

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Interakce enzymů uvolňujících sulfan v prasečích oocytech
během meiotického zrání**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Simona Jiříček Hasalová

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Hošková, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Interakce enzymů uvolňujících sulfan v prasečích oocytech během meiotického zrání" 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

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytoval během tvorby této práce, za možnost využívat školní laboratoř k provádění experimentů a v neposlední řadě za jeho vstřícný a přátelský přístup a nesmírnou ochotu a trpělivost.

Poděkování patří také Ing. Kateřině Zámostné za veškerou její pomoc a přátelský přístup.

Interakce enzymů uvolňujících sulfan v prasečích oocytech během meiotického zrání

Souhrn

Reprodukční biotechnologie v současné době představují významný vědní obor, který na základě dostatečného množství plnohodnotných oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách umožňuje nabývat na své efektivitě. Meiotické zrání představuje komplexní proces, na jehož regulaci se podílí široké spektrum faktorů, včetně malých plynných molekul, tzv. gasotransmiterů. Tyto plyny vykazují řadu fyziologických funkcí v organismu a posledním tímto objeveným gasotransmitterem je sulfan (H_2S).

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, podle které jsou v prasečích oocytech přítomny enzymy produkující H_2S (CBS, CTH, 3-MPST), jejich distribuce je ve vzájemné interakci a jejich společné působení ovlivňuje průběh meiotického zrání. Výsledná data byla získána na základě imunocytochemického barvení a kolokalizační analýzy.

Výsledky potvrdily přítomnost H_2S -uvolňujících enzymů v prasečích oocytech. Zároveň byla potvrzena funkce těchto enzymů v souvislosti s regulací meiotického zrání, kdy oocyty kultivované spolu s trojkombinací inhibitorů H_2S -uvolňujících enzymů dozrávaly pomaleji. Výsledky také poukázaly střední korelační závislost enzymů CBS, CTH a 3-MPST. V případě kombinace CBS a 3-MPST byla zaznamenána vysoká korelační závislost, a tím potvrzena jejich interakce jak v nezralých oocytech, tak i v *in vitro* dozrálých oocytech.

Je zřejmé, že doposud prostudované účinky H_2S jsou jen zlomkem schopností, kterými tato signální molekula disponuje. Pro popsání a vysvětlení mechanismů působení H_2S je zapotřebí dalších experimentů.

Klíčová slova: oocyt, meiotické zrání, H_2S , CBS, CTH, 3-MPST

Interactions of hydrogen sulfide releasing enzymes in porcine oocytes during meiotic maturation

Summary

The reproductive biotechnologies currently represent a major scientific discipline based on a sufficient quantity of wholesome oocytes matured *in vitro* conditions to acquire permits for their effectiveness. The meiotic maturation is a complex process where a wide range of factors is involved in the regulation. One of these factors are small gaseous molecules, so-called gasotransmitters. These gases demonstrate number of physiological functions in the organism and the latest discovered gasotransmitter is hydrogen sulfide (H₂S).

The aim of this thesis was to test the hypothesis according to which there are enzymes present in porcine oocytes that produce H₂S (CBS, CTH, 3-MPST), their distribution is in interaction and their joint actions influence the process of the meiotic maturation. The resulting data were obtained on the basis of immunocytochemical staining and colocalization analysis.

The results proofed the presence of H₂S-releasing enzymes in porcine oocytes. It was also confirmed the function of these enzymes in relation to the regulation of the meiotic maturation when oocytes cultured with triple inhibitors of H₂S-releasing enzymes matured more slowly. The results also showed medium correlation dependence of enzymes CBS, CTH and 3-MPST. The combination of CBS and 3-MPST resulted in high correlation dependence which confirmed their interaction both in immature oocytes and *in vitro* matured oocytes.

It is evident that so far studied effects of H₂S are only a fraction of skills which this signal molecule possesses. There exists a need for future experiments to help us describe and explain the acting mechanisms of H₂S.

Keywords: oocyte, meiotic maturation, H₂S, CBS, CTH, 3-MPST

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Oogeneze a folikulogeneze	10
3.1.1 Primordiální zárodečné buňky.....	10
3.1.2 Růst oocyty a folikulogeneze	12
3.1.2.1 Primordiální folikul a primární folikul	12
3.1.2.2 Sekundární folikul.....	15
3.1.2.3 Antrální folikul	18
3.2 Mechanismus řízení meiotického zrání	18
3.2.1 Průběh meiotického zrání	18
3.2.2 Klíčové faktory regulující zrání oocytů.....	20
3.2.2.1 Cyklické nukleotidy – cAMP a cGMP	21
3.2.2.2 EGF (epidermální růstový faktor).....	22
3.2.2.3 MPF (M-fázi podporující faktor).....	23
3.2.2.4 MAPK (mitogen aktivující protein kináza)	24
3.3 Sulfan (H₂S) jako gasotransmitter	25
3.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti H ₂ S	26
3.3.2 Endogenní syntéza a metabolismus H ₂ S	26
3.3.3 Vliv H ₂ S na iontové kanály	28
3.3.4 Cílové orgánové systémy	29
3.3.5 Úloha H ₂ S v průběhu meiotického zrání oocytů	31
4 Materiály a metodika	34
4.1 Izolace oocytů	34
4.2 Kultivace oocytů v podmínkách <i>in vitro</i>	34
4.3 Imunocytochemie	34
4.4 Analýza obrazu.....	35
4.5 Statistická analýza	35
4.6 Design experimentů	36
4.6.1 Experiment č. 1.....	36
4.6.2 Experiment č. 2.....	36
4.6.3 Experiment č. 3.....	36
5 Výsledky	37
5.1 Přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech prasete.....	37

5.2 Vliv specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H ₂ S na průběh meiotického zrání oocytů	39
5.3 Vzájemná distribuce enzymů a vyjádření jejich závislosti	42
6 Diskuze	49
7 Závěr.....	52
8 Seznam použité literatury.....	53

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie představují obor, který během posledních let nabývá na významnosti. Úspěšná reprodukce je jedním z hlavních cílů chovu hospodářských zvířat, kde právě biotechnologické metody umožňují chovatelům získat od nejlépe geneticky vybavených jedinců více jejich potomků v porovnání s přirozeným způsobem plemenitby. S rozvíjejícím se zájmem o využívání biotechnologických metod souvisí detailní studování a pochopení mechanismů a vlivů působících na správný vývoj oocytů mimo organismus samice. Získané poznatky z výzkumů na prasečích oocytech jsou velmi dobře použitelné nejen u hospodářských zvířat ale i v oblasti asistované reprodukce člověka.

Nedílnou součástí rozvoje biotechnologických metod je dostatečné množství plnohodnotných oocytů. Po jejich odběru dochází ke kultivaci oocytů v *in vitro* podmínkách do stádia metafáze druhého meiotického dělení. Výsledkem meiotického zrání je dozrálý oocyt schopný podstoupit oplození a zahájit embryonální vývoj. Meiotické zrání je komplexní děj, do jehož regulace je zapojeno široké množství faktorů. Mezi nejdůležitější faktory meiotického zrání patří kinázy M-fáze podporující faktor (MPF) a mitogen aktivovaná protein kináza (MAPK) a neméně důležitými jsou i malé signální molekuly k přenosu buněčného signálu. V současnosti se pozornost věnuje malým plyným molekulám, gasotransmiterům, jejichž vliv na meiotické zrání byl objeven poměrně v nedávné době. Mezi gasotransmitery řadíme oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a v současné době nejintenzivněji studovaný sulfan (H_2S).

H_2S byl původně popsán jako toxický plyn, ale jako signální molekula plní v organismu řadu fyziologických funkcí v různých tkáních, zahrnujících i reprodukční systém. Jeho endogenní syntéza probíhá prostřednictvím enzymů CBS, CTH a 3-MPST. U samčího reprodukčního systému působí na erekci penisu a pravděpodobně i na funkci varlat. U samic H_2S potlačuje děložní kontrakce, a tím dochází k oddálení porodních bolestí. Nedávné studie potvrdily přítomnost H_2S -uvolňujících enzymů v oocytech, kde sehrávají důležitou roli v procesu regulace meiotického zrání. Vzájemná interakce jednotlivých enzymů však dosud zůstává neobjasněná.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, podle které jsou v prasečích oocytech přítomny enzymy produkující H_2S (CBS, CTH, 3-MPST), jejich distribuce je ve vzájemné závislosti a jejich společné působení ovlivňuje průběh meiotického zrání.

Pro ověření stanovené hypotézy byly určeny následující jednotlivé cíle práce:

- 1) prokázat přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech prasete;
- 2) zhodnotit vliv specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H_2S na průběh meiotického zrání oocytů;
- 3) zhodnotit vzájemnou distribuci enzymů CBS, CTH a 3-MPST a vyjádřit jejich vzájemnou závislost.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze savců představuje proces, při kterém se z primordiálních zárodečných buněk (PGCs, primordial germ cells) vyvíjejí zralá vajíčka (oocyty) schopná oplození. Oplození schopné oocyty mají zredukovaný počet chromozomů, haploidní počet (1n). K redukci počtu chromozomů dochází v průběhu redukčního dělení – meiózy. Proces oogeneze probíhá ve třech fázích, a to ve fázi množení, růstu a zrání. Oogeneze začíná již během embryonálního vývoje samice. Ještě před narozením plodu je však proces oogeneze ve fázi růstu pozastaven, oocyt se dostává do prvního meiotického bloku. K uvolnění oocytu z prvního meiotického bloku dochází v období puberty samice. Meióza je znovuzahájena, ale během ovulace dochází k opětovnému pozastavení, kdy se oocyt dostává do druhého meiotického bloku. Prolomení druhého meiotického bloku nastává při oplození, kdy dojde k setkání oocytu se spermií a meióza může být dokončena (Wassarman, 1988).

Vyvíjející se oocyt je obklopen vrstvami podpůrných granulózniých buněk, tento komplex se označuje jako ovariální folikul. Folikuly prochází vývojem v procesu folikulogeneze. Folikulogeneze zahrnuje proliferaci, růst, tvorbu antra až do ovulace či atrézie. Folikulogeneze začíná před narozením a probíhá současně s oogenezí (Paulini *et al.*, 2014). Rostoucí folikuly podporují růst oocytů a získávání jeho meiotické a vývojové kompetence.

Granulózní buňky folikulu také přispívají k růstu oocytů a zároveň se podílejí na udržení meiotického bloku. Ale i oocyt má vliv na vývoj granulózniých buněk, včetně jejich proliferace, diferenciaci a produkce extracelulární matrix a steroidních hormonů. Proces vývoje folikulů zahrnuje obousměrnou komunikaci mezi oocytem a somatickými buňkami pomocí mezibuněčné komunikace prostřednictvím buněčných spojů typu gap junction (Vanderhyden, 2002).

3.1.1 Primordiální zárodečné buňky

Zralé zárodečné buňky se vyvíjejí z nediferencovaných prekurzorových buněk epiblastu, takzvaných primordiálních zárodečných buněk (PGCs, primordial germ cells), které vznikají přeměnou buněk v prvostřevu a žloutkovém váčku.

Po jejich vzniku ve žloutkovém váčku začínají PGCs během několika dnů migrovat do pohlavního hřebene (Vanderhyden, 2002). U prasat se PGCs nacházejí v pohlavním hřebení

24. den vývoje embrya (Bielanska-Osuchowska, 2006). Během migrace se PGCs mitoticky dělí, a tím zvyšují svůj počet. Proliferace coelomového epitelu a současná kondenzace podkladového mezenchymu vedou k vytvoření vyvýšeniny pohlavního hřebene. PGCs dosáhnou pohlavního hřebene pomocí améboidního pohybu (Paulini *et al.*, 2014). K dosažení pohlavního hřebene je migrace PGCs ovlivněna signály produkovanými somatickými buňkami, jež jsou v místech migrační cesty PGCs (Raz, 2004). Jsou to zejména cytokiny, které hrají důležitou roli v proliferaci a zachování PGCs. Během migrace PGCs se mění distribuce tří extracelulárních matrix glykoproteinů a to kolagenu IV, fibronektinu a lamininu. Pokud PGCs postrádají podjednotku integrinu β_1 , nedokáží účinně kolonizovat pohlavní hřeben, proto jsou integriny důležitými mediátory migrace PGCs.

Jakmile se nacházejí PGCs ve vyvíjejícím se vaječniku, začnou se proliferující PGCs diferencovat v oogonie. Oogonie interagují se somatickými buňkami, které jsou považovány za prekuzory granulóznic buněk. Tyto pregranulózní buňky vznikají z epitelových buněk invaginujících se do pohlavního hřebene. Oogonie se postupně propojí s pregranulózními buňkami, které se dále vyvíjejí a vytváří primordiální folikul (Vanderhyden, 2002). První primordiální folikuly obklopené jednou vrstvou plochých folikulárních buněk byly pozorovány u vaječníků prasete 56. den a zůstávají tak až do 90. dne (Bielanska-Osuchowska, 2006). Folikuly se bez přítomnosti oocytů nezačnou vyvíjet.

