

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Ing. Kateřina Adámková
Katedra veterinárních disciplín

Analytické stanovení hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárním komplexu
prasete za účelem hodnocení kumulární expanze
Analytical assessment of hyaluronic acid in porcine cumulus-oocyte complexes
for the evaluation of cumulus expansion
autoreferát disertační práce

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Obecná zootechnika

Školitel: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.
VÚŽV v.v.i., Praha

Školitel specialista: Ing. Jan Nevorál, Ph.D.
Biomedicínské centrum Lékařské fakulty v Plzni, Karlova
Univerzita

Obhajoba disertační práce se koná dne: 17.5.2017 ve 14:00 hodin na Fakultě
agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU v Praze.

P r a h a 2017

Summary

A sufficient number of successfully *in vitro* matured oocytes, enclosed in cumulus cells and creating a cumulus-oocyte complex (COC), is key for advances in assisted reproduction. While oocyte maturation occurs, mucification of surrounding cumulus cells, called cumulus expansion, takes place simultaneously. Therefore, cumulus expansion is a significant regulating process of oocyte maturation.

Cumulus expansion consists of the enlargement of the extracellular matrix based on glycosaminoglycan synthesis, in particular hyaluronic acid (HA) (Nakayama et al. 1996). As such, general cumulus expansion intensity can be used as the biomarker for the aforementioned changes.

Visual evaluation of expanded COCs (Vanderhyden et al. 1990) or their area measurement (Daen et al. 1994) are still used for the evaluation of cumulus expansion. Nevertheless, these methods do not affect the three-dimensional structure of expanded cumuli and cannot uncover differences in HA synthesis after COC treatment. Therefore, the use of radioisotope-labelled HA precursors (Eppig 1980) or analytical assessment of HA by hyaluronidase-induced β -elimination (Volpi 2000) enable to utilize the mentioned advantages. Analytical methods of HA analysis are not being used, although more precise results of cumulus expansion can be determined in this way. Based on best knowledge, we hypothesized that introducing the HA analysis of *in vitro* cultured COCs can serve as a predictable marker of cumulus expansion and the corresponding stage of oocyte maturation.

The COCs were cultured in modified M199 medium for 8–48 h. The samples for the HA analysis were prepared on an 8-hour time scale, and HA retained in COCs was measured using a spectrophotometric method adapted for this purpose. We observed an increasing quantity of HA during the *in vitro* cultivation. A comparison with expanded COCs' classification or expansion area proved the proposed method of HA analysis is suitable for the evaluation of cumulus expansion *in vitro*. The next part of this study was focused on the testing of selected factors on cumulus expansion *in vitro* by HA analysis. Our findings consider the quantity of HA-expressed cumulus expansion to be a valuable marker of COC quality enabling an adequate oocyte meiotic stage estimation.

Obsah

| | |
|--|----|
| Přehled o současném stavu poznání..... | 1 |
| Vědecké hypotézy a cíle práce..... | 2 |
| Materiál a metody..... | 2 |
| Výsledky a diskuse..... | 5 |
| Závěr..... | 8 |
| Seznam použité literatury..... | 9 |
| Přílohy..... | 11 |
| Seznam publikací..... | 15 |

Přehled o současném stavu poznání

Limitujícím faktorem rozvoje reprodukčních biotechnologií je zisk dostatečného množství kvalitních vývojově kompetentních oocytů ve stádiu metafáze II. meiotického dělení. Řešení přináší studium meiotického zrání a kumulární expanze.

Kumulární expanze spočívá v produkci extracelulární matrix, zejména hyaluronové kyseliny (HA) (Nakayama et al., 1996). Vlivem kumulární expanze dochází postupně k přerušení komunikačních propojení mezi oocytem a kumulárními buňkami, což má za následek izolaci oocytu od regulačních faktorů z kumulárních buněk (Chen et al., 1990). Bylo prokázáno, že dostatečný počet vrstev kumulárních buněk spolu s adekvátní produkcí HA v průběhu expanze kumulují jsou klíčové pro úspěšné meiotické zrání oocytu, oplození a časný embryonální vývoj (Chen et al., 1993; Yokoo et al., 2010). Lze tak předpokládat, že HA je použitelným markerem kvality kumulární expanze a tak i kvality COCs, používaných v postupech reprodukčních biotechnologií (Han et al., 2006).

Významu kumulární expanze je již po dlouhou dobu využíváno pro hodnocení kvality COCs. Existuje několik způsobů hodnocení kumulární expanze, které lze rozdělit do dvou hlavních skupin: 1) první skupina zahrnuje metody založené na vizuálním hodnocení COCs, 2) druhá skupina se soustředí na stanovení obsahu HA. Mezi vizuální metody patří metoda subjektivní klasifikace COCs (Vanderhyden et al. 1990) a stanovení plochy expandovaného kumulátu Daen et al. (1994). Výhodou vizuálních metod je neinvazivní pracování COCs a možný sběr dat během kultivace *in vitro*. Nevýhoda pak spočívá především v subjektivním hodnocení COCs. Metody založené na měření obsahu HA využívají biologického poznatku, že v průběhu expanze kumulátu dochází k přibývání obsahu HA v COC. Řadí se sem metody radioaktivního označení prekurzorů syntézy HA (Eppig 1980; Nagyova et al., 1999), imunologická metoda ELISA (Kongtawelert et Ghosh, 1990), spektrofotometrické měření koncentrace štěpných produktů HA (Chen et al., 2005) nebo kapalinová chromatografie (Volpi, 2000). Analytické ne-izotopové metody měření HA nejsou doposud rutinně využívány pro hodnocení kumulární expanze COCs, přestože jsou ve srovnání s metodami vizuálními významně spolehlivější a přesnější. Jako nejvhodnější se v současné době jeví metoda analytického stanovení produktů β -eliminace pomocí spektrofotometrie. Tento postup se zdá být dostatečně přesný a současně ekonomicky příznivý tak, aby našel uplatnění v rutinním využití postupů asistované reprodukce i v základním biologickém výzkumu – např. pro

testování účinku látek ovlivňujících meiotické zrání oocytů (např. H₂S) nebo odhadu vlivu polutantů (např. BPS) na zrání oocytů *in vitro*.

Vědecké hypotézy a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že analytické stanovení hyaluronové kyseliny pomocí měření produktů β -eliminace v *in vitro* kultivovaných COCs může sloužit jako marker kumulární expanze, odpovídající stádiu meiotického zrání oocytu.

