00 ± 0,00 ve skupině H₂S). Přidáním trojice inhibitorů (3Ki) do kultivačního média je výrazně potlačeno meiotické zrání oocytů. Tato skupina se od skupiny oocytů, jež byly kultivovány v čistém kultivačním médiu (K), statisticky významně liší. Ve skupině oocytů kultivovaných za přítomnosti trojice inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů (3Ki) došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu dozrálých oocytů do stádia MI, přičemž se počet zralých oocytů v porovnání s kontrolní skupinou snížil o 33,30 % (100,00 ± 0,00 v kontrolní skupině K vs. 66,70 ± 1,70 ve skupině 3Ki). Ke stejnému snížení (o 33,30 %) došlo ve skupině 3Ki při porovnání se skupinou oocytů, jež byly kultivovány s donorem exogenního H₂S. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 3.

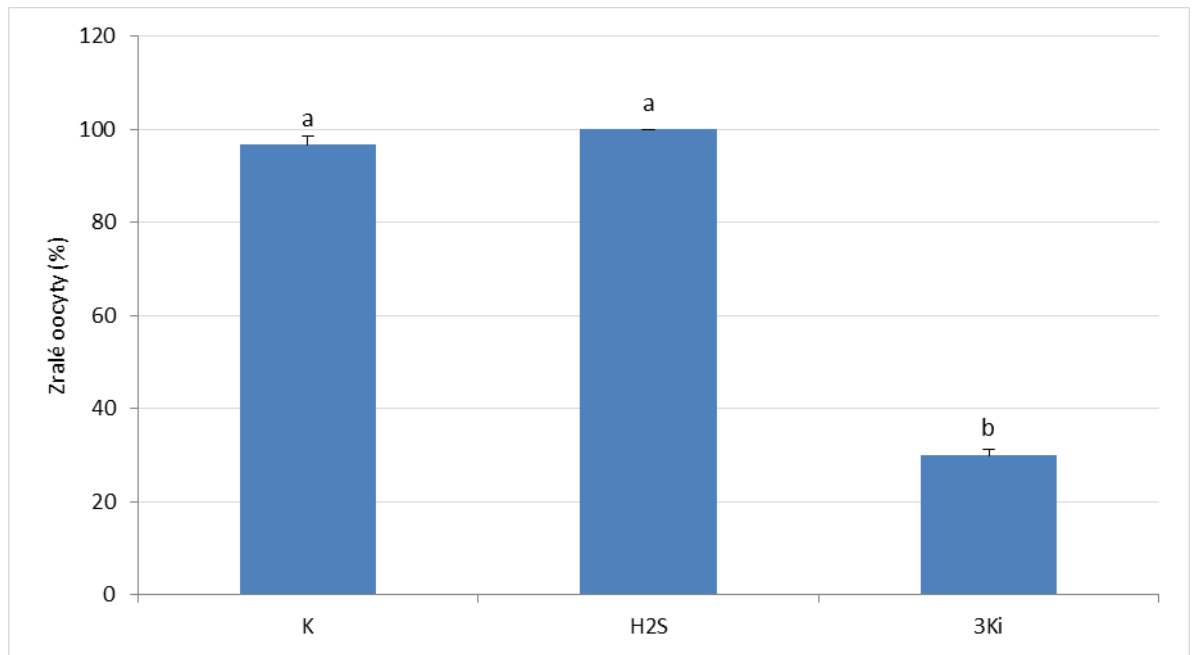


Graf 3: Vliv H₂S na oocyty GVBD a průběh meiotického zrání po 24. hod *in vitro* kultivace. V každé experimentální skupině bylo zahrnuto 120 oocytů, které byly hodnoceny ve třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje tři skupiny oocytů (K, donor H₂S a trojici inhibitorů 3Ki) kultivovaných 24 hod., osa y odpovídá počtu oocytů (průměr v % ± S.E.M.), které prodělaly GVBD. Skupina oocytů H₂S byla kultivována s exogenním donorem H₂S (300 μM Na₂S). Skupina oocytů 3Ki byla kultivována s trojicí inhibitorů H₂S (2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina).
^{a,b}Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

5.4.2 Vliv H₂S na průběh meiotického zrání oocytů

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv H₂S na průběh meiotického zrání po 24. hod *in vitro* kultivace, vyjádřeného dosažením stádia MI. Byl použit donor exogenního H₂S a specifická kombinace inhibitorů enzymů uvolňujících endogenní H₂S (3Ki), přidaných do kultivačního média. Jako donor exogenního H₂S byl použit 300 μM Na₂S. Jako efektivní 3-kombinace inhibitorů enzymů (3Ki) byla použita 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin a 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina.

Z výsledků experimentu je patrné, nejvyšší počet zralých oocytů se nachází ve skupině oocytů, jež byly kultivovány s donorem exogenního H₂S a odpovídá 100 %, čímž se statisticky významně neliší od skupiny oocytů, jež byla kultivována v čistém kultivačním médiu (96,70 % ± 2,00 ve skupině K vs. 100 % ± 0,00 ve skupině H₂S). Naopak trojice inhibitorů (3Ki) v kultivačním médiu signifikantně inhibuje meiotické zrání oocytů v porovnání s kontrolní skupinou oocytů (K), rovněž tak v porovnání se skupinou oocytů s donorem H₂S. Je tedy pozorován podobný trend jako v předchozím experimentu s oocyty ve stádiu GVBD. Přídavek trojice inhibitorů (3Ki) do kultivačního média způsobí u těchto oocytů pokles intenzity meiotického zrání oproti kontrolní skupině (K) o 66,70 % (96,70 % ± 2,00 ve skupině K vs. 30,00 % ± 1,40 ve skupině 3Ki). Při porovnání skupin oocytů kultivovaných s donorem H₂S a s 3Ki byl vyzorován 70,00 % rozdíl v počtu zralých oocytů (100,00 % ± 0,00 ve skupině H₂S vs. 30,00 % ± 1,40 ve skupině 3Ki). Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 4.