Oogonie expandují v důsledku mitotického dělení, dokud buňky nevstoupí do procesu meiózy, a stávají se oocytem. První oogonie podstupující meiotické dělení se nacházejí v nejvnitřnější oblasti ovariální kůry a vývojová vlna meiózy se šíří směrem ven. Oocyty v profázi I zůstávají pozastaveny v diplotene fázi, dokud nebudou plně dorostlé a stimulované k ovulaci (Vanderhyden, 2002; Paulini *et al.*, 2014). U prasete jsou od 47. dne vývoje pozorovány oocyty v profázi prvního meiotického dělení (Bielanska-Osuchowska, 2006).

Proliferace PGCs je následována vstupem oogonií do meiózy, ale zároveň dochází ke ztrátě až 70 % zárodečných buněk apoptózou. TGF- β_1 , TGF- β_2 a FAS ligand indukují programovanou smrt oogonií. Maximální počet samičích zárodečných buněk je dosažen v okamžiku přechodu z mitózy do meiózy, tedy v momentě přeměny oogonií na oocyty. U prasete v 50. dni březosti činí maximální počet zárodečných buněk 1 100 000 a v době porodu počet zárodečných buněk poklesne na 500 000 (Vanderhyden, 2002; Paulini *et al.*, 2014).

3.1.2 Růst oocyty a folikulogeneze

Období růstu oocyty a folikulogeneze představují procesy, které se odehrávají současně. V době porodu se na vaječniku nacházejí primordiální folikuly, ve kterých je pozastavený primární oocyt obklopený jednou vrstvou plochých pregranulózniých buněk. Vývoj folikulů je morfologicky charakterizován zvětšením průměru oocytů a synchronní proliferací granulózniých buněk, což vede k obklopení oocyty několika vrstvami buněk (Vanderhyden, 2002). V růstové fázi oocyty se zvětšuje objem, dochází k replikaci a redistribuci cytoplazmatických organel. Tyto modifikace, včetně sekrece glykoproteinů *zóny pellucidy*, jsou obdobím intenzivní syntézy RNA (Picton *et al.*, 1998). Indukujícím signálem pro spuštění těchto procesů je dosažení období puberty u samice v důsledku zvýšení hladiny hypofyzárních gonadotropních hormonů.

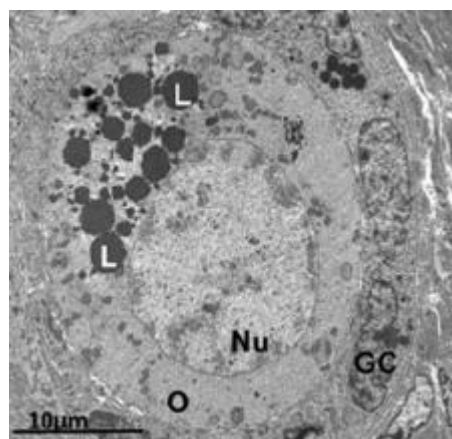
Kůra vaječniku obsahuje folikuly v různém stádiu jejich vývoje. Folikuly se klasifikují na základě jejich velikosti, typu nebo počtu vrstev granulózniých buněk. Folikuly se nazývají preantrální nebo antrální. Preantrální folikul neobsahuje dutinu naplněnou tekutinou a má 3 stádia – primordiální, primární a sekundární. Paulini *et al.* (2014) uvádí velikosti jednotlivých stádií prasečích oocytů a počty vrstev granulózniých buněk takto: průměr primordiálního folikulu je 34 μm , průměr primárního folikulu 40 μm a průměr sekundárního folikulu je 85 μm . Průměr oocyty v primordiálním folikulu je 26 μm , průměr oocyty v primárním folikulu je 27 μm a v sekundárním folikulu je průměr oocyty 39 μm . Počet vrstev granulózniých buněk u primordiálního folikulu je 5, u primárního folikulu 8 a u sekundárního folikulu 50. Zásoba preantrálních folikulů na vaječniku je velmi proměnná mezi druhy, u prasete byla odhadnuta na 21 000. Antrální folikul má dutinu vyplněnou tekutinou a v tomto stádiu většina folikulů prochází atretickou degenerací. Málo z folikulů dosáhne preovulační etapy. Kompletní vývoj folikulů vrcholí ovulací, což znamená, že je uvolněn kumulo-oocytární komplex s plně dorostlým a dozralým oocytem, který může být oplozen (Paulini *et al.*, 2014).

3.1.2.1 Primordiální folikul a primární folikul

Primordiální folikuly jsou tvořeny oocytem v prvním meiotickém bloku a jednou vrstvou zploštělých granulózniých buněk. Tyto primordiální folikuly tvoří ovariální zásoby, ze kterých se vyvíjejí další stádia folikulů. Oocyt může být vejčitého či kulovitého tvaru s homogenní ooplazmou, cytoplazma oocyty. Jádro může být umístěno v centrální nebo excentrické poloze uvnitř oocyty. Jádro chrání hladká membrána. Chromatin je obvykle nekondenzovaný a jsou pozorována jedno nebo dvě jádérka.

U většiny druhů se orgány v oocytu nacházejí blízko jádra nebo jsou rovnoměrně rozmístěné v ooplazmě. Nejčtenější orgány v ooplazmě u primordiálního folikulu jsou mitochondrie, jejichž struktura se v průběhu vývoje mění z kulatého tvaru, což představuje nezralé stádium, na tvar podlouhlý, kdy se již jedná o její konečné stádium. Mitochondrie jsou lokalizovány volně v ooplazmě prasat a jsou náhodně distribuovány s rozsáhlou sítí endoplazmatického retikula prostupujícího do ooplazmy. Většina savčí ooplazmy u primordiálního folikulu obsahuje lipidové kapénky, endoplazmatické retikulum, Golgiho cisterny, polyribosómy a proměnlivý počet vezikulů. U prasat jsou polyribosómy viditelné na povrchu drsného endoplazmatického retikula a jsou distribuovány v celé ooplazmě. Oocyty všech savců obsahují lipidy. U prasat jsou tukové kapénky velmi hojné a představují malé tmavé kulaté struktury (viz Obrázek č. 1). Tukové kapénky jsou zdrojem energie. Často jsou endoplazmatické retikulum, mitochondrie a tukové kapénky spojeny navzájem. Během růstu oocytu se počet těchto metabolických jednotek v ooplazmě zvyšuje, čímž se oocyt stává metabolicky aktivnější, zejména v syntéze proteinů klíčových pro následné meiotické zrání.

Granulózní buňky primordiálních folikulů jsou malé a mají relativně velké jádro se shluky kondenzovaného a nekondenzovaného chromatinu. Mezi granulózními buňkami navzájem a mezi oocytem a granulózními buňkami nejsou žádné specializované spoje. V tomto stádiu se jakékoliv látky do oocytu dostávají pomocí endocytózy nebo proniknou difúzí prostřednictvím těsného kontaktu mezi membránami granulózních buněk a oocytu.



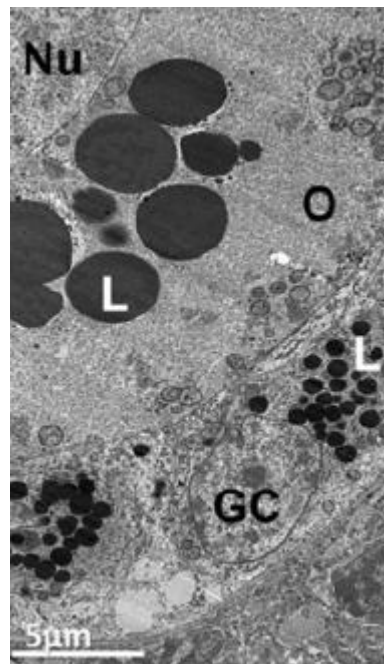
Obrázek č. 1: Prasečí primordiální folikul s centrálně uloženým jádrem a velkým množstvím lipidových kapének na jednom pólu oocytu (převzato z Paulini *et al.*, 2014). O – oocyt; GC – granulózní buňky; Nu – jádro; L – lipidové kapénky.

Folikulární růst probíhá jen u malého počtu folikulů. Dochází k diferenciaci a proliferaci granulóznic buněk a ke zvětšení v primární folikul. Granulózní buňky zvyšují svůj počet a mění svůj tvar z plochých buněk v buňky kubické. Granulózní buňky jsou v primárním folikulu umístěny blízko u sebe a pomocí spojů typu gap junction komunikují granulózní buňky s oocytem a také mezi sebou. Jádra granulóznic buněk jsou nepravidelná se zářezy, v jejich cytoplazmě jsou kulaté mitochondrie, endoplazmatické retikulum, několik Golgiho cisteren a vezikuly. U prasečího primárního folikulu se nachází několik lipidových kapének jak v ooplazmě, tak v cytoplazmě granulóznic buněk (viz Obrázek č. 2). Ultrastrukturální rysy ooplazmy a její orgány u primárních folikulů jsou podobné jako u primordiálních folikulů. Většina mitochondrií je stále uskupena dokola, jsou prodloužené a jejich dělení je stále častější.

Oocyt podléhá objemové expanzi a proteiny *zony pellucidy* začínají být sekretovány mezi rostoucím oocytem a granulózními buňkami. *Zona pellucida* je obvykle zcela vytvořena kolem oocytu v sekundárních folikulech, i když u prasat ještě *zona pellucida* není v sekundárních folikulech viditelná (Paulini *et al.*, 2014). *Zona pellucida* je pórovitá extracelulární vrstva složená ze tří typů glykoproteinů: ZP1, ZP2 a ZP3, které byly detekovány v cytoplazmě granulóznic buněk (Sathananthan *et al.*, 2006). ZP1 je primární receptor pro spermii, ZP2 je sekundárním receptorem pro spermii a na ZP3 se váže spermie a spouští akrozomální reakci. Tloušťka *zony pellucidy* je rozdílná u různých druhů zvířat, u prasete se její tloušťka pohybuje v rozmezí 13 – 16 μm (Prasad *et al.*, 2000). *Zona pellucida* umožňuje komunikaci mezi oocytem a granulózními buňkami během oogeneze pomocí pórů, kterými prochází výběžky granulóznic buněk bezprostředně obklopující oocyt – buněk vrstvy *corona radiata*. *Zona pellucida* mimoto chrání oocyt a následně embryo při jeho časném pre-implantačním vývoji (Wassarman *et al.*, 1999).

Do regulace oogeneze a folikulogeneze jsou zapojeny transkripční faktory. Na specifikaci buněk epiblastu v PGCs se podílí tyto faktory: transformační růstový faktor (TGF- β , transforming growth factor) a morfogenetické faktory (BMP-4 a BMP-8B, bone morphogenetic proteins). BMP-4 a BMP-8B jsou produkovány extraembryonálním ektodermem a jakmile jsou PGCs vytvořeny, BMP-4 a BMP-8B již nejsou nutné pro další rozvoj (Ying *et al.*, 2001; Vanderhyden, 2002). Oocytární faktory, jež jsou nutné pro vytvoření primordiálního folikulu, jsou dosud plně neobjasněné, ale cílená delece transkripčního faktoru FIG- α vede k selhání tvorby primordiálního folikulu. Na utváření primárního folikulu se podílejí oocytární faktory, jako např. růstový diferenciacní faktor (GDF-9, growth differentiation factor 9) a růstové faktory (BMP, bone morphogenetic protein), BMP-15

a BMP-6. Exprese GDF-9 a BMP-15 začíná v oocytech malých primárních folikulů a pokračuje i během ovulace. Oba růstové faktory jsou mitogeny pro granulózní buňky (Vanderhyden, 2002; Paulini *et al.*, 2014).



Obrázek č. 2: Primární folikul prasete s lipidovými kapénkami v ooplasmě a v cytoplasmě granulózních buněk (převzato z Paulini *et al.*, 2014). O – oocyt; Nu – jádro; GC – granulózní buňky; L – lipidové kapénky.

3.1.2.2 Sekundární folikul

Organely, které byly rovnoměrně distribuovány v celé ooplasmě u primordiálních a primárních folikulů, migrují v sekundárních folikulech k obvodu ooplazmy. Mitochondrie oocytu jsou nejhojnější organelou. Jejich tvar se protahuje, což souvisí se zvýšeným metabolismem a vyšší energetickou potřebou oocytů v tomto stádiu. Endoplazmatické retikulum a Golgiho cisterny se stávají agregované a dobře vyvinuté, což rovněž souvisí s vyšším metabolismem oocytů v rostoucích folikulech. Existuje také spousta volných polyribosomů a větší množství lipidových kapének. U prasat jsou tukové kapénky hojné a mění svůj vzhled od malých kulatých tmavých kapének u primordiálních a primárních folikulů do velkých šedých struktur u sekundárních folikulů. Tyto změny vzhledu mohou souviset s lipolýzou, ale mohou také odrážet změny ve složení mastných kyselin, jak se oocyt vyvíjí. Tato změna může být druhově specifická nebo může být v souvislosti s fyziologickým stavem zvířete nebo se složením krmné dávky (Paulini *et al.*, 2014).

V tomto období se vrstva granulózních buněk začíná obklopotvat buňkami vnitřní thekální vrstvy (*theca folliculi interna*). Vnější thekální vrstva (*t. f. externa*) představuje vazivovou vrstvu obklopující granulózní buňky a oocyt (Young *et* McNeilly, 2010). Na začátku tvorby thekálních vrstev je rozpoznána přítomnost podlouhlých buněk připojených k bazální membráně, ale vrstva *t. f. interna* je stále nedostatečně definována v malých sekundárních folikulech, je zřetelná až na velkých sekundárních folikulech (Paulini *et al.*, 2014). Funkcí thekálních buněk je syntéza steroidních hormonů. Thekální buňky tvoří síť buněk podporující cévní systém a po ovulaci thekální buňky luteinizují a tvoří buňky žlutého tělíska (Young *et* McNeilly, 2010).