Hypotéza byla ověřena na základě testování dílčích cílů. Nejprve byla zavedena metoda analytického stanovení HA v COCs prasete, kdy byla stanovena vhodná kombinace média a enzymu s hyaluronidázovou aktivitou a optimalizována metoda spektrofotometrie. Dále byla ověřena detekce produktů β -eliminace, ověřena závislost obsahu HA na množství COCs a nakonec byla metoda spektrofotometrie porovnána s vizuálními metodami hodnocení kumulární expanze. Dalším cílem bylo otestovat vliv vybraných faktorů na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro* metodou spektrofotometrie. Testovány byly: gasotransmitter sulfan, česnekový derivát S-allyl cystein a endokrinní disruptor bisfenol S.

Materiál a metody

Měření polymeru HA a standardů oligomerů HA pomocí spektrofotometrie a HPLC

Ke stanovení obsahu HA byla provedena enzymatická digesce HA polymeru prostřednictvím β -eliminace glykosidické vazby specifickou hyaluronidázou ze *Streptomyces hyalurolyticus* (SHH) (Vanderhyden, 1993). Při této chemické reakci je HA polymer enzymaticky štěpen na dimery (HA₂) a další oligomery HA obsahující ve své struktuře dvojné vazby. Současně byly analyzovány standardy HA oligomerů (Contipro Group s.r.o., Czech Republic): tetramery (HA₄), hexamery (HA₆), oktamery (HA₈) a dekamery (HA₁₀). Oligomery HA byly detekovány spektrofotometrickým proměřením v ultrafialovém (UV) absorpčním spektru. Vzorky byly spektrofotometricky měřeny v kyvetách Einmal-Küvetten, UV-Küvette mikro (7592 00, Plastibrand) na přístroji Helios Gamma (Spectronic, Thermo Fisher Sci) při vlnové délce 216 nm proti blanku, který sestával z příslušného média a enzymu, bez obsahu HA.

Současně byla provedena analýza pomocí HPLC. HPLC analýza byla provedena na přístroji UltiMate 3000 (Thermo, USA), vybaveném automatickým odběračem vzorků (10 °C), kolonou (35 °C) a PDA detektorem (nastavený při vlnových délkách 210 a 235 nm). Objem vstříkovaní 25 μ l, průtok mobilní fáze 1,5 ml/min, celková doba chodu 40 min.

Separace analytu byla provedena na Shodexové koloně (IEC QA-825) za využití gradientu eluce. Mobilní fáze sestávala z A) 0,02 M roztoku sodium chloridu a vody a B) 0,25 M roztoku sodium chloridu a vody. Gradient byl následující: 0 min – 100 % A, 25 min 24 % A, 26-32 min – 100 % B, re-ekvilibrace 33-40 min 100 % A. V obou případech byla použita polynomická osmi-bodová kalibrační křivka (od 7 µl/ml do 1000 µl/ml).

***In vitro* kultivace COCs a hodnocení meiotického zrání oocyty**

COCs byly odebírány z ovariálních folikulů o rozměru 2 – 5 mm aspirací 20-G jehlou. Zrání COCs probíhalo v modifikovaném mediu M199 (Sigma-Aldrich), obohaceném o 32,5 mM sodium bikarbonát; 2,75 mM kalcium L-laktát; 0,025 mg/ml gentamicin; 6,3 mM HEPES; 13,5 iu eCG; 6,6 iu hCG/ml (P.G.600; Intervet International B.V., Boxmeer, Holandsko) a 5% (v/v) fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich). Kultivace COCs probíhala 0 – 48 hod. v 4-jamkových Petriho miskách (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) obsahujících 1,0 ml kultivační média, při 39 °C ve směsi 5,0% CO₂ ve vzduchu.

Experimentální skupiny byly ošetřeny inhibitory sulfan uvolňujících enzymů, česnekovým derivátem SAC a endokrinním disruptorem bisfenolem S (BPS). Jako inhibitory sulfan uvolňujících enzymů byly použity v trojkombinaci (3Ci) kyselina oxamová (2,0 mM), DL-propargylglycin (2,0 mM) a kyselina α-ketoglutarová (5,0 mM), inhibující specificky CBS, CTH a 3-MPST. Použitý česnekový derivát SAC byl testován v koncentracích 0,1 mM; 0,5 mM a 1,0 mM. Endokrinní disruptor BPS byl testován v koncentracích 3,0 nM; 300 nM a 30 µM.

Po ukončení kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk, montovány na mikroskopická sklíčka a fixována v ethanolu a kyselině octové (3:1, v/v). Oocyty byly obarveny 1,0% roztokem orceinu a stádium meiotického zrání bylo vyhodnoceno pod mikroskopem s fázovým kontrastem podle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1976): GV – zárodečný váček, LD – pozdní diakineze, MI – metafáze I, AITI – přechod anafáze I do telofáze I, MII – metafáze II.

Klasifikace expandovaného kumulu

Kumulární expanze byla vizuálně hodnocena pomocí subjektivního 5 – stupňového systému podle Vanderhyden et al. (1990). Stupně 0 až +4 korespondují se zvyšující se intenzitou expanze. Stupeň 0 indikuje stádium bez pozorovatelné expanze, +1 indikuje minimální pozorovatelnou expanzi, +2 expanzi rozšířenou v několika vrstvách, +3 kompletní expanzi kromě vrstvy *corona radiata*, a +4 kompletní expanzi zahrnující vrstvu *corona radiata*. Data byla vyjádřena jako procentuální část z populace COCs.

Měření plochy COCs

Pro měření plochy expandovaného kumulu byl použit postup publikovaný Daen et al. (1994) s provedenými modifikacemi. Za využití monochromatické CCD kamery (ProgRea CT1, Jenoptik, Německo) se softwarem NIS Elements (Laboratory Imaging, Česká republika) byly každých 8 hod. zhotoveny snímky stejných skupin COCs (25x COCs/skupina). Následně byla provedena analýza obrazu za využití prahování a měření plochy 25 COCs. Data byla vyjádřena relativně k COCs po 48 hodinové kultivaci.

Zpracování expandovaného kumulu a izolace HA

Skupiny po 25 COCs byly kultivovány v 1 ml kultivačního média M199, za výše uvedených podmínek, v časovém intervalu od 0 do 48 hod. Po ukončení kultivace byly COCs 4x propláchnuty v 500 μ l PBS-PVA a oocyty byly odděleny mechanicky opakovaným pipetováním v průběhu posledního proplachu. Ke stanovení zadržené HA v expandovaném kumulu byly expandované kumuly přeneseny do mikrozkuřavky v 500 μ l PBS-PVA a následně enzymaticky štěpeny za využití hyaluronidázy ze *Streptomyces hyalurolyticus* (SHH, 2 iu/ml, Sigma), při 39 °C přes noc. Vzorky zadržené HA v COCs byly uchovávány při -20 °C do proměření. Po spektrofotometrické analýze byla syntéza HA vyjádřena jako koncentrace HA (μ g/ml) v získaném roztoku.