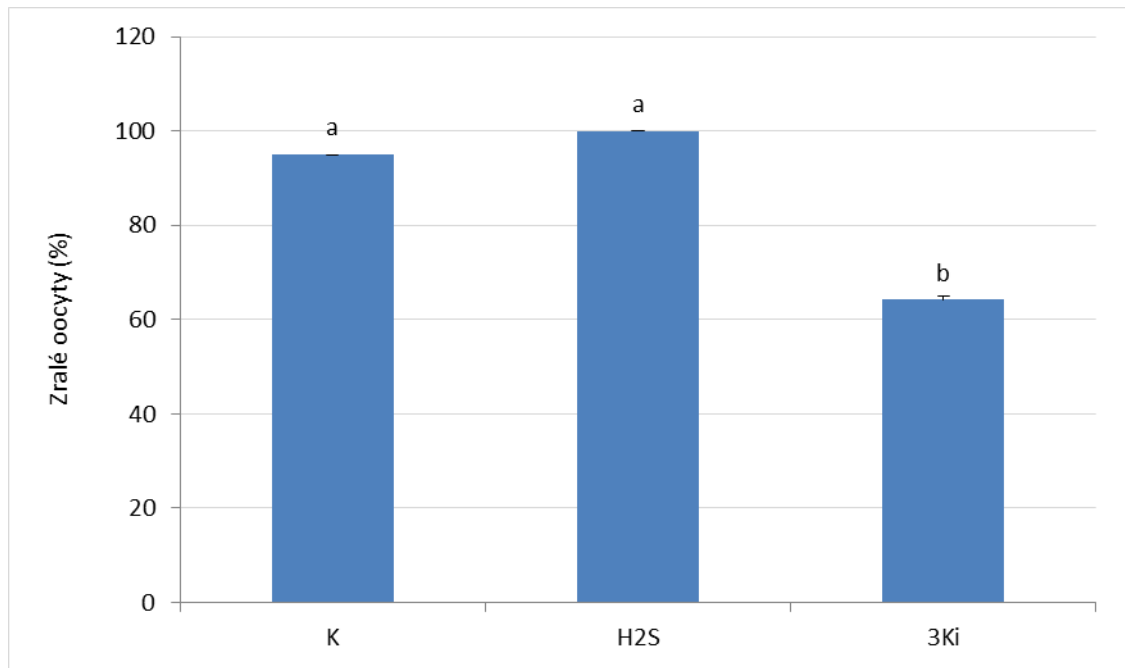


Graf 4: Vliv H₂S na oocyty MI a průběh meiotického zrání po 24. hod *in vitro* kultivace. Každá experimentální skupina zahrnovala 120 oocytů, které byly hodnoceny ve třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje tři skupiny oocytů (K, donor H₂S a trojici inhibitorů 3Ki) kultivovaných 24 hod., osa y odpovídá počtu oocytů (průměr v % ± S.E.M.). Skupina oocytů H₂S byla kultivována s exogenním donorem H₂S (300 μM Na₂S). Skupina oocytů 3Ki byla kultivována s trojicí inhibitorů H₂S (2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina). ^{a,b}Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

5.4.3 Vliv H₂S na úspěšnost meiotického zrání oocytů

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv H₂S na úspěšnost meiotického zrání oocytů, vyjádřenou dosažením stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivace. Byl použit donor exogenního H₂S a specifická kombinace inhibitorů enzymů uvolňujících endogenní H₂S (3Ki), přidaných do kultivačního média. Jako donor exogenního H₂S byl použit 300 μM Na₂S. Jako efektivní 3-kombinace inhibitorů enzymů (3Ki) byla použita 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin a 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina.

V průběhu experimentu nebyl vyzorován statisticky významný rozdíl v % zralých oocytů při porovnání skupiny kontrolních oocytů a skupinou oocytů s donorem H₂S (95,00 % ± 0,00 ve skupině K vs. 100,00 % ± 0,00 ve skupině s H₂S). Signifikantní rozdíl v počtu zralých oocytů byl pozorován při porovnání skupin oocytů kultivovaných v čistém kultivačním médiu (K) s oocyty kultivovanými s trojicí inhibitorů enzymů (3Ki). U skupiny kultivované s efektivní trojicí inhibitorů došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu zralých oocytů o 30,80 % v porovnání s kontrolní skupinou (95, 00 % ± 0,00 u skupiny K vs. 64,20 % ± 0,80 u skupiny 3Ki). Při porovnání se skupinou s donorem H₂S, kde počet zralých oocytů odpovídal 100 % (± 0,00), byl pozorován signifikantní rozdíl 35,80 % (100 % ± 0,00 ve skupině H₂S vs. 64,20 ± 0,08 ve skupině 3Ki). Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 5.

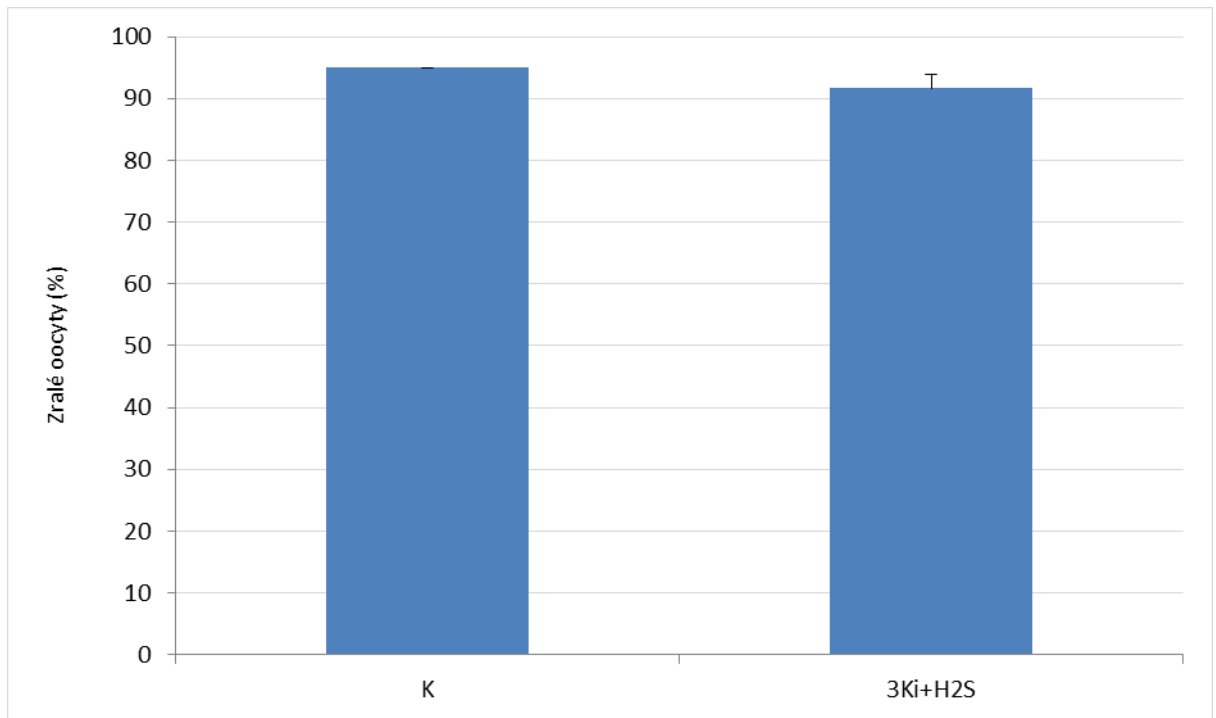


Graf 5: Vliv H₂S na úspěšnost meiotického zrání po 48 hod. *in vitro* kultivace. V každé experimentální skupině bylo zahrnuto 120 oocytů, které byly hodnoceny ve třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje tři skupiny oocytů (K, donor H₂S a trojici inhibitorů 3Ki), u nichž bylo hodnoceno dosažení stádia MII, osa y odpovídá počtu oocytů (průměr v % ± S.E.M.). Skupina oocytů H₂S byla kultivována s exogenním donorem H₂S (300 μM Na₂S). Skupina oocytů 3Ki byla kultivována s trojicí inhibitorů H₂S (2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina).^{a,b} Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

5.4.4 Ověření účinku 3Ki na meiotické zrání za současného použití Na₂S

Cílem experimentu bylo zhodnocení specifity účinku 3Ki pomocí 3Ki + Na₂S, po 48 hod. *in vitro* kultivace. Pro tento účel byly vytvořeny dvě skupiny oocytů: 1) kontrolní skupina oocytů kultivována v čistém kultivačním médiu (K), 2) oocyty kultivované v kultivačním médiu s přidavkem kombinace specifických inhibitorů enzymů (3Ki) v kombinaci s Na₂S, donorem exogenního H₂S (300 μM Na₂S), (3Ki + H₂S). Oocyty byly kultivovány po dobu 48 hod. a bylo hodnoceno dosažení stádia MII meiotického zrání.