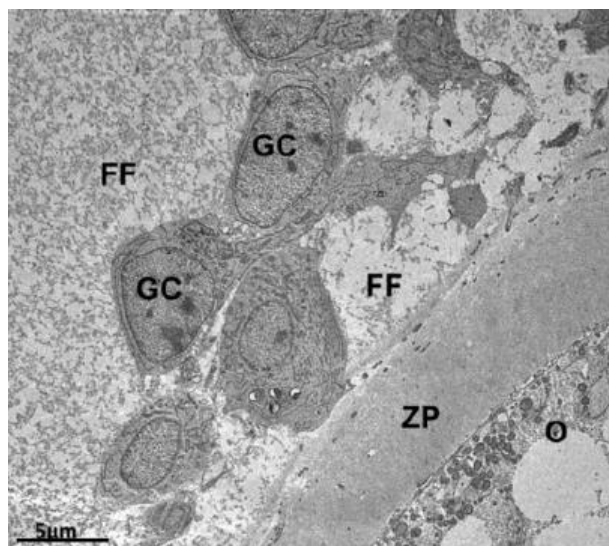
V pokračujícím růstu folikulu začínají mezi vrstvami *theca folliculi* prorůstat krevní kapiláry, jejichž prostřednictvím se do folikulu transportují endokrinní faktory. Luteinizační hormon (LH) přiváděný do krevních kapilár théky má vliv na utváření androgenů v théce. Androgeny se poté dostávají do granulózních buněk, kde indukují vznik receptorů pro folikulostimulační hormon (FSH) (Van den Hurk *et al.*, 2000). Pod vlivem FSH hormonu je v granulózních buňkách indukována exprese cyklinu D2 a působením FSH pokračuje růst folikulu. V případě nedostatku FSH nebo na základě přirozeného procesu selekce folikulů podstupují některé folikuly, které zahájily růst a nedosáhly ovulace, apoptózu nebo atrezii (Vanderhyden, 2002).

Během růstu folikulu se thekální buňky stávají zbytnělymi, méně zploštělymi, jsou bohatší na endoplazmatické retikulum a obsahují mnoho kapiček lipidů. V mitochondrii se nachází první enzym ve steroidogenní dráze, cholesterol sidechain cleavage cytochrome P450 (CYP11A), a endoplazmatické retikulum obsahuje zbývající enzymy nezbytné pro produkci androgenů. V lipidových váčcích se ukládají prekurzory (estery cholesterolu) pro syntézu steroidních hormonů, tyto prekurzory jsou do mitochondrie dopravovány pomocí proteinu STAR (steroidogenic acute regulatory protein). Androgeny syntetizované v thekálních buňkách jsou transportovány do granulózních buněk, kde jsou pomocí P450 aromatázy převedeny na estron a 17 β -estradiol (Young *et* McNeilly, 2010). Estradiol stimuluje proliferaci granulózních buněk. Během folikulárního vývoje podstupují granulózní buňky transformaci z proliferačních, preovulačních estradiol-produkujících buněk na neproliferační, terminálně diferencované a progesteron-produkující buňky žlutého tělíska (Vanderhyden, 2002).

Proces produkce androgenů vyžaduje enzymy P450, CYP17, HSD3B a STAR a je pod kontrolou LH, ale i mnoho dalších faktorů hraje významnou roli během produkce androgenů v thekálních buňkách. Jedná se o BMP, GDF-9, HGF (hepatocyte growth factor),

IGF (insulin-like growth factor), SCF (stem cell factor/kit ligand) a TGF- β (transforming growth factor β). IGF-1 zvyšuje proliferaci thekálních buněk *in vitro*, stimuluje expresi LH receptorů a steroidogenních enzymů. Syntéza IGF1 je řízena FSH. SCF, také známý jako kit ligand, je růstový faktor, který je syntetizován granulózními buňkami. SCF působí na diferencované thekální buňky. Thekální buňky produkují keratinocytový růstový faktor (KGF) a hepatocytární růstový faktor (HGF), které působí na produkci SCF v granulózních buňkách. SCF poté signalizuje syntézu KGF a HGF v thekálních buňkách, jedná se o pozitivní mechanismus zpětné vazby. SCF tak působí jako konečný faktor zapojený do diferenciac a aktivace thekálních buněk. Zástupci třídy TGF- β hrají zásadní roli během růstu a vývoje folikulů. Radíme mezi ně BMP, růstové diferenciacní faktory (GDFs), aktivin a inhibin. Tyto molekuly se váží na své receptory a iniciují fosforylační kaskády, které následně ovlivňují genové exprese v buněčném jádře (Young *et McNeilly*, 2010).

Ve fázi preantrálního stádia jsou pozorovány mezery mezi sousedními granulózními buňkami vyplněné folikulární tekutinou (viz Obrázek č. 3). Progresivní nahromadění tekutiny způsobí roztažení těchto dutin a počáteční vytvoření antra, což vede ve vývoji folikulů k antrální fázi (Paulini *et al.*, 2014).



Obrázek č. 3: Časný antrální folikul zobrazující mezery mezi přilehlými granulózními buňkami naplněné folikulární tekutinou (převzato z Paulini *et al.*, 2014). O – oocyt; ZP - *zona pellucida*; GC – granulózní buňky; FF - folikulární tekutina.

3.1.2.3 Antrální folikul

Přechod k antrálnímu folikulu spočívá ve vytváření dutiny vyplněné tekutinou, v důsledku čehož dochází k oddělení a diferenciaci granulózních buněk do dvou typů. Jedním z nich jsou murální granulózní buňky obklopující stěnu folikulu. Druhým typem jsou buňky kumulární obklopující oocyt a s těmito buňkami je oocyt ovulován v podobě expandovaného vejconosného hrbolku (*cumulus oophorus*), sestávajícího z tzv. kumulárních buněk (Vanderhyden, 2002). Nejvnitřnější vrstva kumulu zvaná *corona radiata* během zralosti také expanduje (Sathananthan *et al.*, 2006). Antrální stádium nastává u prasat u průměru folikulů cca 400 μm .

V terciárních folikulech jsou oocyty zcela obklopeny plně vyvinutou *zonou pellucida*, organely jsou rovnoměrněji rozloženy v ooplazmě a narůstá počet protáhlých mitochondrií, tukových kapének a vezikul. Kortikální granula, která byla uspořádána u sekundárních folikulů ve shlucích v hluboké kůře oocytu, postupně migrují směrem k obvodu oocytu v Graafově folikulu. Kortikální granula jsou odvozena z Golgiho komplexu a jsou kontinuálně produkována až do ovulace. Zralý oocyt podléhá ovulaci ve stadiu metafáze II, ve které je zároveň pozastaven jeho vývoj (Paulini *et al.*, 2014). Zralý oocyt při ovulaci je haploidní buňka v případě prasečích oocytů s 19 mateřskými chromozómy uspořádaných v ekvatoriální rovině (Sathananthan *et al.*, 2006).

Když oocyt dosáhne metafáze II, jsou kortikální granula na vnitřní ploše plazmatické membrány oocytu a jsou připravena exocytózou uvolnit jejich obsah do perivitelinního prostoru. Jakmile dojde k oplození spermií, zapříčiní exocytóza kortikálních granul ztvrdnutí *zony pellucidy* a zabrání tak polyspermii (Paulini *et al.*, 2014).

3.2 Mechanismus řízení meiotického zrání

3.2.1 Průběh meiotického zrání

Meiotické zrání oocytů je jedním z důležitých fyziologických dějů odehrávajících se v organismu pro zachování druhu. Meiotické zrání sestává ze dvou po sobě jdoucích M-fází, meiózy I a meiózy II, a protože nenastává S-fáze, ve které dochází k replikaci DNA, dochází ke vzniku haploidních gamet s redukováným počtem chromozómů (Kishimoto, 2003). U většiny savců je meióza oocytů započata během embryonálního vývoje samice a jejich vývoj

je pozastaven v diplotene profáze prvního meiotického dělení kolem období porodu. Oocyty v tomto stádiu setrvávají v tzv. prvním meiotickém bloku. V této podobě jsou oocyty udržovány týdny nebo roky v závislosti na příslušnosti k živočišnému druhu. S nástupem puberty dochází k růstu oocytů ve folikulech, kdy oocyty získávají úplnou kompetenci pro znovuzahájení a dokončení meiotického zrání (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007). Průměr plně dorostlého prasečího oocyty je cca 120 μm (McGaughey *et al.*, 1979). Plně dorostlý oocyt s pozastavenou meiózou v profázi I je označován jako nezralý oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV, germinal vesicle). Proces znovuzahájení a dokončení meiózy ve stádiu metafáze II je označován jako meiotické zrání (Kishimoto, 2003). U prasečích plně dorostlých oocytů probíhá fáze zrání 40 až 48 hodin (Naito *et al.*, 1995).

V procesu znovuzahájení meiotického zrání je pozorovatelný rozpad jaderné membrány, také rozpad zárodečného váčku, označovaného jako GVBD (germinal vesicle breakdown). GVBD v podmínkách *in vivo* je důsledkem preovulační vlny gonadotropinu, luteinizačního hormonu LH (Fan *et al.*, 2002), který působí na folikulární somatické buňky (také granulózní buňky). LH-indukované znovuzahájení meiotického zrání je závislé na aktivaci MAPK ve folikulárních buňkách. Mezi nezralým oocytem a kumulárními buňkami, které oocyt obklopují, fungují jako hlavní komunikační systém mezibuněčné spoje typu gap junction. Toto spojení hraje důležitou roli při vývoji oocyty a folikulu, udržuje meiotický blok a vyvolává znovuzahájení meiotického zrání. Snížený počet nebo narušení funkčních spojů gap junction mezi oocytem a kumulárními/granulózními buňkami je součástí mechanismu, který vyvolává znovuzahájení meiotického zrání po aktivaci klíčových kináz v granulózních buňkách. Gap junction protein alfa-1, známý také jako connexin 43 (CX43), je hlavní složkou gap junction spojení mezi oocytem a ovariálními granulózními buňkami. Fosforylace CX43 vede k narušení spojů gap junction. CX43 může být fosforylováno řadou důležitých proteinkináz. V antrálních folikulech umožňují spoje typu gap junction tok cAMP z folikulárních buněk do oocytů, čímž nedochází k předčasnému znovuzahájení meiotického zrání (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007). cAMP je tedy látka způsobující meiotický blok (Dekel, 2005). Po stimulaci LH dochází k indukci signálních kaskád vedoucích k narušení spojů gap junction, a tím přerušuje tok cAMP. Mezitím, steroidy vylučované granulózními buňkami stimulují meiotické zrání parakrinní cestou (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007), prostřednictvím BMP, GDF-9, HGF, IGF, SCF a TGF- β (více viz kapitola 3.1.2.2) (Young *et McNeilly*, 2010).

Výsledkem výše popsané regulace je zrání oocyty, které je charakterizováno kondenzací chromozomů, GVBD, vývojem do metafáze I (MI), do anafáze (AI) a telofáze (TI)

až do vydělení prvního pólového tělíska, kdy je v metafázi II (MII) ustanoven druhý meiotický blok. Druhý meiotický blok je prolomen až po oplození (Meinecke *et al.*, 2001).

Chyby v chromozomální segregaci během meiotického dělení mohou narušit stabilitu genomu u gamet před oplodněním a mít za následek aneuploidii. Chromozomální segregace je kriticky závislá na formaci a stabilitě mikrotubulárních vláken dělicího vřetenka. V somatických buňkách je shromáždění mitotického vřetenka regulováno centrozómy, které fungují v podobě primárních mikrotubulárních organizačních center (MTOCs, primary microtubule organizing centers). MTOCs jsou bezmembránové a vázané organely, obvykle složené ze dvou centriol obklopených bílkovinnou matrix z pericentriolárního materiálu (PCM). Centrioly udržují celistvost centrozómů a jsou nezbytné pro tvorbu bičků, zatímco PCM poskytuje mikrotubulům upevňovací schopnost. Savčí oocyty obsahují unikátní MTOCs složené z nezbytných pericentriolárních proteinů matrix, zahrnujících gama-tubulin pro tvorbu mikrotubulů, ale chybí jim centrioly. Centrioly jsou přítomné v oogoniích a ve fetálních oocytech pouze do stádia pachytene (třetí fáze profáze I), tudíž nejsou centrioly během meiotického zrání oocytů přítomny. U většiny druhů se centrioly do oocytu dostanou během oplození se spermií, která centrioly obsahuje. První MTOCs jsou obvykle detekovány v preovulačních oocytech pozastavených v profázi I. Po znovuzahájení meiózy se v cytoplazmě oocytu a v těsné blízkosti jádra tvoří více malých MTOCs. Jak oocyty postupují do prometáfáze I, tak se mikrotubuly postupně organizují do bipolárního meiotického vřetenka. Během metafáze I a II chromozomy vytvoří spolu s MTOCs lokalizovaných na obou pólech oocytu metafázní destičku. Myší oocyty obsahují pericentrin, protein vázající další proteiny centrozómu, který představuje klíčovou funkční složku jedinečného acentriolárního MTOCs v oocytech. Jeho nedostatek způsobuje narušení organizace meiotického vřetenka vedoucí k aneuploidii (Ma *et Viveiros*, 2014). Pericentrin se také vyskytuje u člověka (Delaval *et Doxsey*, 2010). U prasete se uplatňují jiné proteiny, jako je NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus) (Schatten *et Sun*, 2011) a centrin (Manandhar *et al.*, 2006). Důležité procesy cytoskeletu a segregace chromozómů jsou regulovány škálou klíčových faktorů meiotického zrání, mezi které patří zejména enzymy s kinázovou aktivitou.