Statistická analýza

Všechny experimenty byly zopakovány nejméně třikrát. Data byla analyzována postupem obecných lineárních modelů (GLM – General Linear Models) v softwaru SAS (Statistical Analysis System, Version 9.3, 2012). Významné rozdíly mezi skupinami byly stanoveny pomocí t-testu a Sheffeho testu. Hladina významnosti byla stanovena na $P < 0,05$.

Výsledky a diskuse

1 Zavedení analytické metody spektrofotometrie a její porovnání s metodami vizuálními

1.1 Testování enzymů s hyaluronidázovou aktivitou v odlišných médiích a optimalizace vlnové délky pro spektrofotometrické měření

Spektrofotometrickým proměřením bylo určeno optimální médium pro digesci lyázy ze *Streptomyces hyalurolyticus* (SHH) a optimální vlnová délka pro spektrofotometrickou analýzu s maximálním výnosem absorbance. Jako optimální médium byl určen fosfátový pufr PBS, popř. PBS obohacené o 0,01% PVA, které je z hlediska manipulace s COCs výhodnější. Ke štěpení polymeru HA byla použita lyáza produkovaná *Streptomyces hyalurolyticus* (SHH) (Eppig, 1980; Vanderhyden, 1993), která k enzymatické digesci využívá chemické reakce β -eliminace za vzniku dvojných vazeb. Pouze dvojně vazby v dimerech a oligomerech HA vzniklé štěpením SHH jsou schopné absorpce v UV oblasti (Alkrad *et al.*, 2003). Naopak, za zcela nevhodnou byla označena hyaluronidáza izolovaná z bovinních testis, která štěpí polymer HA hydrolyticky, kdy nedochází k vzniku dvojně vazby (Saitoh *et al.*, 1995). Následně byla kombinace SHH-PBS použita pro přípravu standardů, které byly proměřeny v rozmezí 190-280 nm pro zjištění optimální vlnové délky. Optimální vlnová délka v našich laboratorních podmínkách byla stanovena na 216 nm a následně použita v dalších experimentech. Současně byl stanoven detekční limit spektrofotometrie, absorbance rovna ~ 0.13 , kdy 60 $\mu\text{g/ml}$ HA polymeru byla určena jako minimální koncentrace pro detekci produktů β -eliminace.

1.2 Měření standardů roztoku HA polymeru a jeho oligomerů

Pro ověření, že je při spektrofotometrické analýze detekován štěpený HA polymer, byly použity oligomery HA (4HA – 10HA). Získaná data potvrzují předešlá měření polymeru HA po digesci SHH jako výsledek přítomnosti produktů β -eliminace se srovnatelnou absorbancí. Při spektrofotometrické analýze štěpných produktů HA po digesci SHH byly zjištěny nižší hodnoty absorbance ve srovnání se standardy neštěpených oligomerů 4 – 6 HA. Vysvětlením může být, že při digesci HA polymeru prostřednictvím SHH dochází k mírným ztrátám oproti neštěpeným polymerům o délce 4 – 6 HA opakovaní nebo nižší efektivita lyázy SHH ve štěpení oligomerů, kdy většina štěpných produktů zůstává v délce 8 – 10 HA.

1.3 Závislost množství HA na počtu COCs ve vzorku

Cílem experimentu bylo ověřit, zda je HA v COCs prasete výše popsanou metodou měřitelná a použitelná jako spolehlivý ukazatel kumulární expanze. Pro tento účel byly použity vzorky s různým počtem COCs (15, 25, 50). Tímto experimentem byla prokázána

závislost koncentrace HA na množství COCs, kdy HA zadržena v COCs byla signifikantně zvýšena ve vzorcích obsahujících 50 COCs. Ačkoliv mezi vzorky obsahujícími 15 a 25 COCs nebyly v obsahu HA pozorovány statisticky významné rozdíly, vzorky s 25 COCs poskytují přesnější analýzu s ohledem na variabilitu COCs. Uvedené výsledky dokazují, že použitá metoda je schopná analyzovat nejen chemicky čistý produkt HA, ale rovněž HA izolovanou z biologické matrice, kterou je v tomto experimentu prasečí COCs, připravené v již dříve ověřeném pufru PBS-PVA. Výsledek experimentu dokázal, že produkty spektrofotometrického měření po digesci HA odpovídají produktům β -eliminace, které v reálných vzorcích COCs odrážejí obsah HA.

1.4 Porovnání jednotlivých metod hodnocení kumulární expanze

V našich experimentech byla porovnávána HA analýza s běžně používanými metodami hodnocení kumulární expanze – subjektivní klasifikací COCs (podle Vanderhyden *et al.*, 1990) a měřením plochy expandovaného kumulu (podle Daen *et al.*, 1990) (viz. Příloha 1). Všechny použité metody prokázaly narůstající trend v průběhu *in vitro* kultivace COCs. Klasifikace kumulu a měření plochy prokázaly první signifikantní nárůst po 16-ti hodinách kultivace. Naproti tomu nebyl detekován rozdíl v obsahu HA a signifikantní nárůst nebyl naměřen ani mezi 16 a 24 hod. Signifikantní nárůst v produkci HA byl pozorován mezi 40 – 48 hod., kdy metody klasifikace kumulu a měření plochy rozdíly nezaznamenaly. Současně byla provedena kontrola meiotického zrání oocytů, kdy byl pozorován jeho standardní průběh. Jako nejvíce konzistentní se jeví metoda měření plochy expandovaného kumulu. Na druhou stranu tato neinvazivní jednoduchá metoda není schopna postihnout trojrozměrnou strukturu expandovaného kumulu, která může být v průběhu *in vitro* kultivace ovlivněna řadou sloučenin. Trojrozměrnou strukturu COCs respektují metody založené na měření komponent expandovaného kumulu, často nejhojněji zastoupenou HA. Metoda analytického stanovení HA prostřednictvím spektrofotometrie spojuje výhody metod založených na měření obsahu GAGs, čili objektivní hodnocení kumulární expanze, které je schopno postihnout 3D strukturu expandovaného kumulu. Současně odstraňuje jejich hlavní nevýhody, které spočívají zejména v práci s radioaktivním materiálem.