Z výsledků experimentu vyplývá, že mezi pokusnými skupinami není statisticky významný rozdíl (95,00 % ± 0,00 zralých oocytů ve skupině K vs. 91,70 % ± 2,20 zralých oocytů ve skupině 3Ki+H₂S). Z experimentu je tak patrné, že negativní efekt 3Ki na meiotické zrání spočívá ve skutečné absenci endogenního H₂S uvolňovaného enzymaticky v oocyty. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů nejsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 6.



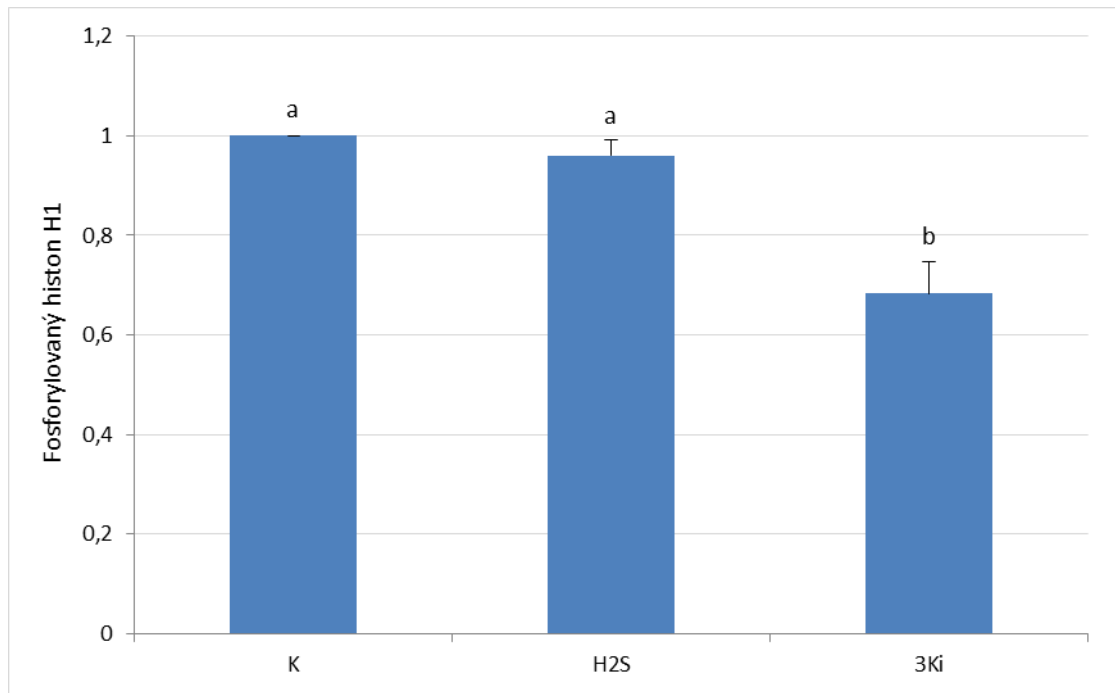
Graf 6: Ověření účinku 3Ki na úspěšnost meiotického zrání oocytů za současného použití 3Ki a Na₂S po 48 hod. *in vitro* kultivace. V obou experimentálních skupinách bylo použito a hodnoceno 120 oocytů ve třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje dvě skupiny oocytů (K a 3Ki+H₂S) ve stádiu MII po 48 hod *in vitro* kultivace, osa y odpovídá počtu oocytů (průměr v % ± S.E.M.). Skupina K oocytů byla kultivována v čistém kultivačním médiu, skupina 3Ki+H₂S oocytů byla kultivována v kultivačním médiu s přidavkem 2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina a 300 μM Na₂S). Statisticky nevýznamné rozdíly (P<0,05).

5.5 Vliv H₂S na kinázovou aktivitu ve zrajících oocytech

Cílem experimentu bylo zhodnocení vlivu H₂S na aktivitu klíčových kináz meiotického zrání – MPF a MAPK, podle kvantifikace fosforylovaných specifických substrátů H1 a MBP. Pro tento účel byly použity oocyty v MI fázi po 24 hod. *in vitro* kultivace v čistém kultivačním médiu (K) nebo v přítomnosti Na₂S, donoru exogenního H₂S či kombinace inhibitorů enzymů (3Ki).

5.5.1 Vliv H₂S na kinázovou aktivitu MPF ve zrajících oocytech

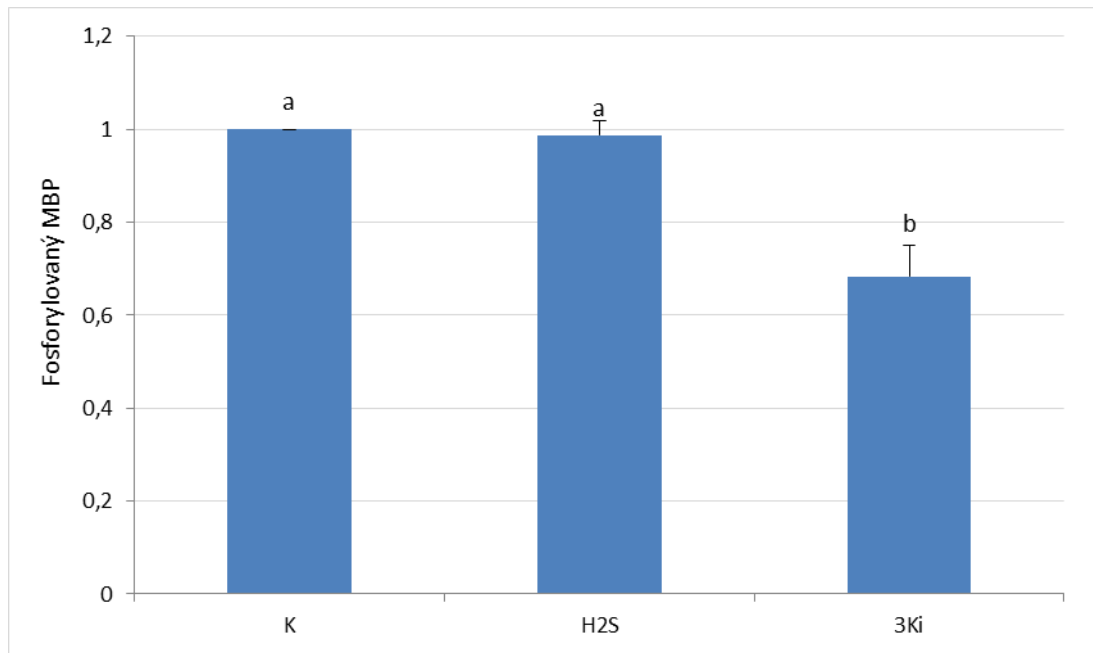
Z výsledků je patrné, že nejnižší hodnota fosforylovaného H1, jež je specifickým substrátem MPF, se nachází ve skupině oocytů kultivovaných v přítomnosti inhibitorů enzymů (3Ki). MPF aktivita v této skupině vykazuje signifikantně významný pokles oproti aktivitě MPF ve skupině kontrolních oocytů (100,00 % ± 0,00 ve skupině K vs. 68,00 % ± 0,07 ve skupině 3Ki). Pokles aktivity MPF ve skupině 3Ki je zaznamenán i při porovnání se skupinou oocytů kultivovaných s donorem H₂S. V tomto případě činí rozdíl 28% (96,00 % ± 0,03 ve skupině H₂S vs. 68,00 % ± 0,07 ve skupině 3Ki). Při porovnání aktivity u oocytů kultivovaných v čistém kultivačním médiu a aktivitou MPF oocytů kultivovaných s donorem H₂S, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (100,00 % ± 0,00 ve skupině K vs. 96,00 % ± 0,03 ve skupině H₂S). Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 7.