3.2.2 Klíčové faktory regulující zrání oocytů

Klíčovou úlohu v procesu meiotického zrání představuje kaskáda vedoucí k fosforylaci a defosforylaci proteinů. Tato kaskáda je regulována proteinkinázami a fosfatázami, jejichž adekvátní dynamika reguluje prolomení meiotického bloku, znovuzahájení a dokončení

meiotického zrání (Fan *et al.*, 2002). Na počátku spuštěných signálních kaskád sehrávají svoji úlohu malé signální molekuly, označované jako druzí poslové. Mezi tyto signální molekuly patří cyklické nukleotidy cAMP a cGMP a také vápenaté ionty Ca^{2+} . V současnosti se stále více studuje vliv malých plynných molekul, gasotransmiterů, na meiotické zrání.

Mezi klíčové regulátory meiotického dělení řadíme M-fázi podporující faktor (MPF, maturation-promoting factor) a mitogen aktivující protein kinázu (MAPK, mitogen activated protein kinase) (Meinecke *et al.*, 2001). Obě kinázy jsou aktivovány v době kolem GVBD (Motlík *et al.*, 1998).

Mezi další regulační faktory patří protein kináza C (PKC), která se řadí mezi serin/threonin kinázy, jež mohou být aktivovány vápenatými ionty (Ca^{2+}) (Fan *et al.*, 2002). PKC zastává úlohu jak v oocytech, tak i v granulózniích buňkách. Aktivace PKC významně reguluje fosforylaci MAPK. PKC aktivátory fosforylují MAPK v kumulárních buňkách. PKC inhibitory blokuji FSH-indukované znovuzahájení meiotického zrání a aktivaci MAPK. Jedním z finálních účinků MAPK aktivace v granulózniích buňkách je narušení gap junction a PKC dráha také může narušit gap junction v granulózniích buňkách (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007).

3.2.2.1 Cyklické nukleotidy – cAMP a cGMP

Udržení prvního meiotického bloku závisí na vysoké hladině cAMP v oocytu. Vysoká hladina cAMP v oocytu má za následek fosforylaci CDC2 na Thr14 a Tyr15 a činí tak MPF neaktivní (Duckworth *et al.*, 2002). Pokles cAMP v oocytech na počátku zrání oocytů vede k defosforylaci CDC2 na Thr14 a Tyr15 a komplex MPF se aktivuje, čímž oocyt může znovu vstoupit meiózy. Mechanismus působení cAMP probíhá prostřednictvím cAMP-dependentní protein kinázy A (cAMP-PKA), která reguluje činnost fosfatázy CDC25 a kinázy WEE1/MYT1 (Mehlmann, 2005). CDC25 defosforyluje CDC2, zatímco WEE1/MYT1 CDC2 fosforyluje. cAMP-PKA ovlivňuje i granulóznií/kumulární buňky, kde má pozitivní vliv na aktivaci MAPK stejně jako na znovuzahájení meiotického zrání (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007).

cAMP je produkován buňkami folikulu a poté difunduje do oocytu prostřednictvím spojů gap junction (Anderson *et al.*, 1976). Vysokou hladinu cAMP udržuje i sám oocyt, který je schopný generovat vlastní cAMP. V plazmatické membráně oocytu se nachází receptor GPR3 (G-protein-coupled receptor), který stimuluje G_s G-protein, což vede k následné aktivaci adenylát cyklázy (AC). Enzym AC zodpovídá za syntézu cAMP (Mehlmann, 2005).

cGMP je syntetizován granulózními buňkami, které mají na své membráně natriuretický peptid receptor 2 (NPR2), na který se váže natriuretické peptid typu C (NPPC). Navázání NPPC na NPR2 vede k expresi guanylyl cyklázy (GC). GC je enzym syntetizující cGMP. Z granulózních buněk cGMP vstupuje do oocyty prostřednictvím spojů gap junction (Lee *et al.*, 2013). cGMP v oocytech inhibuje fosfodiesterázu 3A (PDE3A), čímž se zabrání degradaci cAMP na AMP, a tímto mechanismem dochází k udržení meiotického bloku (Vaccari *et al.*, 2009). Preovulační vlna LH indukuje pokles cGMP v granulózních buňkách a oocyty. Tento pokles cGMP zmírňuje inhibici PDE3A, což zapříčiní aktivaci MPF a v konečném důsledku GVBD (Shuhaibar *et al.*, 2015).

3.2.2.2 EGF (epidermální růstový faktor)

Komplex EGF hraje důležitou roli při zprostředkování LH během znovuzahájení meiotického zrání. EGF a látky ze skupiny EGF (amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG) a beta-cellulin) ovlivňují meiotické zrání, jelikož indukují aktivaci EGFR v granulózních/kumulárních buňkách a tím aktivují MAPK, a ovlivňují vyvíjející se kompetenci oocytů u různých druhů savců. Inhibice receptoru pro EGF (EGFR) a snížení AREG nebo EREG zabraňuje EGF-indukované steroidogenezi a také blokuje LH-indukovanou steroidogenezi stejně jako znovuzahájení meiotického zrání.

Látky ze skupiny EGF zastávají fyziologickou roli v regulaci znovuzahájení meiotického zrání v preovulačních folikulech, pravděpodobně jako zprostředkovatelé signálů, které jsou vyvolané vlnou LH.

Granulózní buňky jsou hlavním působištěm receptorů EGF (EGFR). LH se váže na LH receptor v granulózních buňkách preovulačních folikulů, tím se aktivuje cAMP-PKA a P38 MAPK signální kaskáda a stimuluje se exprese mRNA kódující pre-EGF látky. Tyto pre-EGF látky jsou zpracovány do konečných peptidů (AREG, EREG a beta-cellulin) pomocí enzymu metalloproteinázy (MMP) a jsou uvolněny z buněčného povrchu. Následně, rozpustné růstové faktory vyvinou autokrinní a parakrinní účinky prostřednictvím aktivace receptoru EGF (EGFR). Všechny tyto procesy vedou k znovuzahájení meiotického zrání, ke kumulární expanzi a k událostem, které jsou rozhodující pro ovulaci. Po navázání EGF se aktivovaný EGFR (má vnitřní tyrosin kinázu) podílí na fosforylaci tyrosinkinázy, která se nachází v substrátech buňky. Dráha EGF ve vaječniku zahrnuje rychlé fosforylace MAPK. Například v prasečích granulózních buňkách, kde MAPK může být aktivována po dočasném

ošetřování s EGF. Aktivace EGFR spustí signalizaci přes MAPK a EGF působí hlavně na granulózních buňkách, kde reguluje zrání oocytů.

Funkční význam látek skupiny EGF spočívá v podpoře kumulární expanze prostřednictvím jejich stimulačního účinku na HAS2 a PTGS2 expresi mRNA, tento účinek je zprostředkován pomocí MAPK. Kromě toho má EGF schopnost indukovat steroidogenezi v granulózních buňkách (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007).

3.2.2.3 MPF (M-fázi podporující faktor)

MPF je heterodimerní kináza skládající se z katalytické podjednotky – cyklin dependentní kinázy 2 (CDC2, cyclin dependent kinase 2), označované také jako kináza CDK1, nebo P34^{CDC2}, a z regulační podjednotky cyklinu B (Meinecke *et al.*, 2001). Významné množství cyklinu B1 je syntetizováno během první a druhé metafáze u prasečích oocytů, potvrzuje to i zvýšená koncentrace komplexu během těchto fází. Koncentrace komplexu se v obou metafázích liší, kdy v druhé metafázi je mnohem vyšší (Naito *et al.*, 1995). Většina CDC2 v oocytech je monomerní a pouze zhruba 10 % je spojena s cyklinem B v pre-MPF komplexech. Pre-MPF je udržován ve své inaktivní formě fosforylací aminokyselinových zbytků (threonin 14 a tyrosin 15) katalytické podjednotky CDC2. Tyto inhibiční fosforylace jsou pravděpodobně katalyzovány MYT1 protein kinázou (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007).

V meioticky nekompetentních prasečích oocytech je hladina CDC2 velmi nízká. Jeho koncentrace se náhle zvyšuje na konci růstové fáze oocytů, čímž je nabytí meiotické kompetence spojeno se zvýšenou koncentrací CDC2 na konci růstu oocytů (Motlík *et al.*, 1998). MPF se podílí na procesu kondenzace chromozómů a rozpadu jaderné membrány (Meinecke *et al.*, 2001).

Znovuzahájení meiózy závisí na aktivaci MPF. cAMP inhibuje aktivní MPF a souběžně také potlačuje syntézu cyklinu B1, čímž se minimalizuje dostupnost pre-MPF. Degradace cyklinu B1 vede k disociaci komplexu CDC2/cyklin B1 a tímto mechanismem dochází ke snížení aktivity MPF (Dekel, 2005). Když buňky vstupují do M-fáze buněčného cyklu, MPF se aktivuje defosforylací aminokyselinových zbytků (Thr14 a Tyr15) a tento proces defosforylace je katalyzován enzymem CDC25 fosfatázou (Motlík *et al.*, 1998). Fosfatázy u savců obsahují tři izoformy A, B a C. CDC25B se uplatňuje při regulaci přechodu z G2-fáze do M-fáze v savčích oocytech, čímž reguluje znovuzahájení meiózy.

S MPF se přibližně ve stejnou dobu kolem GVBD aktivuje i MAPK. Bezprostředně po GVBD dosahují oba faktory významné aktivity a vrcholu dosahují při MI. Poté, MAPK zůstává stabilní při maximální aktivitě v průběhu přechodu z MI do MII a v MII, zatímco aktivita MPF výrazně klesá při přechodu z MI do MII, ale zvyšuje se opět v MII (Ye *et al.*, 2003). Inaktivace MPF je tedy přechodná (Dekel, 2005).

3.2.2.4 MAPK (mitogen aktivující protein kináza)

MAPK působí jako serin/threoninová kináza a patří do třídy extracelulárně regulovaných proteinkináz (ERK, extracellular signal-regulated kinases), které zprostředkovávají přenos signálu z vnějšího prostředí do buněk. MAPK uplatňující se v regulaci meiotického zrání jsou stimulovány přímo v kumulárních buňkách nebo oocytech. MAPK je aktivována MAP kináza kinázou (MAPKK, také MEK) (Meinecke *et al.*, 2001).

Veškeré množství MAPK je syntetizováno v rostoucích nekompetentních oocytech, kde není MAPK aktivována. Aktivace MAPK v kumulárních buňkách je nezbytná pro znovuzahájení meiotického zrání oocytů. Ale i aktivovaná MAPK v granulózních buňkách zastává důležitou úlohu ve zprostředkování správného působení LH. V prasečích granulózních buňkách je MAPK aktivována bezprostředně po působení FSH a LH (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007). MAPK zahrnuje 2 formy klíčové pro průběh meiotického zrání, ERK1 a ERK2. Během meiotického zrání jsou obě tyto formy fosforylovány. U prasečích oocytů je tomu tak do 24 hodin (Motlík *et al.*, 1998).

MAPK zodpovídá za přechod MI do MII (Meinecke *et al.*, 2001), další úlohou MAPK je podíl na tvorbě dělicích vřetének a podíl na druhém meiotickém bloku. Inhibice aktivní MAPK blokuje GVBD a časnou fosforylaci CX43, to znamená, že MAPK-dependentní dráha zprostředkovává LH-indukované narušení gap junction, kdy dojde ke snížení hladiny cAMP, a to vede k znovuzahájení meiotického zrání (Liang, Ch.-G. *et al.*, 2007).

MAPK je aktivována po působení MOS (kináza nadřazená MAPK) a PLK1 (polo-like kinase 1). MAPK a PLK1 jsou v nezralých oocytech neaktivní, jejich aktivace probíhá během znovuzahájení meiotického zrání v době aktivace cyklinu-B-CDC2. Po aktivaci zůstávají obě kinázy plně nebo téměř plně aktivní během přechodu z meiózy I do meiózy II. Při výstupu z MI má PLK1 stále značnou aktivitu. Nedostatečná aktivita PLK1 má za následek selhání okamžité aktivace cyklinu-B-CDC2, který je potřebný pro přechod MI do MII. Inhibice dráhy MOS-MAPK vede ke vstupu do S-fáze. Oocyty na konci meiózy I vypadají, že mají schopnost projít mitotický cyklus, ale dráha MOS-MAPK potlačuje tuto schopnost a předurčuje

oocyt ke vstupu přímo do meiózy II. Účinek dráhy MOS-MAPK je primárně zprostředkován P90RSK. Úlohou P90RSK je přímá fosforylace a inaktivace MYT1, která udržuje meiotický blok. V jedné dráze, MAPK spolu se zbytkovou aktivitou cyklinu-B-CDC2 a cyklinu-A-CDC2 udržují aktivitu PLK1, která udržuje potlačení MYT1. V druhé dráze udržuje MAPK aktivovaný CDC25. Obě dráhy umožňují nově shromáždit cyklin-B-CDC2, aby se stal aktivním. Prostřednictvím potlačení MYT1 je PLK1 základním mediátorem funkce MOS-MAPK-P90RSK pro zajištění přechodu MI do MII (Kishimoto, 2003).