2 Testování vybraných faktorů na průběh kumulární expanze *in vitro*

Po vývoji a ověření spektrofotometrické metody analýzy štěpných produktů HA byla metoda zavedena do experimentů, studujících signální molekuly gasotrasmiterů, látky s potenciálně pozitivním účinkem stejně jako polutanty ohrožující kvalitu COCs a oocytů (viz. Příloha 2).

2.1 Vliv gasotransmiteru sulfanu na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*

V případě inhibice endogenní produkce sulfanu byl pozorován statisticky významný pokles v produkci HA o 33,5 % (viz Obr.2A). Současně byl pozorován statisticky významný pokles počtu oocytů schopných dosáhnout stádia metafáze II, přechodu anafáze I / telofáze I i metafáze I po 48 hod. kultivace (viz Tab. 2A). Je známo, že meiotické zrání může být urychleno dřívějším vzestupem hladin MPF a MAKP (Kubelka *et al.*, 2000). Akcelerace aktivity MPF a MAPK společně se zrychleným *in vitro* zráním oocytů po aplikaci donoru H₂S byla popsána na prasečích oocytech (Nevoral *et al.*, 2014). Doposud nebyl prokázán přímý efekt H₂S na MPF a MAPK a přesný mechanismus účinku H₂S na MPF a MAPK není znám. Bylo popsáno, že H₂S ovlivňuje řadu faktorů prostřednictvím jejich přímé sulfhydratace (Mustafa *et al.*, 2009). Lze předpokládat, že H₂S působí na MPF a MAPK nepřímo prostřednictvím jiných molekul, např. iontových kanálů (Tang *et al.*, 2010) nebo nadřazených kináz (Hu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010), a že sulfhydratace těchto proteinů může následně ovlivňovat meiotické zrání oocytu. U somatických buněk byl popsán stimulační efekt H₂S na signální dráhy cAMP/PKA (Njie-Mbye *et al.*, 2012) a PI3K/Akt (Huang *et al.*, 2010), o kterých je známo, že se rovněž účastní regulace zrání oocytu (Wassarman, 1988; Kalous *et al.*, 2009).

2.2 Vliv česnekového derivátu S-allyl cysteinu na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*

Česnekové deriváty jsou známy svými antioxidačními účinky na živočišné buňky (Banerjee *et al.*, 2001), ve kterých vycytávají volné radikály (Prasad *et al.*, 1996). Mechanismus působení česnekových derivátů spočívá pravděpodobně v jejich zapojení do signálních kaskád produkce sulfanu. V experimentech provedených na somatických buňkách bylo prokázáno, že česnekové deriváty stimulují aktivitu sulfan produkujících enzymů a tím produkci H₂S, který následně působí antioxidačně a antiapoptoticky (Louis *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). V našich experimentech nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu HA v COCs ani v meiotickém zrání oocytů po ošetření SAC (viz. Obr.2B). Dvořáková *et al.* (2016) rovněž popisuje, že SAC neovlivňuje MFP ani MAPK.

2.3 Vliv endokrinního disruptoru Bisfenolu S na kumulární expanzi COCs *in vitro*

V případě *in vitro* zrání došlo u všech testovaných koncentrací BPS ke statisticky významnému snížení počtu oocytů schopných dosáhnout MI fáze po 24 hod. kultivace a MII fáze po 48 hod. kultivace (viz Tab 2C). Naopak v případě hodnocení kumulární expanze výsledky prokázaly, že BPS je schopen zvýšit množství zadržené HA v COCs (viz obr. 2C).

Tento efekt byl pozorován po 24 i 48 hodinové kultivaci *in vitro* v koncentraci 300 nM BPS. Je známo, že BPS je schopen v organismu napodobovat účinky estrogenů (Michalowicz et al., 2015). V případě myších oocytů bylo popsáno, že 17 β -estradiol je zodpovědný za adekvátní expanzi kumulu a rovněž expresi normální hladiny mRNA pro hyaluronan-syntetizující enzym HAS2 *in vitro* (Sugiura et al., 2010). Lze předpokládat, že prostřednictvím estrogenního efektu BPS dochází ke stimulaci hyaluronan-syntetizujících enzymů a tím ke stimulaci produkce HA.

Závěr

Cílem disertační práce bylo ověřit hypotézu, že hyaluronová kyselina (HA) je markerem kumulární expanze odpovídající stádiu meiotického zrání a kvalitě oocytu. Pro tento účel byla vyvinuta metoda analytického stanovení HA v kumulo-oocytárních komplexech savců. Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení koncentrace štěpných produktů β -eliminace HA, přičemž byla následně ověřena a zavedena do experimentů.

V průběhu testování vlivu vybraných faktorů na kumulární expanzi prasečích COCs spektrofotometrickou metodou bylo zjištěno, že gasotransmitter sulfan je zapojen jak v procesu meiotického zrání, tak kumulární expanze *in vitro*. Inhibice endogenní produkce sulfanu snižuje kumulární expanzi a rovněž zpomaluje *in vitro* zrání oocytů. Naopak česnekový derivát S-allyl cystein nemá na kumulární expanzi ani na *in vitro* zrání oocytů vliv. V případě endokrinního disruptoru BPS došlo k inhibici meiotického zrání oocytu a zároveň ke zvýšení množství HA v průběhu kumulární expanze. Lze předpokládat, že v tomto případě se uplatnila estrogenní aktivita BPS, která vedla ke stimulaci hyaluronan-syntetizujících enzymů a následně k navýšení množství HA v COCs.

Bylo zjištěno, že metoda spektrofotometrického stanovení HA v COCs odráží skutečný obsah HA v reálných vzorcích COCs, může sloužit jako marker meiotického zrání oocytů a představuje vhodnou metodu pro hodnocení kumulární expanze prasečích COCs *in vitro*. Výsledky práce ukazují, že spektrofotometrická metoda stanovení produktů β -eliminace představuje přesnou a vhodnou metodu pro hodnocení kumulární expanze, která nabízí využití nejen pro základní vědecký výzkum, ale také praktické využití pro šlechtění a asistovanou reprodukci, kde zajistí kvalitativní selekci oocytů pro biotechnologické postupy.