Graf 7: Efekt H₂S na aktivitu MPF po 24 hod. *in vitro* kultivace. Každá experimentální skupina zahrnovala 15 oocytů v min. třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje tři skupiny oocytů (K, donor H₂S a trojici inhibitorů 3Ki) kultivovaných 24 hod., osa y odpovídá hodnotě fosforylovaného H1. Skupina oocytů H₂S byla kultivována s exogenním donorem H₂S (300 μM Na₂S). Skupina oocytů 3Ki byla kultivována s trojicí inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S (2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina). ^{a,b}Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

5.5.2 Vliv H₂S na kinázovou aktivitu MAPK ve zrajících oocytech

Při měření kinázové aktivity MAPK na základě fosforylace specifického substrátu MBP byl po 24 hod. *in vitro* kultivace vypořovován podobný trend jako v experimentu s kinázovou aktivitou MPF ve zrajících oocytech. Z výsledků experimentu bylo vypořovováno, že nejnížší hodnota fosforylovaného MBP se nachází ve skupině oocytů, jež byly kultivovány v přítomnosti 3-kombinace inhibitorů enzymů (3Ki). MAPK aktivita v této skupině vykazuje signifikantně významný pokles oproti aktivitě MAPK ve skupině kontrolních oocytů (100 % ± 0,00 v kontrolní skupině vs. 68,30 % ± 0,07 ve skupině 3Ki). Pokles aktivity MPF ve skupině 3Ki je zaznamenán i při porovnání se skupinou oocytů kultivovaných s donorem H₂S. V tomto případě činí rozdíl 30,50 % (98,80 % ± 0,03 ve skupině H₂S vs. 68,30 % ve skupině 3Ki). Při porovnání MPF aktivity oocytů kultivovaných v čistém kultivačním médiu a aktivitou MPF kultivovaných s H₂S nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (100 % ± 0,00 ve skupině K vs. 98,80 % ± 0,03 ve skupině H₂S). Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů jsou statisticky významné (P<0,05), viz Graf 8.



Graf 8: Efekt H₂S na aktivitu MAPK po 24 hod. *in vitro* kultivace. Každá experimentální skupina zahrnovala 15 oocytů v min. třech nezávislých experimentech. Osa x znázorňuje tři skupiny oocytů (K, donor H₂S a trojici inhibitorů 3Ki) kultivovaných 24 hod., osa y odpovídá hodnotě fosforylovaného MBP. Skupina oocytů H₂S byla kultivována s exogenním donorem H₂S (300 μM Na₂S). Skupina oocytů 3Ki byla kultivovaná s trojicí inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S (2 mM oxamová kyselina, 2 mM DL-propargylglycin, 5 mM alfa-ketoglutarová kyselina). ^{a,b}Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

6 Diskuze

Vývoj folikulu a oocytu zahrnuje mnohočetné intraovariální a endokrinologické reakce, které mají vliv na měnící se mikroprostředí uvnitř folikulu. Tyto reakce umožňují výběr antrálního folikulu pro další vývoj a vznik kompetentního oocytu vhodného pro fertilizaci (shrnuto v Dumesic *et al.*, 2015). Znalost těchto procesů je základní podmínkou pro fungování, existenci a další rozvoj reprodukčních biotechnologií jako oboru, který se zabývá cílenými zásahy do reprodukce zvířat i lidí. Právě přesun procesu vývoje oocytu z těla samice do laboratorních podmínek je klíčovým mezníkem oboru reprodukce a znalost optimálních podmínek vývoje oocytu by proto představovala prolomení současných limitujících faktorů úspěšnosti zrání savčích oocytů *in vitro*.

Vzhledem k tomu, že zralý a oplození schopný oocyt má v reprodukčním traktu samice poměrně krátkou životnost, načasování meiotického bloku, stejně jako celý průběh zrání oocytu, musí být přísně řízen a usměrňován. K tomu slouží řada regulačních mechanismů (Mehlman, 2005). Mezi známé regulační mechanismy patří cAMP, MPF nebo MAPK (Alberio *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007; Von Stetina *et al.*, 2011). Až v poměrně nedávné době začala být studována úloha a fyziologický potenciál endogenních plyných molekul, takzv. gasotransmiterů, na živočišné tkáni (Wang, 2002). Mezi dosud známé gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S) (Wang, 2002; Wu *et al.*, 2005; Mustafa *et al.*, 2009b; Stárka, 2009). Zatímco úloha NO v procesu vývoje a zrání oocytů byla na základě experimentů potvrzena (Nakamura *et al.*, 2002; Chmelíková *et al.*, 2010), význam CO a H₂S zůstával dlouho opomíjen. H₂S byl po desítky let vnímán pouze jako toxický plyn (Yant, 1930; Mustafa *et al.*, 2009a ; Lindenmann, 2010), jež při vysokých koncentracích způsobuje poškození dýchací a centrální nervové soustavy a následnou smrt (Yant, 1930). V současné době je známo, že H₂S má vliv na řadu biologických dějů a indukuje řadu fyziologických procesů, včetně reprodukčních. V samčím i samičím reprodukčním systému byly detekovány enzymy regulující endogenní produkci H₂S, na základě čehož bylo zjištěno, že H₂S ovlivňuje i celou řadu reprodukčních funkcí (Šmelcová *et al.*, 2011) a mezi procesy, které je schopen regulovat patří také průběh meiotického zrání oocytů (Liang *et al.*, 2006; Nevorál *et al.*, 2014; 2015). Také výsledky experimentů předkládané diplomové práce prokázaly zapojení signální dráhy H₂S do regulace meiotického zrání prasečích oocytů.

Na základě experimentů byl prokázán vliv endogenně uvolňovaného H₂S a exogenně dodávaného H₂S na znovuzahájení meiotického zrání prasečích GVBD oocytů a průběh

meiotického zrání po 24 hod. *in vitro* kultivace, vyjádřeného dosažením stádia MI. Skupina oocytů ošetřená 3-kombinací specifických inhibitorů enzymů endogenně uvolňujících H₂S (3Ki) vykazovala signifikantně nižší počet oocytů, které prodělaly GVBD, v porovnání s kontrolní skupinou oocytů. Lze předpokládat, že sledované projevy inhibice těchto enzymů byly výsledkem fyziologické produkce H₂S. Výsledek experimentu je ve shodě s předchozími pracemi (Nevoral *et al.*, 2015), kde byla fyziologická role H₂S v procesu meiotického zrání prasečích oocytů pozorována.