3.3 Sulfan (H₂S) jako gasotransmitter

Reprodukční procesy jsou regulovány hormony a enzymy. Nicméně v poslední době bylo prokázáno, že dokonce i mnohem menší plynné molekuly - gasotransmitery - jsou zapojeny do reprodukčního procesu. Gasotransmitery jsou malé plynné signální molekuly produkované během metabolismu buněk. Snadno pronikají biologickými membránami a za přirozených podmínek se účastní biologických procesů (Šmelcová *et* Tichovská, 2011).

Do rodiny gasotransmiterů patří oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S). Tyto plyny byly dříve známy jen jako součást znečištěného ovzduší s toxickými efekty na organismus savců (Šmelcová *et* Tichovská, 2011). K odlišení NO, CO a H₂S od neurotransmiterů a humorálních faktorů bylo stanoveno několik kritérií, které musí splňovat, aby se nazývaly gasotransmitery:

- (1) Jsou to malé molekuly plynu.
- (2) Volně prostupují membránou. Jejich účinek není závislý na membránových receptorech.
- (3) Jsou endogenně a enzymaticky generovány a jejich generace je regulována.
- (4) Mají definované specifické funkce na fyziologicky relevantních koncentracích.
- (5) Jejich buněčné účinky mohou, ale nemusí být zprostředkovány druhými posly, ale měli by mít konkrétní buněčné a molekulární cíle. Například, NO a CO aktivují K_{Ca} kanály v plazmatické membráně buď přímo, nebo prostřednictvím cGMP (Wang, 2002).

Působení gasotransmiterů bylo popsáno v centrální nervové soustavě, v kardiovaskulárním systému a v reprodukční soustavě, jak samčí, tak i samičí. U samců všechny tři gasotransmitery ovlivňují erekci penisu, NO a CO působí na spermatogenezi a motilitu spermií. U samic NO, CO a H₂S tlumí kontrakce hladké svaloviny dělohy za březosti. NO a CO mají také vliv na vývoj samičích pohlavních buněk (Šmelcová *et* Tichovská, 2011).

3.3.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti H₂S

H₂S je bezbarvý plyn, těžší než vzduch, s molární hmotností 34,08 g/mol. H₂S je charakteristický silným zápachem po zkažených vejcích. Oxidací H₂S vzniká elementární síra, oxid siřičitý (SO₂) a sírany, jako je kyselina sírová (H₂SO₄). H₂S může být hydrolyzován na hydrogensulfid a sulfidové ionty v těchto po sobě následujících reakcích: $\text{H}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HS}^- \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{S}^{2-}$. Při fyziologickém pH 7,4 přibližně jedna třetina H₂S existuje jako nedisociovaná forma a dvě třetiny jsou hydrogensulfidový anion. Vzhledem ke své rozpustnosti v lipidech proniká H₂S snadno biologickými membránami (Reiffenstein *et al.*, 1992; Wang, 2002).

Toxicita H₂S je známa zhruba již 300 let. Hlavním důsledkem intoxikace H₂S je narušení respiračních center v mozkovém kmeni (Guidotti, 1996). Zotavení z akutní intoxikace je obvykle rychlé a úplné, v závislosti na míře expozice. Nicméně, některé příznaky mohou být nevratné v důsledku vedlejších účinků způsobených nedostatkem kyslíku v důsledku respirační paralýzy nebo plicního edému (Arnold *et al.*, 1985; Glass, 1990). Hranice mezi toxikologickými a fyziologickými účinky H₂S je velmi tenká. Savčí buňky mají regulační mechanismus pro řízení endogenní hladiny H₂S ve fyziologickém rozmezí, aby se zabránilo přeměně fyziologického účinku H₂S na vysoce toxický účinek (Wang, 2002).

H₂S je schopen modifikovat činnost mnoha enzymů. H₂S reguluje aktivitu proteinů přes proces sulfhydratace, kdy se připojí dodatečná síra na thiolovou skupinu (-SH) cysteinových zbytků, čímž vzniká hydropersulfid (-SSH). Tato post-translační modifikace postihuje 10 až 25 % proteinů. Pomocí sulfhydratace se například rychle zvyšuje aktivita enzymu glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázy, který zastává roli v procesu glykolýzy. Sulfhydratace může být důležitým mechanismem, který řídí mnoho dalších metabolických procesů v těle zvířat (Mustafa *et al.*, 2009). Dalším příkladem je účinek sulfhydratace u endoteliálních buněk a fibroblastů, kde došlo k post-translačním modifikacím u kinázy MEK1 na cysteinu 341, která je zapojena do průběhu aktivace MPF a MAPK (Zhao *et al.*, 2014).

3.3.2 Endogenní syntéza a metabolismus H₂S

V tkáni savců je H₂S produkován třemi enzymy. Ve většině tkání je H₂S produkován cystathionin beta-syntázou (CBS) a cystathionin gama-lyázou (CTH) (Wang, 2002). Třetím enzymem, který byl nalezen pro syntézu H₂S v mozku, je 3-merkaptopyruvát sulfur-transferáza (3-MPST) (Shibuya *et al.*, 2009).

CTH je důležitý především v kardiovaskulárním systému (Liu *et al.*, 2012), i když je považován za menšího přispěvatele k syntéze H₂S v mozku na základě své nízké úrovně exprese (Abe *et Kimura*, 1996). CBS produkuje H₂S buď hydrolýzou jeho substrátu cysteinu (Cys) nebo kondenzací Cys a homocysteinu (Hcy) (Chiku *et al.*, 2009). 3-MPST produkuje H₂S z 3-mercaptopyruvátu (3-MP). 3-MP je produkován pomocí enzymu cysteinové aminotransferázy (CAT) z cysteinu. H₂S produkováný enzymem 3-MPST je uložen jako vázané sulfany síry (persulfidy, polysulfidy a elementární síra), což umožňuje rychle uvolňovat H₂S v případě stimulace. Buňky exprimující 3-MPST a CAT mají zvýšenou hladinu vázaného sulfanu síry (Shibuya *et al.*, 2009).

Tyto enzymy používají jako substrát aminokyselinu L-cystein a produkují různé množství H₂S (Stárka, 2009). Dalším méně důležitým endogenním zdrojem H₂S je redukce elementární síry na H₂S pomocí redukčních ekvivalentů získané z oxidace glukózy (Searcy *et Lee*, 1998). Tento proces je vyjádřen rovnicí: $2 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{S}_0 + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3 + 6 \text{H}_2\text{S} + 3 \text{CO}_2$.

Tkáňové koncentrace endogenního H₂S se pohybují v rozmezí od 50 μM do 160 μM. Mechanismus degradace H₂S je nezbytný pro udržení dostatečné hladiny v tkáních. Za prvé, H₂S je oxidován na thiosulfid v mitochondriích, ten je později převeden na konečný produkt, sulfid. Druhou metabolickou cestou H₂S je metylace v cytosolu s thiol S-methyl-transferázou (TSMT) na methanethiol a dimethylsulfid (Furne *et al.*, 2001). H₂S se vylučuje převážně ledvinami jako volný nebo konjugovaný sulfát (Beauchamp *et al.*, 1984). Jako konečný produkt metabolismu CBS a CTH, vykazuje H₂S negativní zpětnou vazbu na aktivitu těchto enzymů. Zvýšená hladina H₂S potlačuje úroveň aktivity CTH (Kredich *et al.*, 1973) a rychlost glukoneogeneze z cysteinu (Simpson *et Freedland*, 1976).

Podobně jako na CO a NO, se H₂S váže na hemoglobin (Stárka, 2009), se kterým tvoří sulfhemoglobin. Hemoglobin a CO vytváří karboxyhemoglobin a připojením NO na hemoglobin je zformován nitrosylhemoglobin. Pokud je na hemoglobin navázán jeden z plynů, je vazba jiných plynů ovlivněna a jejich individuální schopnost působit na cílených buňkách může být změněna (Wang, 2002). Kromě toho může H₂S reagovat s NO, výsledkem je sloučenina nitrosothiol, která se podílí na zpětné regulaci aktivity NOS enzymu (Whiteman *et al.*, 2006).

3.3.3 Vliv H₂S na iontové kanály

Gasotransmitery jsou známé pro jejich selektivní interakce s různými typy iontových kanálů (Wang, 2004) (viz Obrázek č. 4). Mnoho z buněčných účinků H₂S je zprostředkováno právě iontovými kanály (Tang *et al.*, 2010).

Aktivace přechodného receptoru TRPV₁ (transient receptor potential vanilloid 1) a přechodného receptoru TRPA₁ (transient receptor potential ankyrin 1) pomocí H₂S má za následek kontrakci nonvaskulárního hladkého svalstva (močový měchýř, dýchací cesty) a zvyšuje sekreci Cl⁻ v tlustém střevě (Tang *et al.*, 2010).

K_{ATP} kanály

K_{ATP} kanály regulují membránový potenciál, a tím regulují hladinu intracelulárního Ca²⁺ (Nichols, 2006). V oocytech hraje dynamika intracelulárního Ca²⁺ klíčovou roli během oplození a embryonálního vývoje, včetně zrání oocytů. Přítomnost K_{ATP} kanálů v oocytech hraje zásadní roli ve funkci oocytů a může poskytnout ochranu při metabolickém stresu (Du *et al.*, 2010).

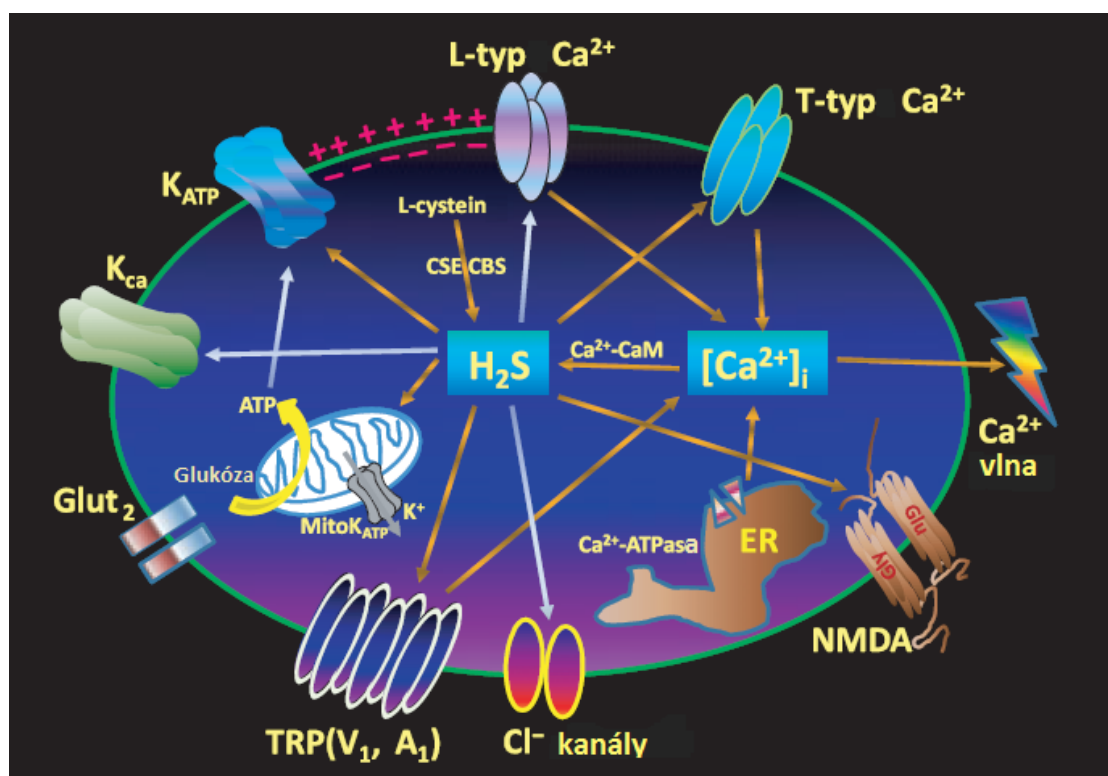
H₂S otevírá K_{ATP} kanály v buňkách hladké svaloviny cév (SMC, smooth muscle cells), kardiomyocytech, pankreatických beta buňkách, neuronech a gastrointestinálních SMC, a tím reguluje tonus v cévách, kontraktilitu myokardu, sekreci inzulínu, neurotransmisi a gastrointestinální kontraktilitu. Kromě toho, H₂S reguluje procesy zánětu, nocicepce, bolesti a buněčné smrti (Tang *et al.*, 2010). Antagonista K_{ATP} kanálu, glibenklamid, blokuje vasorelaxační účinky H₂S a ruší hyperpolarizaci buněčné membrány vyvolanou H₂S (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2004). H₂S aktivuje tři izoformy proteinové kinázy C (PKC) v kardiomyocytech, jedná se o izoformy α, ε a δ (Pan *et al.*, 2008). Stimulace PKC je spojena s aktivací K_{ATP} kanálů H₂S. H₂S aktivuje K⁺_{ATP} kanály a adenylátcyklázu ke zvýšení intracelulárního cAMP (Dombkowski *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2004).