Seznam použité literatury

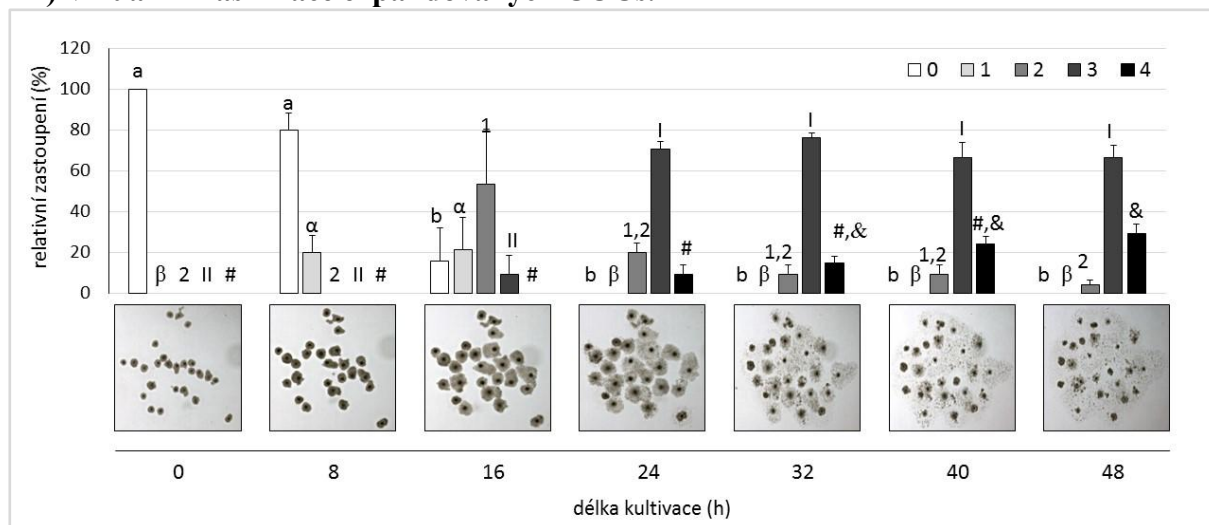
- Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S., Neubert, R. 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 31(3). 545–50.
- Banerjee, S. K., Maulik, M., Manchanda, S. C., Dinda, A. K., Das, T. K., Maulik, S. K. 2001. Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food and chemical toxicology*. 39(8). 793-97.
- Daen, F. P., Sato, E., Naito, K., Toyoda, Y. 1994. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. 101(3). 667-73.
- Dvořáková, M., Heroutová, I., Němeček, D., Adámková, K., Krejčová, T., Nevoral, J., Kučerová-Chrpová, V., Petr, J., Sedmíková, M. 2016. The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ*, 4, e2280.
- Eppig, J. J. 1980. Role of FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biology of Reproduction*. 22(3). 629-33.
- Han, Z. B., Lan, G. C., Wu, Y. G., Han, D., Feng, W. G., Wang, J. Z., Tan, J. H. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus–oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*. 132(5). 749-58.
- Hu, Y., Chen, X., Pan, T. T., Neo, K. L., Lee, S. W., Khin, E. S. W., Bian, J. S. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 455(4). 607-16.
- Huang, Y., Li, F., Tong, W., Zhang, A., He, Y., Fu, T., Liu, B. 2010. Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of interstitial cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein kinase. *Tohoku journal of experimental medicine*. 221(2).
- Chen, L. Y., Chen, Q., Zhu, X. J., Kong, D. S., Wu, L., Shao, J. J., Zheng, S. Z. 2016. Diallyl trisulfide protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis via a hydrogen sulfide-mediated mechanism. *International immunopharmacology*. 36. 23-30.
- Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*. 34(1). 87-93.
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., Larsen, W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*. 26(3). 236-47.
- Chen, Q., Li, X. L., Liu, Q., Jiano, Q. C., Cao, W. G., Wan, H. 2005. Investigation the binding interaction of azur A with hyaluronic acid via spectrophotometry and its analytical application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382(7). 1513-519.
- Kalous, J., Kubelka, M., Šolc, P., Šušor, A., Motlík, J. 2009. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction*. 138(4). 645-54.
- Kongtawelert, P., Ghosh, P. 1990. A method for the quantification of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Analytical Biochemistry*. 185(2). 313-18.
- Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I Reversibly Inhibits Meiotic Maturation of Bovine Oocytes, Without Influencing Chromosome Condensation Activity 1. *Biology of Reproduction*. 62(2). 292-302.

- Louis, X. L., Murphy, R., Thandapilly, S. J., Yu, L., Netticadan, T. 2012. Garlic extracts prevent oxidative stress, hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes: a role for nitric oxide and hydrogen sulfide. *BMC complementary and alternative medicine*. 12(1). 140.
- Michałowicz, J., Mokra, K., Bąk, A. 2015. Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicology in Vitro*. 29(7). 1464-72.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198(2). 155–62.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Snyder, S. H. 2009. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Science signaling*. 2(96). 72.
- Nagyová, E., Procházka, R., Vanderhyden, B. C. 1999. Oocyctectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biology of reproduction*. 61(3). 569-74.
- Nakayama, T., Inoue, M., Sato, E. 1996. Effect of oocyctectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 55(6). 1299-1304.
- Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J. F., Kučerová-Chrpová, V., Sedmikova, 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.
- Njie-Mbye, Y. F., Kulkarni, M., Opere, C. A., Ohia, S. E. 2012. Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research*. 98. 16-22.
- Prasad, K., Laxdal, V. A., Yu, M., Raney, B. L. 1996. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Molecular and cellular biochemistry*. 154(1). 55-63.
- Saitoh, H., Takagaki, K., Majima, M., Nakamura, T., Matsuki, A., Kasai, M., Endo, M. 1995. Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase. *Journal of Biological Chemistry*. 270(8). 3741-47.
- Sugiura, K., Su, Y. Q., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M., Eppig, J. J. 2010. Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. *Molecular Endocrinology*. 24(12). 2303-14.
- Tang, G., Wu, L., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37(7). 753-63.
- Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., Buccione, R., Eppig, J. J. 1990. Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Developmental biology*. 140(2). 307-17.
- Volpi, N. 2000. Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by High-Performance Liquid Chromatography and fluorometric detection with dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*. 277(1). 19-24.
- Wassarman, P. M. 1988. *The Mammalian Ovum In: The Physiology of Reproduction*. eds. Knobil E. a Neill J., Raven Press Ltd., New York. 69-102.
- Yokoo, M., Kimura, N., Sato, E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journals of Reproduction and Development*. 56 (1). 15-19.