V dalším experimentu byl prokázán vliv H₂S také na průběh meiotického zrání prasečích oocytů po 24 hod. *in vitro* kultivace, vyjádřeného dosažením stádia MI. Počet oocytů, jež dosáhl stádia MI, byl ve skupině oocytů ošetřených inhibitory enzymů statisticky významně nižší, než ve skupině kontrolních oocytů. Vzhledem k tomu, že požadovaného stádia MI dosáhlo pouhých 30 % oocytů, můžeme spekulovat nad tím, že enzymatická produkce H₂S je v tomto případě pro postup do další fáze zrání oocytu nezbytná. V souladu s výsledky tohoto experimentu je i práce Nevorala *et al.*, (2014), v níž byl hodnocen vliv donoru H₂S na jaderné zrání prasečích oocytů a v níž bylo prokázáno, že donor H₂S má pozitivní vliv na meiotické zrání.

Dalšími experimenty byla prokázána fyziologická úloha H₂S-uvolňujících enzymů i při dosažení stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivace. V průběhu experimentu byl vyzorován statisticky významný pokles v procentu zralých oocytů ve skupině oocytů kultivovaných se specifickou kombinací inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S, čímž je i v tomto případě prokázána shoda s předchozími studii (Nevoral *et al.*, 2015). Pro ověření specifity účinku 3Ki byly oocyty v následujícím experimentu po dobu 48 hod. současně kultivovány s inhibitory enzymů a s donorem exogenního H₂S. V experimentu nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtu zralých oocytů v kontrolní skupině a ve skupině kultivované v kultivačním médiu s přídavkem 3Ki a exogenního donoru H₂S. Rychlost zrání u obou skupin oocytů byla shodná, na základě čehož lze předpokládat, že negativní efekt 3Ki na meiotické zrání spočívá skutečně v absenci endogenního H₂S uvolňovaného enzymaticky v oocyty.

I v dříve publikovaných studiích (Krejčová *et al.*, 2015) je demonstrován příznivý vliv exogenně dodávaného H₂S na procesu prodloužené kultivace *in vitro* dozrálých oocytů a urychlující efekt na meiotické zrání oocytů (Nevoral *et al.*, 2014). Koncentrace dodávaného donoru H₂S v těchto experimentech byly srovnatelné s jeho fyziologickými hodnotami ve tkáních, z čehož vyplývá, že účinky Na₂S nebyly výsledkem toxicity H₂S, nýbrž jeho fyziologické funkce jako gasotransmiteru (Nevoral *et al.*, 2014).

Meiotické zrání savčích oocytů je regulováno řadou mechanismů (Mehlman, 2005). Mezi hlavní regulační faktory komplikovaného a souhrnného procesu meiotického zrání oocytů patří proteinové kinázy MPF a MAPK (Tian *et al.*, 2002). Pro jejich správnou funkci jsou třeba takzvaní druzí poslové, signální molekuly, jejichž koncentrace v buňce prudce vzrůstá po navázání prvních poslů na membránový receptor (Lodish *et al.*, 2007). K významným druhým poslům patří např. cAMP, cGMP, Ca²⁺ (Alberts *et al.*, 2005) a v neposlední řadě i gasotransmitter H₂S (Wang, 2002). V našich experimentech jsme prokázaly vliv H₂S na aktivitu těchto klíčových kináz meiotického zrání a to prostřednictvím kvantifikace fosforylovaných specifických substrátů H1 a MBP. Z výsledků experimentů je patrné, že nejnižší hodnota fosforylovaného H1, specifického substrátu MPF, se nachází ve skupině oocytů kultivovaných v přítomnosti inhibitorů enzymů. Podobný trend byl vyzorován i při měření kinázové aktivity MAPK na základě fosforylace specifického substrátu, MBP. Molekulární mechanismus účinku H₂S na MPF a MAPK zůstává zatím neznámý, nicméně jako jeden z možných mechanismů se jeví proces S-sulhydratace, post-translační mechanismus (Zhao *et al.*, 2014), který prostřednictvím změny aktivity proteinů a kináz (Snijder *et al.*, 2013) řídí a ovlivňuje řadu metabolických procesů v buňce (Mustafa *et al.*, 2009a). Zhao *et al.* (2014) prokázali, že H₂S má v somatických buňkách schopnost sulhydratovat mimo jiné i MEK1, který je důležitou součástí signální kaskády vedoucí právě k aktivaci MPF a MAPK, klíčových kináz meiotického zrání. MEK1 je sulhydratován na cystein 341, který vede k aktivaci PARP-1, enzymu regulujícího stabilitu genomu (Zhao *et al.*, 2014). Byl tedy vytvořen předpoklad, že k podobné aktivaci dochází účinkem endogenně uvolněného H₂S rovněž v průběhu meiotického zrání a že právě procesem S-sulhydratace MEK1, H₂S významně zasahuje do aktivace MAPK a MPF, čímž významně ovlivňuje a reguluje proces meiotického zrání oocytů.

V námi provedených experimentech bylo zjištěno, že nejnižší hodnotu MEK1 v dozrálých MII prasečích oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace vykazuje skupina oocytů s přidavkem exogenního donoru H₂S. Nejnižší hodnota této kinázy ve skupině oocytů s přidavkem H₂S nicméně nekoresponduje s rostoucí aktivitou MAPK. To lze vysvětlit i tím, že oba sledované faktory a jejich intenzita byla hodnocena v rozdílný moment meiotického zrání prasečích oocytů. Zatímco hodnota MAPK byla sledována u oocytů po 16 – 24 hod. *in vitro* kultivace, relativní intenzita signálu MEK1 byla sledována v dozrálých MII oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace. Při rozdílných časových momentech měření spolu tyto faktory nemusí nutně plně souviset. Proto náš předpoklad, že signální kaskáda MEK1-MAPK může být H₂S ovlivňována a že H₂S může sulhydratovat MEK1 (Zhao *et al.*, 2014) v průběhu

meiotického zrání oocytů, nelze nutně zamítnout. Navíc lze předpokládat, že sledované zpomalení meiotického zrání v předchozích experimentech, vyjádřených GVBD, dosažením MI a MII stádia, ošetřených specifickou kombinací inhibitorů enzymů 3Ki může mít příčinu právě v neadekvátní regulaci signální dráhy MEK1-MAPK prostřednictvím procesu S-sulhydratace v počátečních fázích meiotického zrání.