Ca²⁺ kanály

H₂S inhibuje L-tytu Ca²⁺ kanály kardiomyocytů, ale stimuluje stejné kanály v neuronech, čímž reguluje intracelulární hladiny Ca²⁺ (Tang *et al.*, 2010). Ca²⁺ kanály T-tytu hrají klíčovou roli při zpracování somatických nebo viscerálních nociceptivních informací a mají pod kontrolou bolest (Kawabata *et al.*, 2007). H₂S funguje jako nociceptivní posel v průběhu zánětlivých procesů prostřednictvím aktivace Ca²⁺ kanálů T-tytu.

NMDA receptory

Receptor N-methyl-D-aspartové kyseliny (NMDA) je ionotropní receptor pro glutamát. NMDA receptor je heterotetramer skládající se ze dvou spojených podjednotek NR₁ a NR₂. Podjednotka NR₂ představuje vazebné místo pro neurotransmitter glutamát a její funkcí je kontrola elektrofyziologických vlastností NMDA receptorů (Tang *et al.*, 2010). V oocytech exprimujících NMDA receptory jsou na podjednotce NR₁ lokalizovány dva cysteiny (Cys744 a Cys798) a H₂S modifikuje tuto cysteinovou dvojici, aby NMDA receptor aktivoval (Sullivan *et al.*, 1994).



Obrázek č. 4: Vliv H₂S na iontové kanály (převzato a upraveno z Tang *et al.*, 2010).

3.3.4 Cílové orgánové systémy

H₂S je produkován v různých částech těla, v centrálním nervovém systému (Abe *et al.*, 1996), kardiovaskulárním systému (Zhao *et al.*, 2001) a v samčí (Srilatha *et al.*, 2007) a samičí reprodukční soustavě (Srilatha *et al.*, 2009).

H₂S, podobně jako NO, patří mezi molekuly, které se podílejí na přenosu informací mezi nervovými buňkami (Abe *et al.*, 1996). H₂S zesiluje proudy, které se podílejí

na regulaci synaptické plasticity pro učení a paměť (Tang *et al.*, 2010). Reguluje membránové iontové kanály v mozkové tkáni a činnost mnoha enzymů, které mohou ovlivnit mozkovou činnost (Abe *et al.*, 1996). Deficit v expresi CBS způsobuje hyperhomocysteinémii, což vede k předčasnému perifernímu a mozkovému okluzivnímu arteriálnímu onemocnění (Boers *et al.*, 1985). Podobně, homocysteinurie je autozomálně recesivně dědičná porucha (Mudd *et al.*, 1985), která může úzce souviset s nízkou endogenní produkcí H₂S. Na základě těchto pozorování uvedl Kamoun (2001) hypotézu, že akumulace H₂S v mozku může způsobit metabolickou intoxikaci.

V oběhovém systému H₂S, podobně jako NO, reguluje kontraktilitu cév a snižuje krevní tlak (Zhao *et al.*, 2001). Tyto účinky H₂S spočívají v působení na buňky hladké svaloviny. V buňkách hladkého svalstva H₂S zvyšuje propustnost K_{ATP} kanálů a následně hyperpolarizují buněčnou membránu. Produkce H₂S může zlepšit například působení NO (Stárka, 2009).

V samčí reprodukční soustavě působí endogenní H₂S jako látka, která usnadňuje erekci penisu. H₂S se podílí na relaxaci hladkého svalstva v krevních cévách, což je jednou ze základních příčin erekce penisu (Srilatha *et al.*, 2006). Na základě těchto výsledků by H₂S mohl sloužit jako alternativní medicína v boji proti poruchám erekce. Ve varlatech byly také zaznamenány koncentrace enzymů CBS a CTH (Sugiura *et al.*, 2005), čímž by se mohl H₂S podílet na regulaci funkcí varlete.

Reprodukční systém samic

Enzymy CBS a CTH byly prokázány v děloze, fetální membráně a v placentě (Patel *et al.*, 2009). Guzman *et al.* (2006) prokázali vliv enzymu CBS na plodnost, kdy blokovaný gen pro CBS způsobil snížení počtu vyvíjejících se folikulů a kratší a nepravidelný estrální cyklus. Potlačená exprese enzymu CBS v granulózních buňkách vede k inhibici meiotického zrání oocyty (Liang, R. *et al.*, 2007).

H₂S se podílí na regulaci kontraktility děložní svaloviny. Nízké dávky H₂S snižují kontrakce dělohy, a tím způsobují oddálení porodu (Sidhu *et al.*, 2001). Sulfidové ionty brání navázání oxytocinu na jeho receptory, což způsobuje potlačení děložních kontrakcí. Blokování oxytocinu H₂S je pravděpodobně mechanismus, který může oddálit porodní bolesti (Hayden *et al.*, 1989). H₂S uvolňuje hladké svalstvo reprodukčního systému prostřednictvím signální dráhy NO a zvyšuje propustnost K_{ATP} kanálů (Srilatha *et al.*, 2009).

V nepřítomnosti dodatečného L-cysteinu produkují všechny nitroděložní tkáně velmi nízké hladiny H₂S. Přídavkem L-cysteinu významně zvyšuje produkci H₂S ve všech tkáních, ale játra produkují H₂S výrazně vyšší rychlostí ve srovnání se všemi intrauterinními tkáněmi (Patel *et al.*, 2009), což je pravděpodobně v důsledku vysoké exprese CTH v játrech (Swaroop *et al.*, 1992). Dle Patela *et al.* (2009) produkovala děloha H₂S ve větší míře než placenta a plodové obaly, zatímco nejnižší rychlost produkce byla pozorována u placenty. Patel *et al.* (2009) také prokázali, že za podmínek nízkého obsahu kyslíku byla významně zvýšena rychlost produkce H₂S v intrauterinních tkáních, především v děloze a plodových obalech. Enzymy CBS a CTH tak mohou být přímo ovlivněny kyslíkem. Nízká hladina kyslíku se označuje jako hypoxie a je spojena s pre-eklamsií, kde špatná funkce placenty může snížit přísun kyslíku a živin k plodu, a vede k intrauterinní růstové retardaci (IUGR) a k dalším poruchám placenty. Hypoxie může také způsobit další pre-eklamptické příznaky, jako je uvolňování zánětlivých cytokinů a oxidační stres (Agarwal *et al.*, 2005; Soleymanlou *et al.*, 2005). Zvýšená produkce H₂S za hypoxických podmínek by mohla hrát roli v patologii pre-eklampsie.

3.3.5 Úloha H₂S v průběhu meiotického zrání oocytů

Nevoral *et al.* (2015) jako první potvrdili jak přítomnost mRNA, tak i přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v prasečích oocytech a jejich roli v meiotickém zrání a kumulární expanzi. mRNA a proteiny z enzymů uvolňujících H₂S ukazují specifickou úlohu těchto enzymů v období růstu a zrání oocytů. Zatímco mRNA CTH byl přítomen na téměř konstantní úrovni pro celou dobu růstové a zrací fáze, přítomnost mRNA CBS v oocytu je omezená na období růstové fáze. mRNA 3-MPST byl zaznamenán krátce před znovuzahájením meiózy, čímž by mohlo být odkazováno na úlohu 3-MPST jako na nezbytný enzym pro meiotickou kompetenci.

Dalším důležitým poznatkem Nevorala *et al.* (2015) je, že efektivní trojkombinace (3C_i) všech inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S potlačila meiotické zrání a ovlivnila kumulární expanzi. To naznačuje, že jednotlivé enzymy jsou schopné nahradit se navzájem, a proto pouze paralelní inhibice všech enzymů uvolňujících H₂S má významný důsledek. Podobný mechanismus substituce enzymů uvolňujících H₂S se podle Sanokawa-Akakura *et al.* (2014) také očekává v somatických buňkách.

Nevoral *et al.* (2015) také zjistili, že účinek 3C_i byl zjištěn u zralých MII oocytů, nikoliv v GV oocytech. To naznačuje, že nezralé nekultivované GV oocyty obsahují dostatečné množství endogenního H₂S, a není nutná enzymatická generace ke zvýšení jeho hladiny.

Raná stádia oocytů jsou tak schopna využít zásobní H₂S a zralé oocyty jsou plně závislé na aktivitě enzymů uvolňujících H₂S.

H₂S významně urychluje zrání prasečích oocytů *in vitro*. Meiotické zrání oocytů urychluje dřívější zvýšení hladiny MPF a MAPK, které regulují zrání oocytů (Nevoral *et al.*, 2014). Jedním z mechanismů regulace by mohla být schopnost H₂S ovlivňovat aktivitu různých faktorů a kináz procesem sulfhydratace. Sulfhydratací tak H₂S může upravovat a řídit procesy meiotického zrání oocytů. V somatických buňkách H₂S stimuluje signální dráhy cAMP/PKA (Njie-Mbye *et al.*, 2012) a PI3K/AKT (Huang *et al.*, 2010).

H₂S ovlivňuje přímo oocyt. U oocytů kultivovaných již bez kumulárních buněk bylo zrychlené zrání mnohem výraznější. Příčinou je pravděpodobně menší množství dostupného H₂S pro oocyt, jelikož je H₂S zadržován v kumulárních buňkách nebo v extracelulární matrix produkované těmito buňkami. Navíc H₂S může vyvolat procesy zpomalující zrání oocytů v kumulárních buňkách (Tanghe *et al.*, 2002). Proto je H₂S indukované meiotické zrání oocytů rychlejší bez přítomnosti kumulárních buněk (Nevoral *et al.*, 2014).

Kyselina hyaluronová (HA) v extracelulární matrix kumulárních buněk slouží jako marker kumulární expanze. U kumulo-oocytárních komplexů (COCs, cumulus-oocyte complexes) je inhibována produkce HA. H₂S významně ovlivňuje tvorbu HA ve druhé části kultivace COCs (Nevoral *et al.*, 2014). Mechanismus účinku H₂S na kumulární expanzi je dosud neobjasněný. Jednou z možností by mohl být vliv na signální dráhy cAMP/PKA (Njie-Mbye *et al.*, 2012), která reguluje kumulární expanzi. Možné cílové molekuly pro exogenní H₂S mohou být i někteří členové superrodiny TGF-beta, které podléhají regulaci H₂S, a poté mají vliv na aktivitu HA-syntázy 2 v kumulárních buňkách (Dragovic *et al.*, 2005).

Krejčová *et al.* (2015) potvrdili úlohu H₂S v průběhu procesu stárnutí prasečích oocytů v podmínkách *in vitro*. Snížená produkce H₂S je jeden z biochemických markerů doprovázející stárnutí oocytů. Inhibice endogenní produkce H₂S vede k apoptóze a NaSH jako exogenní donor H₂S zabrání apoptóze tím způsobem, že zlepšit mitochondriální dysfunkce a potlačí signální dráhy kaspázy-3 (Li *et al.*, 2014). Tato hypotéza o účinnosti H₂S u savčích oocytů zatím nebyla doposud potvrzena. Sulfhydratací může mít H₂S vliv na aktivitu pro-apoptotických a anti-apoptotických (Sen *et al.*, 2012).

Gasotransmitery zasahují do regulace hypotalamo-hypofýzo-gonádotropní osy *in vivo* (Lamar *et al.*, 1996; Prevot *et al.*, 1999; Mancuso *et al.*, 2010). Sitdikova *et al.* (2010) dokázali

vliv H₂S na regulaci hypofyzárních buněk. Celkové účinky H₂S vyústí v regulaci sekrece gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH) a v modulaci gonadální aktivity při uvolňování hormonů. Je zřejmé, že pozorované účinky H₂S na *in vitro* meiotické zrání oocytů jsou jen zlomkem mnoha schopností, kterými H₂S disponuje, včetně interakcí gasotransmiterů (Nevoral *et al.*, 2015).

Zatímco byl H₂S ověřen jako signální molekula v prasečích oocytech, stejně jako přítomnost jednotlivých enzymů uvolňujících H₂S, dosud zůstává neobjasněná interakce jednotlivých enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech během meiotického zrání.

4 Materiály a metodika

4.1 Izolace oocytů

Vaječníky byly získávány od 6 až 8 měsíců starých necyklujících prasniček z jatek (Jatky Příbram), odkud byly dopravovány při teplotě 39 °C do laboratoře. V laboratoři byly z ovariálních folikulů o průměru 2 až 5 mm aspirovány pomocí injekční stříkačky a jehly (20G) kumulo-oocytární komplexy (COCs). Selektce a manipulace s COCs se prováděla pod stereomikroskopem pomocí skleněné pipety. Pro následné využití pro experiment byly vybírány plně dorostlé nezralé oocyty ve stádiu GV s neporušenou cytoplazmou a se souvislou vrstvou kumulárních buněk. Část nezralých GV oocytů byla zbavena kumulárních buněk a zpracována stejně jako oocyty dozrálé po 48 hod. *in vitro* (viz níže).

4.2 Kultivace oocytů v podmínkách *in vitro*

Vybrané COCs dozrávaly v modifikovaném médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA), doplněném o 32,5 mM bikarbonátu sodného, 2,75 mM laktátu vápenatého, 0,025 mg/ml gentamicinu, 6,3 mM HEPES, gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 IU eCG: 6,6 IU hCG/ml (P.G.600; Intervet International B.V., Holland) a 5 % (v/v) fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich, USA). Kultivace COCs probíhala ve 4-jamkových Petriho miskách (Nunc, Fisher Scientific, USA), kde byl připraven 1,0 ml kultivačního média, a při teplotě 39 °C za přítomnosti směsi vzduchu s 5 % CO₂ byly COCs kultivovány po dobu 48 hodin. Po ukončení kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk opakovaným pipetováním.