Přílohy

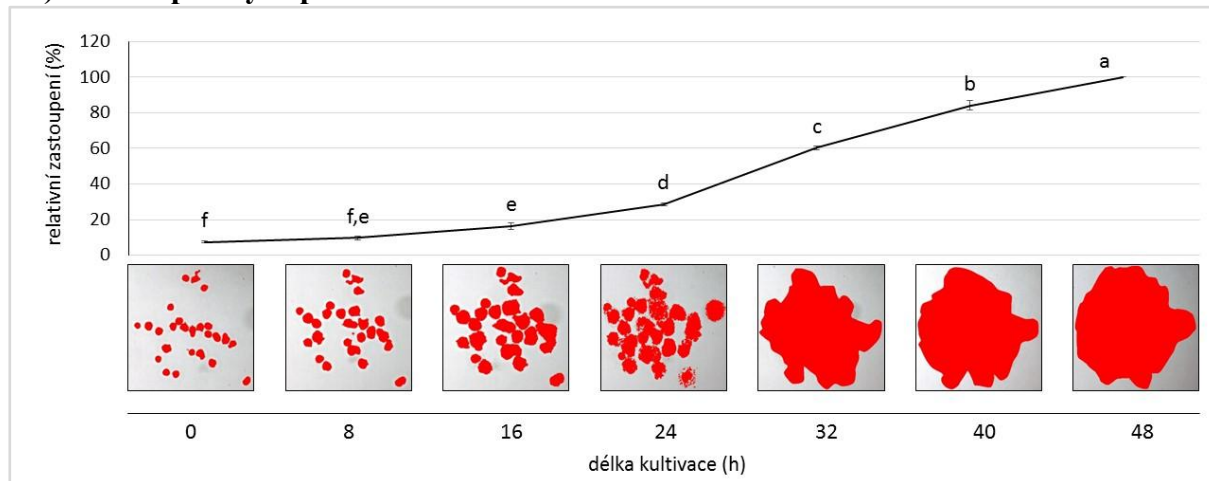
Příloha 1: Porovnání jednotlivých metod hodnocení kumulární expanze.

1A) Vizuální klasifikace expandovaných COCs.



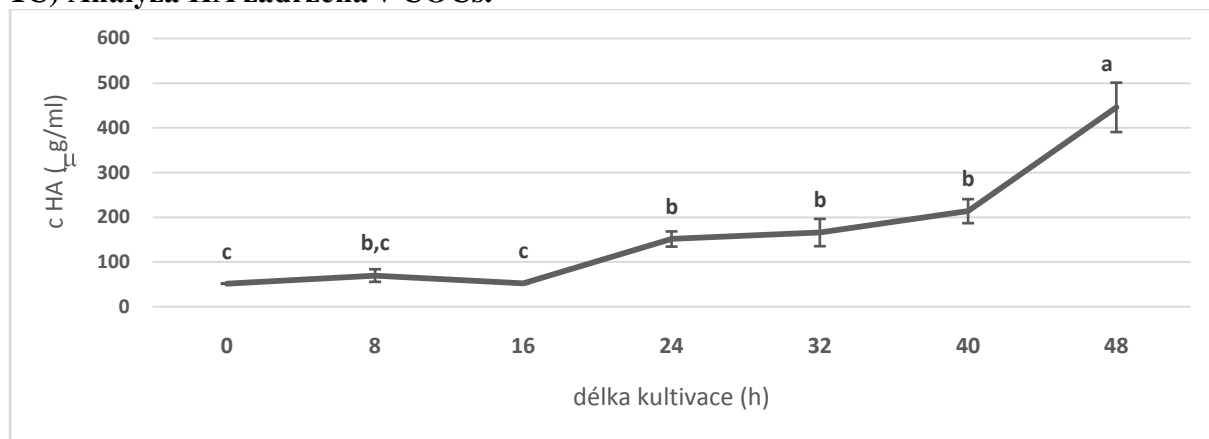
Obrázek 1A) Vizuální klasifikace expandovaných COCs bylo provedeno v 8-hodinových intervalech po dobu 48 hod (stupeň 0 = bez pozorovatelné expanze, +1 = minimální pozorovatelná expanze, +2 = expanze rozšířená v několika vrstvách, +3 = kompletní expanze mimo vrstvy corona radiata, +4 = kompletní expanze včetně vrstvy corona radiata. Současně jsou uvedeny reprezentativní obrázky jednotlivých časových intervalů. Data jsou vyjádřena jako procentuální část populace COCs, sloupce ukazují průměr 3 nezávislých experimentů \pm SEM; ^{a,A;1,I;□□□#&} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

1B) Měření plochy expandovaného kumulu.



Obrázek 1B) Měření plochy expandovaného kumulu bylo provedeno v 8-hodinových intervalech po dobu 48 hod. Současně jsou uvedeny reprezentativní obrázky prahových hodnot COCs jednotlivých časových intervalů. Data jsou vztahena k COCs po 48-hodinové kultivaci (100 %), body ukazují průměry 3 nezávislých experimentů \pm SEM; ^{a,b,c,d,e,f} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

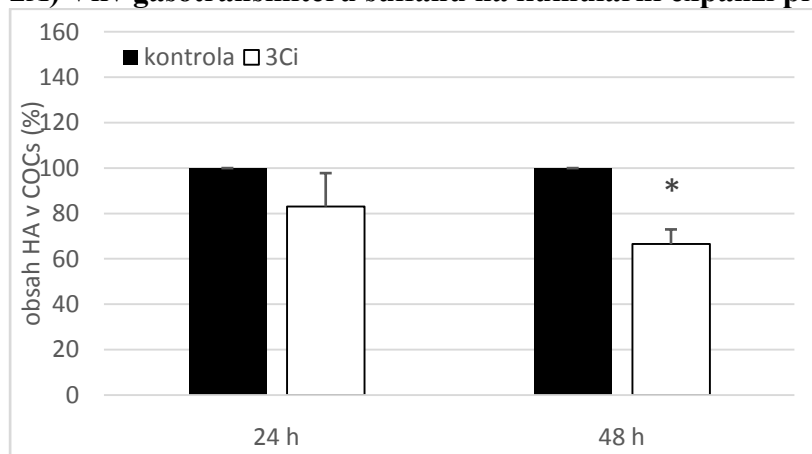
1C) Analýza HA zadržaná v COCs.



Obrazek 1C) Analýza HA zadržaná v COCs byla provedena v 8-hodinových intervalech po dobu 48 hod. Vzorky COCs byly připraveny za použití digesce SHH v PBS-PVA, přes noc. Absorbance byla měřena při vlnové délce 216 nm a koncentrace HA ($\mu\text{g/ml}$) ve vzorcích byla spočítána za využití polynomické křivky HA standardů, štěpených za stejných podmínek. Body ukazují průměry 3 nezávislých experimentů \pm SEM; ^{a,b,c} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Příloha 2: Testování vybraných faktorů na průběh kumulární expanze *in vitro*.

2A) Vliv gasotransmiteru sulfanu na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.