V experimentu, kde jsme zjišťovali přítomnost PARP-1 v dozrálých MII oocytech po 48 hod. *in vitro* kultivace nebyla prokázána relevantní závislost intenzity signálu PARP-1 v oocytech na přítomnosti různých koncentrací H₂S v kultivačních médiích. Je proto pravděpodobné, že signální kaskáda MEK1-PARP-1 není H₂S-dependetní. Můžeme spekulovat nad tím, že enzym PARP-1 není regulován pouze kaskádou MEK1-PARP-1, ale že existují ještě jiné nadřazené faktory PARP-1 regulující. Jak ve své studii uvádějí Ba *et* Garg (2011), přestože je známa důležitá role PARP-1 jako multifunkčního enzymu důležitého pro udržování integrity genomu, signalizačním událostem, které vedou k jeho aktivaci a těm, které ho modulují, nebylo dosud věnováno příliš pozornosti. Hlavním spouštěčem vedoucím k aktivaci PARP-1 se zdá být přímo samotné poškození DNA, prostřednictvím antioxidantů nebo genotoxicity, nicméně jakým způsobem se signál o poškození DNA přenáší přímo k enzymu PARP-1, zůstává zatím předmětem dalšího zkoumání (Ba *et* Garg, 2011). Jako jednou z možných cest se ukazuje být nadměrný příjem Ca²⁺ mitochondriemi a následná mitochondriální produkce ROS, vedoucí k aktivaci PARP-1 (Gupta *et al.*, 2009)

V experimentech předkládaných v této diplomové práci byla potvrzena vědecká hypotéza o vlivu endogenní produkce H₂S na průběh meiotického zrání prasečích oocytů. Ve všech doložených experimentech došlo po přidání 3Ki k signifikantnímu zpomalení průběhu meiotického zrání prasečích oocytů. Je tedy zřejmé, že H₂S se aktivně zapojuje do regulace procesů spojených s meiotickým zráním. V experimentech byl navíc prokázán nesporný vliv H₂S na aktivitu klíčových kináz meiotického zrání – MPF a MAPK a akcelerační efekt H₂S na kinázovou aktivitu ve zrajících oocytech. Stále existuje předpoklad, že H₂S je schopen ovlivnit tyto proteinové kinázy na základě S-sulhydratace MEK1 v momentě GVBD. Hypotéza o zapojení H₂S do regulace signální kaskády MEK-PARP-1 regulující stabilitu genomu potvrzena nebyla. Další experimenty jsou nezbytné k vhodnému ověření mechanismu účinku H₂S, zejména pak pro ověření aktivace MEK1 prostřednictvím post-translační modifikace S-sulhydratací.

7 Závěr

Meiotické zrání je komplikovaný proces, jehož výstupem je vznik oplození schopného oocyty. Tím je zároveň determinujícím faktorem vzniku a vývoje nového jedince. Přestože se jedná o významný proces a klíčový děj reprodukce a života každého živého jedince, není proces meiotického zrání dodnes plně prostudován. Naopak jsou objevovány nové faktory, které do onoho souhrnného procesu zasahují a které ho řídí a regulují.

Jedním z nich je i H_2S , plynná molekula endogenního původu. H_2S patří do rodiny gasotransmiterů, molekul plynů volně prostupných přes plazmatickou membránu, plnicí v organismu důležitou roli přenašečů buněčné signalizace.

Na základě experimentů předkládané diplomové práce byla potvrzena hypotéza, že endogenní produkce H_2S má nesporný vliv na průběh meiotického zrání. Prostřednictvím inhibice enzymů, které jsou zodpovědné za endogenní produkci H_2S v prasečích oocytech, bylo demonstrováno zpomalení meiotického zrání vyjádřeného GVBD, dosažením MI a MII stádia. Zároveň byl prokázán vliv H_2S na aktivitu klíčových kináz meiotického zrání, MPF a MAPK. Je tak zřejmé, že H_2S funguje v oocytech jako signální molekula, která je pro bezproblémový průběh meiotického zrání nezbytná. Další experimenty zaměřené na testování signální kaskády H_2S -MEK1-PARP-1, regulující stabilitu genomu, nepotvrdily zapojení H_2S do buněčné signalizace prostřednictvím MEK1 a PARP-1. I přesto lze na základě kvantifikace PARP-1 poukázat na protektivní účinky donoru H_2S , pro objasnění jeho molekulárního mechanismu je však zapotřebí dalších experimentů.

Výsledky experimentů této diplomové práce mohou přispět k lepšímu pochopení procesů, které v oocyty během meiotického zrání probíhají. Tyto poznatky by mohly být zároveň využitelné pro zvýšení úspěšnosti v oblasti lidské asistované reprodukce a reprodukčních biotechnologií zvířat, kde je vznik oplození schopného oocyty pro úspěšný embryonální vývoj a normální vývoj zdravého jedince determinujícím faktorem. Studium H_2S , jako faktoru regulujícího meiotické zrání, může vést k preciznější suplementaci kultivačních médií a vytvoření optimálnějších podmínek pro vývoj oocyty mimo *in vivo* podmínky. Je proto zapotřebí odhalit celou komplexní a složitou kaskádu reakcí a zcela tak objasnit celý proces meiotického zrání oocyty.

8 Seznam použité literatury

ABE, K., KIMURA, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*. 16 (3). 1066–1071.

ALBERIO, R., ZAKHARTCHENKO, V., MOTLÍK, J., WOLF, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *The International Journal of Developmental Biology*. 45 (7). 797–809.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2005. *Základy buněčné biologie*. 2. vyd. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740 s. ISBN: 80-902906-2-0.

BA, X., GARG, N. J. 2011. Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *American Journal of Pathology*. 178 (3). 946–955.

BIELANSKA-OSUCHOWSKA, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology*. 6 (2). 161–193.

BLACK, J. L., ERICKSON, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1). 45–56.

CAMERON, M. R., FOSTER, J. S., BUKOVSKY, A., WIMALASEN, J. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 55 (1). 111–119.

CAMPBELL, N. A., REECE, J. B. 2008. *Biologie*. 6. vyd. Computer Pres. Brno. 1332 s. ISBN: 80-251-1178-4.

COX, N. M. 1997. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52. 31–46.

DEKEL, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234 (1-2). 19–25.

DISTRUTTI, E., SEDIATRI, L., MENCARELLI, A., RENGA, B., ORLANDI, S., ANTONELLI, E., ROVIEZZO, F., MORELLI, A., CIRINO, G., WALLACE, J. L., FIORUCCI, S. 2006. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP Channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 316 (1). 325–335.

DUMESIC, D. A., MELDRUM, D. R., KATZ-JAFFE, M. G., KRISHER, R. L., SCHOOLCRAFT, W. B. 2015. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*. 103 (2). 303–316.

EPPIG, J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development*. 8 (4). 485–489.

EPPIG, J. J., DOWNS, S. M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocytes maturation. *Biology of Reproduction*. 30 (1). 1–11.

EPPIG, J. J., O'BRIEN, M. J. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*. 54 (1). 197 – 207.

ERICKSON, G. F. Follicle Growth and Development. *Global Library of Women's Medicine* [online]. 2008 [cit. 2015-08-19]. Dostupné z

<http://www.glowm.com/section_view/item/288/recordset/18975/value/288 >.

ETO, K., ASADA, T., ARIMA, K., MAKIFUCHI, T., KIMURA, H. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293 (5). 1485–1488.

FAN, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535–547.

- FORD, H. L., PARDEE, A. B. 1999. Cancer and the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*. 32/33. 166–172.
- FOŘTOVÁ, M., PRŮŠA, R., ZIMA, T. 2009. Arrestiny a jejich role v regulaci buněčných procesů. *Klinická biochemie a metabolismus*. 17 (38). 5–16.
- FURNE, J., SPRINGFIELD, J., KOENING, T., DeMASTER, E., LEVITT, M. D. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology*. 62 (2). 255–259.
- GADALLA, M. M., SNYDER, S. H. 2010. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of Neurochemistry*. 113 (1). 14–26.
- GILBERT, S. F. 2000. *Developmental Biology*, 6th ed. Sinauer Associates. Sunderland. p. 695. ISBN: 978-0878932436.
- GOSDEN, R. G., TELFER, E. E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*. 211 (1). 169–175.
- GOTOH, Y., MASUYAMA, N., DELL, K., SHIRAKABE, K., NISHIDA, E. 1995. Initiation of *Xenopus* Oocyte Maturation by Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (43). 25898–25904.
- GOUGEON, A. 1996. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17 (2). 121–155.
- GOUGEON, A., CHAINY, G. B. N. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *The Journal of the Society for Reproductive and Fertility*. 81. 433.
- GUPTA, S., BHATIA, V., WEN, J. J., WU, Y., HUANG, M. H., GARG, N. J. 2009. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. 47 (10). 1414–1421.