4.3 Imunocytochemie

Izolované oocyty a *in vitro* dozrálé MII oocyty byly zbaveny obalu *zona pellucida* 0,5 % pronázou (Sigma) a oocyty byly fixovány 40 minut ve 2 % formaldehydu při laboratorní teplotě, následovalo promytí oocytů v roztoku PBS-NaN₃ a 40 minut byly permeabilizovány v PBS- NaN₃ s 0,1 % Triton-X-100 (PBS-NaN₃-TX). Dále byly oocyty inkubovány po dobu 25 minut v PBS-NaN₃-TX, do kterého bylo přidáno 5 % normálního kozího séra (NGS). Poté přes noc probíhala inkubace oocytů při teplotě 4 °C s primární králičí nebo myší polyklonální anti-CBS (cystathionin beta-syntáza), polyklonální anti-CTH (cystathionin gama-lyáza) a polyklonální anti-3-MPST (3-merkaptopyruvat sulfur-transferáza). Následně byly oocyty

dvakrát promyty a poté byly inkubovány s fluorescein isothiokyanátem (FITC) nebo kyanorhodaminem (Cy5), konjugovaným s kozím anti-králičím nebo anti-myším IgG (1:200; Invitrogen, Fisher Scientific, USA) při laboratorní teplotě po 40 minut. Poté byly oocyty dvakrát promyty PBS-NaN₃-TX s 1 % NGS a poté byly montovány do Vectashield s 4'6'-diamidino-2-phenylindolem (DAPI; Vector Laboratories, USA). Negativní kontroly prošly stejným postupem, s tím rozdílem, že byly vynechány specifické primární protilátky.

4.4 Analýza obrazu

Snímky byly pořízeny pomocí invertovaného Ti-U mikroskopu (Nikon, Japan), CCD kamery Clara Interline (Andor Technology PLC, Northern Ireland) a programu NIS Elements Ar (Laboratory Imaging, Czech Republic). Analýza obrazu, spolu s 2D dekonvolucí, byla provedena na základě intenzity signálu CBS, CTH nebo 3-MPST. Od signálu těchto enzymů byla odečtena intenzita signálu negativní kontroly. Následně byla provedena kolokalizační analýza vždy dvou signálů vyskytujících se v jednom oocytu (FITC a Cy5). Míra překryvu byla vyjádřena hodnotou Manderova koeficientu a míra korelace obou signálů byla vyjádřena hodnotou Pearsonova koeficientu. Manderův koeficient označuje překrytí signálů a představuje skutečnou míru kolokalizace. Nabývá hodnot od 0 do 1, přičemž 0,5 znamená, že 50 % z obou vybraných signálů kolokalizuje. Pearsonův koeficient popisuje korelaci intenzity mezi dvěma kanály. Nabývá hodnot od -1,0 do 1,0, přičemž 1 znamená úplnou korelaci, 0 znamená žádnou významnou korelaci a -1,0 označuje úplnou negativní korelaci. Korelační závislost obou koeficientů byla stanovena jako střední závislost, když se jejich hodnoty nacházely v intervalu 0,5 až 0,7. S ohledem na to, pokud jeden z koeficientů dosahoval hodnoty nad 0,7 a zároveň druhý koeficient hodnoty 0,7 nedosahoval, byla i přesto tato závislost vyhodnocena jako střední. Pro vysokou korelační závislost byl stanoven interval od 0,7 do 0,9.

4.5 Statistická analýza

K analýze dat získaných z experimentů byla použita ANOVA metoda (t-test) ve statistickém programu Statistica 12. Za statisticky významný rozdíl mezi výsledky u porovnávaných skupin byla stanovena hladina statistické významnosti na hodnotu $P < 0,05$.

4.6 Design experimentů

4.6.1 Experiment č. 1

Přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech prasete.

Cílem experimentu bylo prokázat přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST uvolňujících H₂S v prasečích oocytech kultivovaných v podmínkách *in vitro*. K dosažení výsledků bylo použito metody imunocytochemie. Pro tuto analýzu byly použity nezralé a plně dorostlé GV oocyty a oocyty dozrálé do stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivace.

4.6.2 Experiment č. 2

Vliv specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S na průběh meiotického zrání oocytů.

Cílem experimentu bylo stanovit procentuální zastoupení prasečích oocytů nacházejících se v MII fázi meiotického zrání *in vitro* kultivace ošetřených specifickými inhibitory enzymů uvolňujících H₂S. K dosažení výsledků byla inhibitorem pro CBS kyselina oxamová, pro CTH to byl DL-propargylglycin a pro 3-MPST kyselina α -ketoglutarová. Analyzovaly se jednotlivé specifické inhibitory pro každý enzym, dvojkombinace a trojkombinace inhibitorů. Po 48 hodinách kultivace byla hodnocena úspěšnost meiotického zrání oocytů kultivovaných se specifickými inhibitory vůči kontrolní skupině zrající obvyklým způsobem bez přidání inhibitorů.

4.6.3 Experiment č. 3

Vzájemná distribuce enzymů a vyjádření jejich závislosti.

Cílem experimentu bylo prokázat vzájemnou distribuci enzymů uvolňujících H₂S a vyjádřit jejich závislost. K dosažení výsledků byla použita kolokalizační analýza (Manderův a Pearsonův koeficient). Pro tuto analýzu byly použity nezralé a plně dorostlé GV oocyty a oocyty dozrálé do stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivace (viz Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Počty analyzovaných oocytů v jednotlivých kombinacích enzymů.

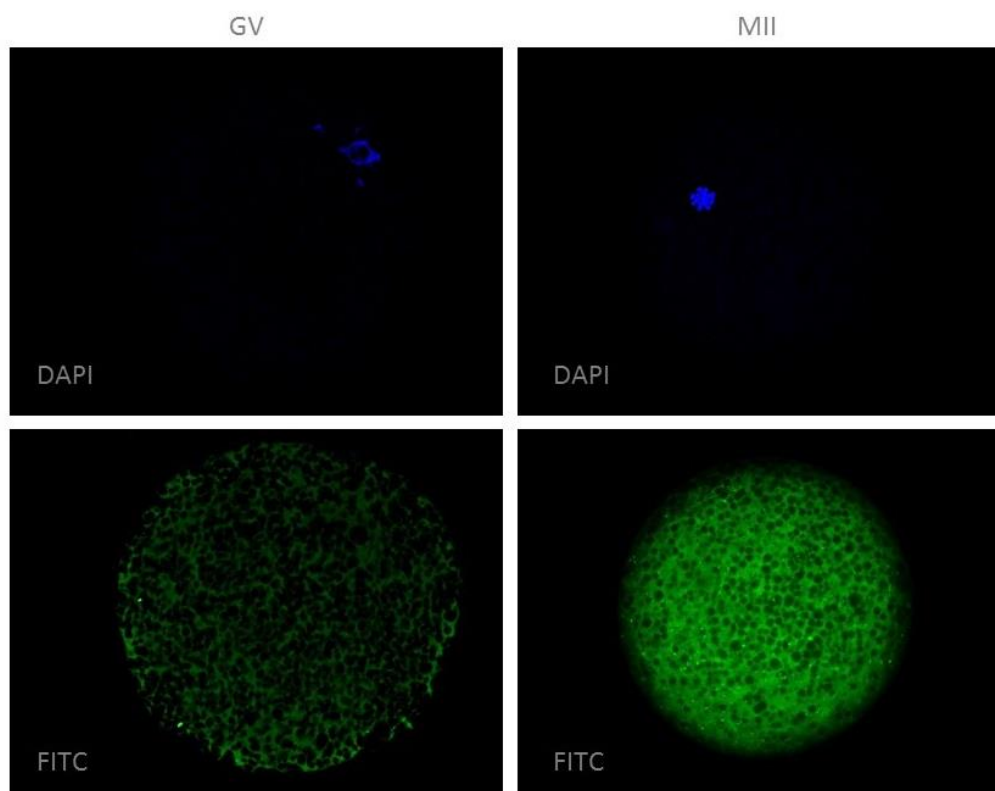
	Stádium GV	Stádium MII	Celkem oocytů
Kombinace CBS-CTH	28	45	73
Kombinace CBS-3-MPST	20	21	41
Kombinace 3-MPST-CTH	36	12	48

5 Výsledky

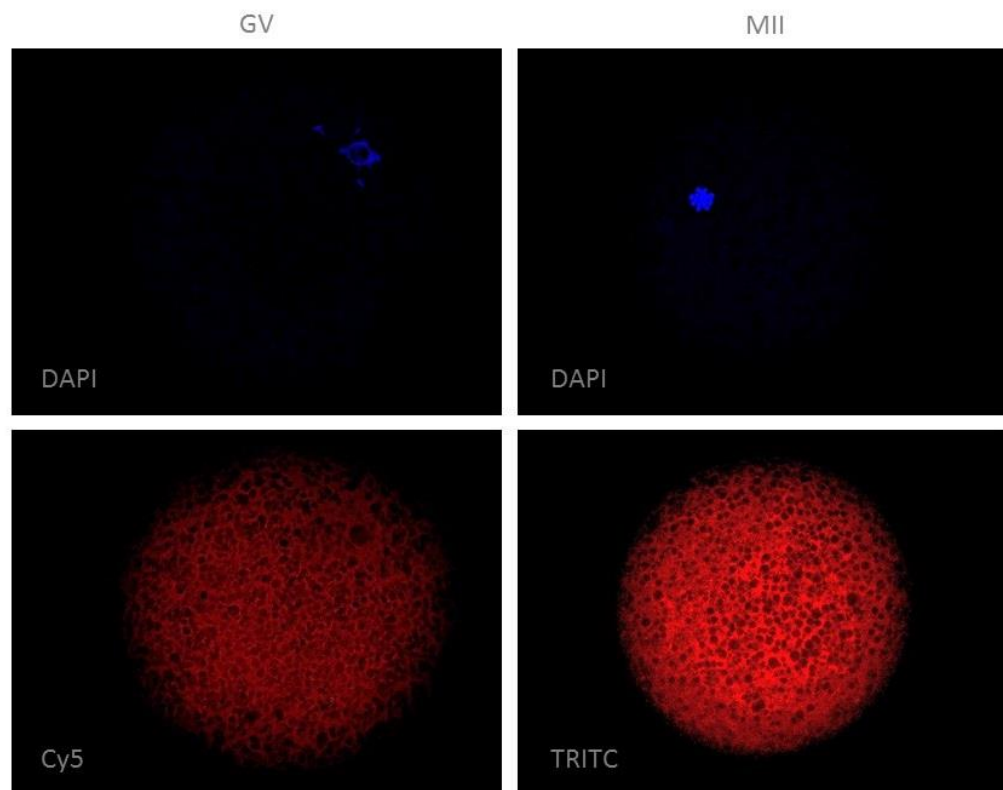
5.1 Přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech prasete

Cílem experimentu bylo prokázat přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v prasečích oocytech. V experimentu byly použity specifické protilátky, pro porovnání byla testována i negativní kontrola oocytů, jejíž kultivace probíhala bez specifických protilátek.

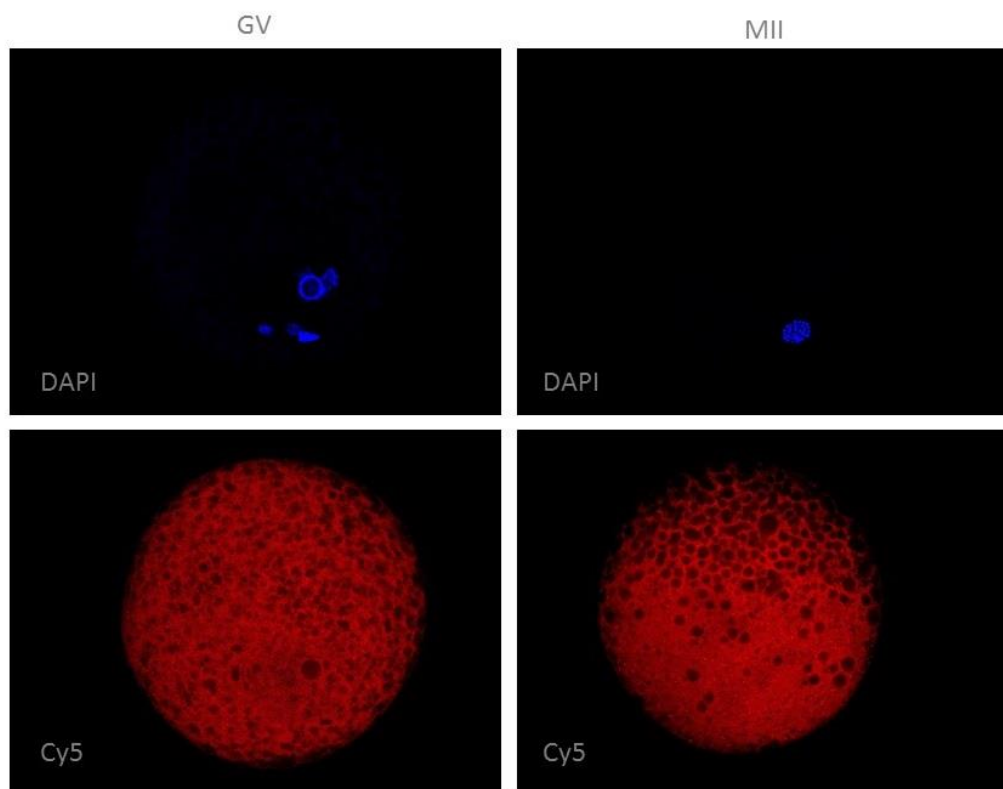
Přítomnost enzymů CBS, CTH a 3-MPST v oocytech prasete byla prokázána prostřednictvím imunocytochemické lokalizace proteinů a analýzy obrazu (viz Obrázek č. 5 – 7). Testovanými skupinami byly nezralé a plně dorostlé GV oocyty a oocyty dozrálé po 48 hod. *in vitro* kultivace do stádia MII.