Obrazek 2A) Efekt trojkombinace inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů na produkci HA v průběhu kumulární expanze.

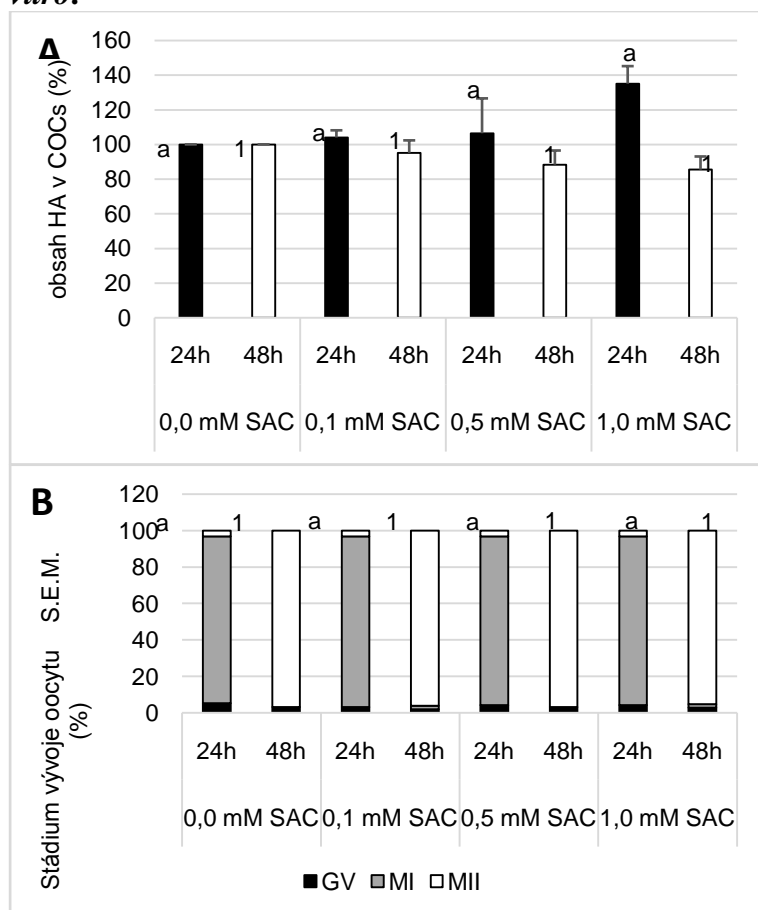
Obsah HA byl měřen jako marker kumulární expanze po 24 a 48 hod. kultivace. COCs byly kultivovány v přítomnosti trojkombinace inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů – 2,0 mM kyselina oxamová, 2,0 mM DL-propargylglycin a 5,0 mM kyselina α -ketoglutarová. Absorbance byla měřena při vlnové délce 216 nm a koncentrace HA ($\mu\text{g/ml}$) ve vzorcích byla spočítána za využití polynomické křivky HA standardů, štěpených za stejných podmínek. Výsledek byl vyjádřen relativně ke kontrole neošetřených MI a MII oocytů. Sloupce ukazují průměr 3 nezávislých experimentů \pm SEM; *superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Tabulka 2A) Efekt trojkombinace inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů na meiotické zrání prasečích oocytů po 48 hod. kultivace *in vitro*.

| | kontrola | trojkombinace inhibitorů |
|--------------|-------------------------|---------------------------|
| GV | - | - |
| LD | - | - |
| MI | 0,5 ± 1,1 ^a | 20,8 ± 5,2 ^{b,c} |
| AITI | 4,8 ± 1,9 ^a | 14,2 ± 1,4 ^d |
| MII | 94,7 ± 1,4 ^a | 65,0 ± 5,0 ^d |
| počet | 120 | 120 |

Výsledky meiotického zrání oocytů ošetřených trojkombinací inhibitorů sulfan uvolňujících enzymů (2 mM propargylglycin + 2 mM oxamová kys. + 5 mM α -ketoglutarová.) a kontroly po 48 hod. kultivace. GV = zárodečný váček, LD = pozdní diakineze, MI = metafáze I, AI/TI = přechod anafáze I / telofáze I, MII = metafáze II. Data jsou vyjádřena jako procentuální zastoupení jednotlivých stádií meiózy a představují průměry minimálně tří nezávislých experimentů ± SEM, ^{a,b,c,d} odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

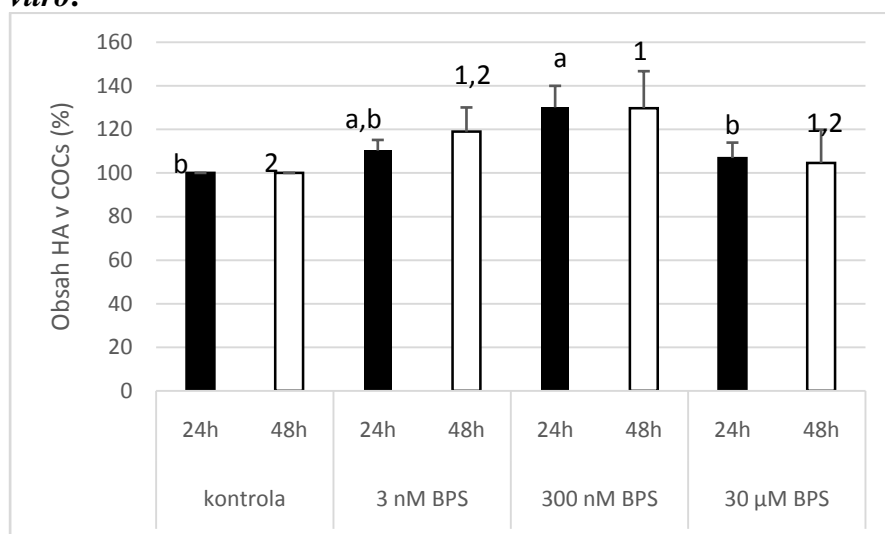
2B) Vliv česnekového derivátu S-allyl cysteinu na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.



Obrázek 2B) Efekt SAC na kumulární expanzi a meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*.

(A) COCs byly kultivovány v přítomnosti SAC o koncentracích 0,1 mM; 0,5 mM a 1,0 mM. Absorbance byla měřena při vlnové délce 216 nm a koncentrace HA ($\mu\text{g/ml}$) ve vzorcích byla spočítána za využití polynomické křivky HA standardů, štěpených za stejných podmínek. Výsledek byl vyjádřen relativně ke kontrole neošetřených MI a MII oocytů. Sloupce ukazují průměr 3 nezávislých experimentů ± SEM; ^{a,1;2} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). (B) Efekt SAC na jaderné zrání prasečích oocytů po 24 a 48 hod. kultivaci *in vitro*. GV = zárodečný váček, MI = metafáze I, MII = metafáze II. Sloupce ukazují průměr 3 nezávislých experimentů ± SEM; ^{a,1;2} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

2C) Vliv endokrinního disruptoru bisfenolu S na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.