- GUPTA, S. K., CHAKRAVARTY, S., SURAJ, K., BANSAL, P., GANGULY, A., JAIN, M. K., BHANDARI, B. 2007. Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Society for Reproduction and Fertility Supplement*. 63. 203–216.
- HAMPL, A., JOHN, J. E. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925–933.
- HIRSHFIELD, A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124. 43–101.
- HOFFMANN, I., PAUL, R. C., MARCOTE M. J., KARSENTI, E., DRAETTA, G. 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2 -cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *The EMBO Journal*. 12 (1). 53–63.
- HUNT, T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Current Opinion in Cell Biology*. 1 (2). 268–274.
- HUNTER, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122–130.
- HURK van den, H., ZHAO, J. 2004. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717–1751.
- CHESNEL, F., EPPIG, J. J. 1995. Synthesis and accumulation of p34^{cdc25} and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (4). 503–508.
- CHMELÍKOVÁ, E., JEŠETA, M., SEDMÍKOVÁ, M., PETR, J., TŮMOVÁ, L., KOTT, T., LIPOVOVÁ, P., JÍLEK, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18 (3). 235–244.
- INOUE, M., NAITO, K., NAKAYAMA, T., SATO, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58 (1). 130–36.

- ISHII, I., AKAHOSHI, A., YU, X. N., KOBAYASHI, Y., NAMEKATA, K., KOMAKI, G., KIMURA, H. 2004. Murine cystathionine g-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochemical Journal*. 381 (1). 113–123.
- ITO, J., KASHIWAZAKI, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*. 83 (10). 669–682.
- ITO, M. 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Molecular Biology*. 43 (5-6). 677–690.
- JELÍNEK, R., DOSTÁL, M., LIKOVSKÝ, Z., HALAŠKOVÁ, M., MAŇÁKOVÁ, E., PETERKA, M., PETERKOVÁ, R., TITLBACH, M., VELICKÝ, J., ZEMANOVÁ, Z. 1990. *Histologie a embryologie*. Praha. 224 s.
- JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J. K., TILLY, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145–150.
- KATZ, B. Z., ZAMIR, E., BERSHADKY, A., KAM, Z., YAMADA, K. M., GEINER, B. 2000. Physical State of the Extracellular Matrix Regulates the Structure and Molecular Composition of Cell-Matrix Adhesions. *Molecular Biology of The Cell*. 11 (3). 1047–1060.
- KEMPISTY, B., JACKOWSKA, M., BUKOWSKA, D., ANTOSIK, P., WOZ'NA, M., PIOTROWSKA, H., SWIERCZEWSKA, M., JASKOWSKI, J., M. 2011. Mechanisms regulating oogenesis, folliculogenesis and fertilization in pigs. *Medycyna Weterynaryjna*. 67 (5). 299–303.
- KIMURA, H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants and Redox Signaling*. 12 (9). 1111–1123.
- KIMURA, Y., KIMURA, H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB Journal*. 18 (10). 1165–1167.

KLECKNER, N. 1996. Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (16). 1867–8174.

KREJCOVA, T., SMELCOVA, M., PETR, J., BODART, J-F., SEDMIKOVA, M., NEVORAL, J., DVORAKOVA, M., VYSKOCILOVA, A., WEINGARTOVA, I., KUCEROVA-CHRPOVA, V., CHMELIKOVA, E., TUMOVA, L., JILEK, F. 2015. Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. *Plos One* 10 (1): e0116964. doi:10.1371/journal.pone.0116964

KUBELKA, M., MOTLIK, J., SCHULTZ, R. M., PAVLOK, A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*. 62 (2). 292–302.

KUMAR, T. R., YAN, W., NAIFANF, L., MATZUK, M. M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*. 15. 201–204.

KYRIAKIS, J. M., AVRUCH, J. 2001. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*. 81 (2). 807–869.

LEE, H. J., SELESNIEMI, K., NIIKURA, Y., NIIKURA, T., KLEIN, R., DOMBKOWSKI, D. M., TILLY, J. L. 2007. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Journal of Clinical Oncology*. 25 (22). 198–204.

LENNARZ, W. J., LANE, M. D., MODRICH, P., DIXON, J., CARAFOLI, E., EXTON, J., CLEVELAND, D. 2004. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press. New York. p. 3000. ISBN: 978-0124437104.

LIANG, CH., SU, Y., FAN, H., SCHATTEN, H., SUN, Q. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endocrinology*. 21 (9). 2037–2055.

- LIANG, R., WEI-DONG, Y., JUN-BAO, D., LI-JUN, Y., JING-JING, Y., JIAN, X., MEI, S., JING-ZHU, G. 2007. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89–96.
- LIANG, R., YU, W. D., DU, J., YANG, L., SHANG, M., GUO, J. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*, 119 (22). 1877–1883.
- LINCOLN, A. J., WICKRAMASINGHE, D., STEIN, P., SCHULTZ, R. M., PALKO, M. E., DE MIGUEL, M. P., TESSAROLLO, L., DONOVAN, P. J. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30. 446–449.
- LINDENMANN, J., MATZI, V., NEUBIECK, N., RATZENHOFER-KOMEDA, B., MAIER, A., SMOLLE-JEUTTNER, F. M. 2010. Severe hydrogen sulphide poisoning treated with 4-dimethylaminophenol and hyperbaric oxygen. *Diving and Hyperbaric Medicine Journal*. 40 (4). 213–217.
- LODISH, H., BERK, A., KAISER, CH. A., KRIEGER, M. SCOOT, M. P., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P. 2007. *Molecular Cell Biology*. 6th ed. W. H. Freeman. New York. p. 973. ISBN: 0716776014.
- LOWICKA, E., BELTOWAKI, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*. 59 (1). 4–24.
- MASUI, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation*. 69 (1). 1–17.
- MAULEON, P. 1977. Ovarian development in young mammals. In: CRIGHTON, D. B. (eds.). *Control of Ovulation*. Butterworth. London. p. 141–158. ISBN: 0-408-70924-3.

- MEHLMANN, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocyte: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791–799.
- MELOCHE, S., POUYSSÉGUR, J. 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. 26 (10). 3227–3239.
- MOK, Y. Y. P., ATAN, M. S. B. M., YOKE PING, C. H., ZHONG JING, W., BHATIA, M., MOOCHHALA, S., MOORE, P. K. 2004. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *British Journal of Pharmacology*. 143 (7). 881–889.
- MOOR, R. M., WARNER, G. M. 1978. Regulation of oocyte maturation in mammals. In: CRIGHTON, D. B. (eds.). *Control of Ovulation*. Butterworth. London. p. 159–176. ISBN: 0-408-70924-3.
- MOTLIK, J., FULKA, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25 (1). 87–96.
- MOTLIK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P. 1997. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 49 (2). 461–469.
- MUSTAFA, A. K., GALLADA, M. M., SEN, N., KIM, S., MU, W., GAZI, S. K., BARROW, R. K., YANG, G., WANG, R., SNYDER, S. H. 2009a. H₂S signals through protein S-Sulfhydration. *Science Signalling*. 2 (96). 1–8.
- MUSTAFA, A. K., GADALLA, M. M., SNYDER, S. H. 2009b. Signaling by Gasotransmitters. *Science Signalling*. 2 (68). re2. doi:10.1126/scisignal.268re2.
- NAGAI, Y., TSUGANE, M., OKA, J-I., KIMURA, H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB Journal*. 18 (3). 557–559.