2C) Efekt BPS na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.

Efekt BPS na produkci HA v COCs prasete po 24 a 48 hod. kultivace *in vitro*. COCs byly kultivovány v přítomnosti BPS o koncentracích 3,0 nM; 300 nM a 30 µM. Vzorky byly připraveny za použití digesce SHH v PBS-PVA, přes noc při teplotě 39°C v humidované atmosféře. Absorbance byla měřena při vlnové délce 216 nm a koncentrace HA (µg/ml) ve vzorcích byla spočítána za využití polynomické křivky HA standardů, štěpených za stejných podmínek. Výsledek byl vyjádřen relativně ke kontrole neošetřených MI a MII oocytů. Sloupce ukazují průměr 3 nezávislých experimentů ± SEM; ^{a,1; b,2} odlišné superskripty značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Tabulka 2C₁) Efekt BPS na meiotické zrání prasečích oocytů po 24 hod. kultivace *in vitro*.

| | kontrola | 3 nM | 300 nM | 30 µM |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GV | - ^a | - ^a | 14,2 ± 0,5 ^b | 17,5 ± 0,5 ^c |
| LD | - ^a | 21,7 ± 0,6 ^b | 16,7 ± 0,6 ^b | 19,2 ± 0,8 ^b |
| MI | 100 ± 0,0 ^a | 78,3 ± 0,6 ^b | 69,2 ± 0,9 ^c | 63,3 ± 0,9 ^d |
| AITI | - | - | - | - |
| MII | - | - | - | - |
| počet | 120 | 120 | 120 | 120 |

Výsledky meiotického zrání oocytů ošetřených BPS (3,0 nM; 300 nM a 30 µM) a kontroly po 24 hod. kultivace. GV = zárodečný váček, LD = pozdní diakineze, MI = metafáze I, AI/TI = přechod anafáze I / telofáze I, MII = metafáze II. Data jsou vyjádřena jako procentuální zastoupení jednotlivých stádií meiózy a představují průměry minimálně tří nezávislých experimentů ± SEM, ^{a,b,c,d} odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Tabulka 2C₂) Efekt BPS na meiotické zrání prasečích oocytů po 48 hod. kultivace *in vitro*.

| | kontrola | 3 nM | 300 nM | 30 µM |
|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GV | - | - | - | - |
| LD | - | - | - | - |
| MI | - ^a | 5,8 ± 0,5 ^b | 13,3 ± 0,4 ^c | 36,7 ± 0,4 ^d |
| AITI | - ^a | 2,5 ± 0,5 ^a | - ^a | - ^a |
| MII | 100 ± 0,0 ^a | 91,7 ± 0,5 ^b | 86,7 ± 0,4 ^c | 63,3 ± 0,4 ^d |
| počet | 120 | 120 | 120 | 120 |

Výsledky meiotického zrání oocytů ošetřených BPS (3,0 nM; 300 nM a 30 µM) a kontroly po 48 hod. kultivace. GV = zárodečný váček, LD = pozdní diakineze, MI = metafáze I, AI/TI = přechod anafáze I / telofáze I, MII = metafáze II. Data jsou vyjádřena jako procentuální zastoupení jednotlivých stádií meiózy a představují průměry minimálně tří nezávislých experimentů ± SEM, ^{a,b,c,d} odlišná písmena značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Seznam publikací

Recenzované publikace s impact faktorem

- Zámostná, K., Nevoral, J., Kott, T., Procházka, R., Orsák, M., Šulc, M., Pajkošová, V., Pavlík, V., Žalmanová, T., Hošková, K., Jílek, F., Klein, P. 2016. A simple method for assessing hyaluronic acid production by cumulus-oocyte complexes. *Czech Journal of Animal Science*, 61(6), 251-61.
- Nevoral, J., Žalmanová, T., Zámostná, K., Kott, T., Kučerová-Chrpová, V., Bodart, J. F., Gelaude, A., 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, 24-35.
- Dvořáková, M., Heroutová, I., Němeček, D., Adámková, K., Krejčová, T., Nevoral, J., Kučerová-Chrpová, V., Petr, J., Sedmíková, M. 2016. The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ*, 4, e2280.
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Prokešová, Š., Zámostná, K., Kott, T., & Petr, J. (2016). Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution—a review. *Czech Journal of Animal Science*, 61(10), 433-49.
- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Adámková, K., Kott, T., Šulc, M., Kotíková, Z., Prokešová, Š., Jílek, F., Králíčková, M., Petr, J. 2017. Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 485.
- Bláha, M., Procházka, R., Adámková, K., Nevoral, J., Němcová, L. Prostaglandin E2 stimulates expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. (*In Press*).

Recenzované publikace

- Žalmanová, T., Hošková, K., Nevoral, J., Prokešová, Š., Zámostná, K., Kotíková, Z., & Petr, J. (2016). Story of Bisphenol S—Steps from Bad to Worse. *Anthropologia Integra*, 7(1).
- Nevoral, J., Orsák, M., Klein, P., Petr, J., Dvořáková, M., Weingartová, I., Vyskočilová, A., Zámostná, K., Krejčová, T., Jílek, F. (2014). Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and perspectives of measurement: A review. *Scientia agriculturae bohemica*, 45(4), 212-25.

Proceedings

- Nevoral, J., Šutovsky, P., Zámotná, K., Petelák, A., Hošková, K., Žalmanová, T., & Petr, J. (2015). SIRT1 as a key factor for histone code establishment in early embryo, from a perspective of assisted reproduction. *Slovak Journal of Animal Science*, 48(4), 145-58.
- Nevoral, J., Zámotná, K., Žalmanová, T., Kučerová-Chrpová, V., Dvořáková, M., Hošková, K., & Petr, J. (2015). Physiological production of hydrogen sulfide is involved in porcine oocytes maturing *in vitro*. *Nitric Oxide*, (47), S59-S60.

Užitné vzory

- Nevoral J, Petr J, Žalmanová T, Kott T, Weingartová I, Zámotná K, Dvořáková M, Křivohlávková L (2014): Kultivační medium pro zvýšení kvality savčích oocytů dozrálých v podmínkách *in vitro*. Užitný vzor, CZ 27174 U1, Česká zemědělská univerzita v Praze; Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.