- NAKAMURA, Y., YAMAGATA, Y., SUGINO, N., TAKAYAMA, H., KATO, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67 (5). 1588–1592.
- NEVORAL, J., PETR, J., GELAUDE, A., BODART, J. F., KUČEROVÁ-CHRPOVÁ, V., SEDMÍKOVÁ, M., KREJČOVÁ, T., KOLBABOVÁ, T., DVOŘÁKOVÁ, M., VYSKOČILOVÁ, A., WEINGARTOVÁ, I., KŘIVOHLÁVKOVÁ, L., ŽALMANOVÁ, T., JÍLEK, F. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLOS ONE*. 9 (7). e99613. doi:10.1371/journal.pone.0099613.
- NEVORAL, J., ŽALMANOVÁ, T., ZÁMOSTNÁ, K., KOTT, T., KUČEROVÁ-CHRPOVÁ, V., BODART, J-F., GELAUDE, A., PROCHÁZKA, R., ORSÁK, M., ŠULC, M., KLEIN, P., DVOŘÁKOVÁ, M., WEINGARTOVÁ, I., VÍGHOVÁ, A., HOŠKOVÁ, K., KREJČOVÁ, T., JÍLEK, F., PETR, J. 2015. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation *in vitro*. *Nitric Oxide*. 51(1). 24–35.
- PACKER, A. I., CHANG HSU, Y., BESMER, P., BACHVAROVA, R. 1994. The Ligand of the *c-kit* Receptor Promotes Oocyte Growth. *Developmental Biology*. 161 (1). 194–205.
- PARK, J. Y., SU, Y. Q., ARIGA, M., LAW, E., JIN, S. L., CONTI, M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303 (5658). 682–684.
- PATEL, P., VATISH, M., HEPTINSTALL, J., WANG, R., CARSON, R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulfide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7 (10). 1–9.
- PEREZ, G. I., JURISICOVA, A., MATIKAINEN, T., MORIYAMA, T., KIM, M. R., TAKAI, Y., PRU, J. K., KOLESNICK, R. N., TILLY, J. L. 2005. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *FASEB Journal*. 19 (7). 860–862.
- PINCUE, G., ENZMANN, E. V., 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Medicine*. 62 (5). 665–675.

RASHMAN, N., BUCK, J., LEVIN L. R. 2013. pH sensing via bicarbonate-regulated “soluble” adenylyl cyclase (sAC). *Frontiers in Physiology*. 4 (343). 1-5.

ROBINSON, M. J., COBB, M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Cell Biology*. 9 (2). 180–186.

SADLER, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing. Baltimore. p. 414. ISBN: 978-80-247-2640-3.

SIDHU, R., SINGH, M., SAMIR, G., CARSON, R. J. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 88 (4). 198–203.

SLÁDEČEK, F. 1986. *Rozmnožování a vývoj živočichů: základy vývojové biologie*. 2. vyd. Academia. Praha. 487 s. ISBN: 21 088 86.

SNIJDER P. M., de BOER R. A., BOS, E. M., van den BORN J. C., RUIFROK W. P., VREESWIJK-BAUDOIN, I., van DIJK, M. C., HILLEBRANDS, J. L., LEU VENINK, H. G., van GOOR, H. 2013. Gaseous hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice partially independent from hypometabolism. *Plos One*. 8 (5): e63291. doi: 10.1371/journal.pone.0063291

SRILATHA, B., ADAIKAN, P. G., LI, L., MOORE, P. K. 2007. Hydrogen sulfide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *Journal of Sexual Medicine*, 4 (5). 1304.

SRILATHA, B., HU, L., ADAIKAN, G. P., MOORE, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*, 6 (7). 1875–1884.

STAR, R. A., NONOGUCHI, H., BALABAN, R., KNEPPER, M. A. 1988. Calcium and Cyclic Adenosine Monophosphate as Second Messengers for Vasopressin in the Rat Inner Medullary Collecting Duct. *The Journal of Clinical Investigation*. 81 (6). 1879–1888.

- STÁRKA, L. 2009. Sulfan – další plynný hormon? *Chemické listy*. 103 (1). 28–31.
- STORK, P. J. S., SCHMITT, J. M. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*. 12 (6). 258–266.
- SUGIURA, Y., KASHIBA, M., MARUYAMA, K., HOSHIKAWA, K., SASAKI, R., SAITO, K., KIMURA, H., GODA, N., SUEMATSU, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (5-6). 781–787.
- ŠMELCOVÁ, H., TICHOVSKÁ, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: A REVIEW. *Scientia agriculturae bohemia*. 42 (4). 188–198.
- TIAN, X. C., LONERGAN, P. JEONG, B., S. EVANS, A. C., YANG, X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 62 (1). 132–138.
- TOSTI, E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4 (26). 1–26.
- TOSTI, E., BONI, R., GALLO, A., SILVESTRE, F. 2013. Ion currents modulating oocyte maturation in animals. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 59 (2). 61–68.
- VALITUTTI, S., CASTELLINO, F., MUSIANI, P. 1990. Effect of sulfurous (thermal) water on T lymphocyte proliferative response. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 65. 463–468.
- VERLHAC, M. H., KUBIAK, J. Z., CLARKE, H. J., MARO, B. 1994. Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. 1017–1025.
- VON STETINA, J. R., ORR-WEAVER, T. L. 2011. Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*. 3 (10). 1–19.

- WANG, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*. 16 (13). 1792–1798.
- WANG, R. 2004. The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5 (4). 493–501.
- WASSARMAN, P. M. 1988. The Mammalian ovum. In: KNOBIL, E., NEIL, J. (eds.). 1988. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. p. 69–102.
- WOODRUFF, T., 2008. Making eggs: is it now or later? *Reproductive Biology*. 14 (11). 1190–1191.
- WU, L., WANG, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*. 57 (4). 585–630.
- YANG, G., SUN, X., WANG, R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB Journal*. 18 (14). 1782–1784.
- YANT, W. P. 1930. Hydrogen sulphide in industry: occurrence, effects, and treatment. *American Journal of Public Health*. 20. 598–608.
- ZANARDO, R. C. O., BRANCALEONE, V., DISTRURRI, E., FIORUCCI, S., CIRINO, G., WALLACE, J. L. 2006. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB Journal*. 20 (12). 2118–2120.
- ZHAO, K., JU, Y., LI, S., ALTAANY, Z., WANG, R., YANG, G. 2014. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO reports*. 15. 792–800.
- ZHAO, W., ZHANG, J., LU, Y., WANG, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*. 20 (21). 6008–6016.

ZUCKERMAN, S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress in Hormone Research*. 6. 63–108.