Obrázek č. 5: Imunocytochemická lokalizace enzymu CBS v GV a MII oocytu. DAPI: DNA; FITC: CBS. Zvětšení 400x.



Obrázek č. 6: Imunocytochemická lokalizace enzymu CTH v GV a MII oocyty. DAPI: DNA; Cy5 a TRITC: CTH. Zvětšení 400x.



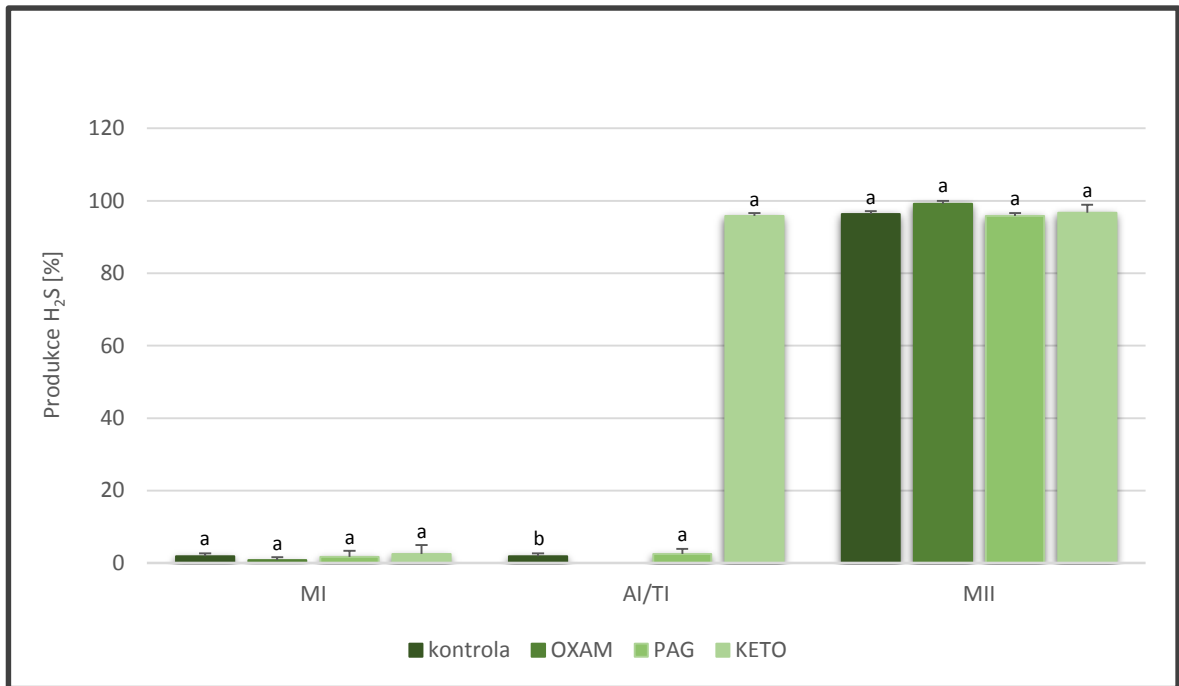
Obrázek č. 7: Imunocytochemická lokalizace enzymu 3-MPST v GV a MII oocyty. DAPI: DNA; Cy5: 3-MPST. Zvětšení 400x.

5.2 Vliv specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S na průběh meiotického zrání oocytů

Cílem experimentu bylo potvrdit vliv enzymů uvolňujících H₂S (CBS, CTH a 3-MPST) na průběh meiotického zrání oocytů. V experimentech byly použity specifické inhibitory enzymů uvolňujících H₂S, které zamezily správné funkci těchto enzymů. Pro porovnání byla testována i kontrolní skupina enzymů, jejíž kultivace probíhala bez přidání inhibitorů. Každá testovaná skupina čítala 120 oocytů, které byly kultivovány *in vitro* 48 hodin.

Jako první byl zkoumán vliv jednotlivých specifických inhibitorů pro každý enzym. Kdy pro enzym CBS to byl inhibitor kyselina oxamová (OXAM; 4 mM), pro enzym CTH to byl DL-propargylglycin (PAG; 2 mM) a pro enzym 3-MPST byla inhibitorem kyselina α -ketoglutarová (KETO; 10 mM). Kontrolní skupina byla kultivována bez přidání inhibitorů.

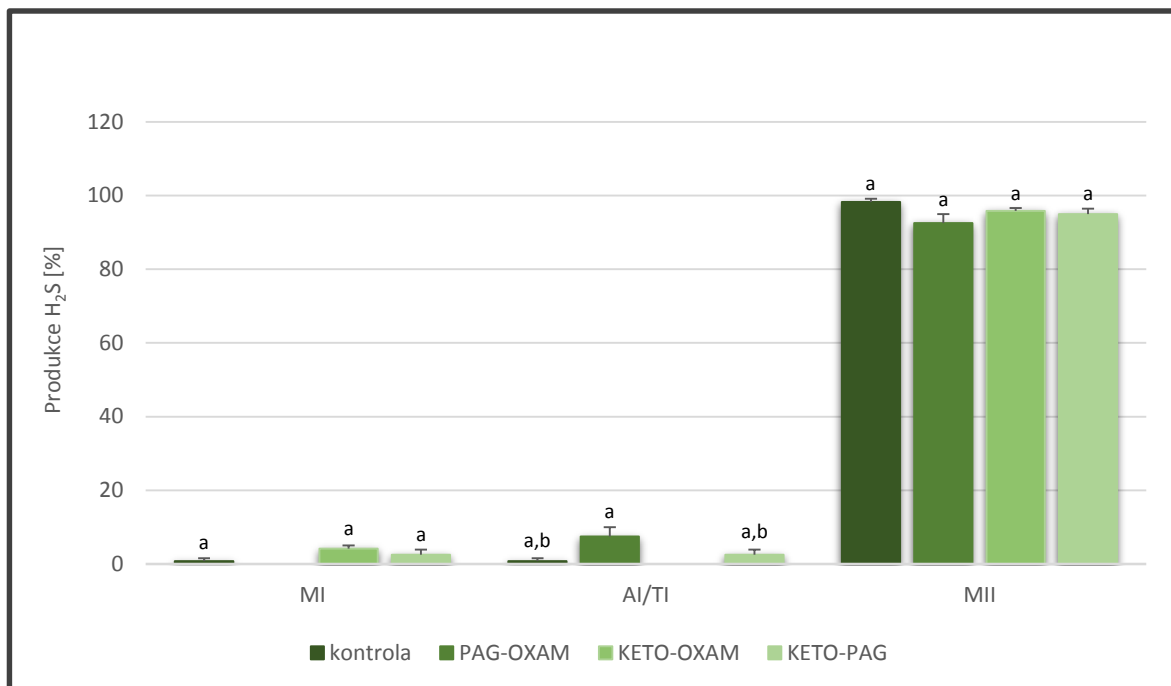
Z výsledků zanesených do grafického znázornění (viz Graf č. 1) vyplývá, že podíl oocytů, které během meiotického zrání dosáhly stádia MII ve stejném čase, se po přidání jednotlivých inhibitorů ve srovnání s kontrolní skupinou neliší, obě skupiny dosáhly hodnot nad 95 %. Z toho lze usoudit, že jednotlivé inhibitory enzymů uvolňujících H₂S neovlivňují průběh meiotického zrání oocytů.



Graf č. 1: Účinek jednotlivých specifických inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů na meiotické zrání oocytů po kultivaci 48 hodin. MI: metafáze I; AI/TI přechod z anafáze I do telofáze I; MII: metafáze II; kontrola: kontrolní skupina; OXAM: 4 mM kyseliny oxamové (inhibitor CBS); PAG: 2 mM DL-propargylglycinu (inhibitor CTH); KETO: 10 mM kyseliny α -ketoglutarové (inhibitor 3-MPST). Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ve stejném stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$).

V další části experimentu bylo testováno, jestli by mohla mít vliv na meiotické zrání oocytů dvojkombinace specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S. Dvojkombinace byly stanoveny následovně: 1) 2 mM PAG a 2 mM OXAM, 2) 5 mM KETO a 2 mM OXAM a 3) 5 mM KETO a 2 mM PAG. Kontrolní skupina byla opět kultivována bez přidání dvojkombinace inhibitorů.

Z výsledků je patrné, že po 8 hod. meiotického zrání dosáhly oocyty stádia MII se srovnatelnou úspěšností ve srovnání s kontrolní skupinou, jelikož hodnoty dosahovaly 92,5 až 95,8 % u experimentálních skupin a 98,3 % u skupiny kontrolní (viz Graf č. 2). Z toho je možné usoudit, že dvojkombinace inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů neovlivňují průběh meiotického zrání oocytů.

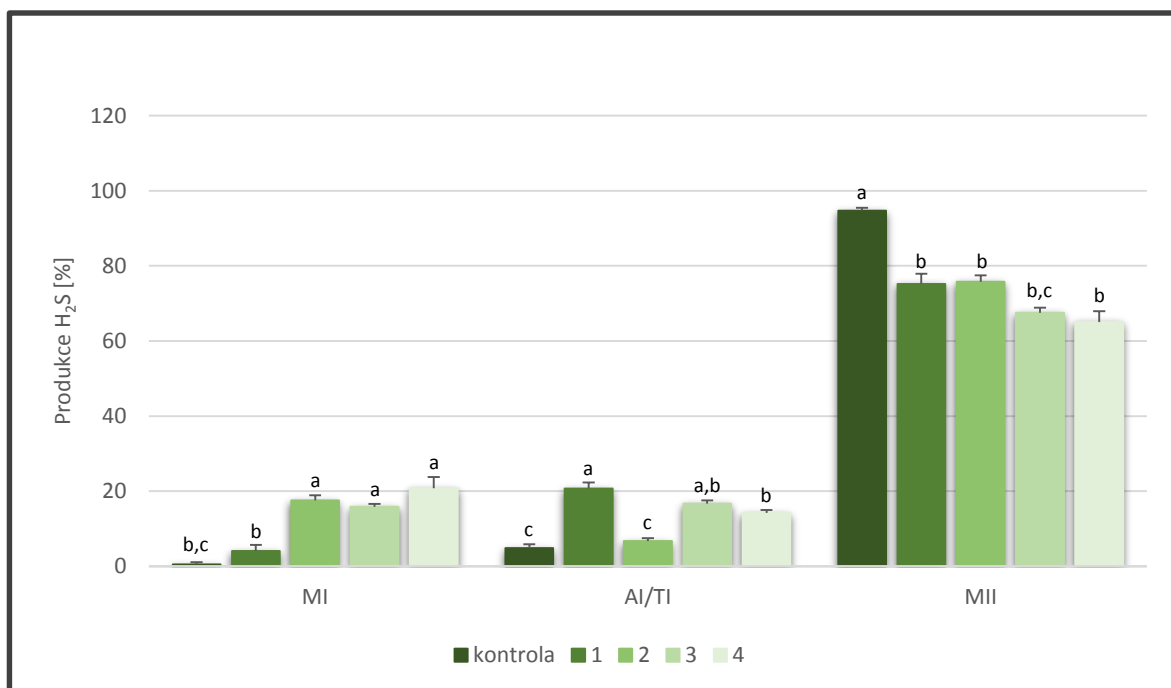


Graf č. 2: Účinek dvojkombinace specifických inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů na meiotické zrání oocytů po kultivaci 48 hodin. MI: metafáze I; AI/TI přechod z anafáze I do telofáze I; MII: metafáze II; kontrola: kontrolní skupina; PAG-OXAM: 2 mM DL-propargylglycinu a 2 mM kyseliny oxamové; KETO-OXAM: 5 mM kyseliny α -ketoglutarové a 2 mM kyseliny oxamové; KETO-PAG: 5 mM kyseliny α -ketoglutarové a 2 mM DL-propargylglycinu. Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ve stejném stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$).

V poslední části experimentu byl zkoumán vliv trojkombinace specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S na meiotické zrání oocytů. Trojkombinace obsahovaly různé koncentrace inhibitorů, a to: 1) 0,25 mM OXAM, 0,25 mM PAG a 0,5 mM KETO, 2) 0,5 mM OXAM, 0,5 mM PAG a 1 mM KETO, 3) 1 mM OXAM, 1 mM PAG a 2,5 mM KETO a 4) 2 mM OXAM, 2 mM PAG a 5 mM KETO. Kontrolní skupina byla opět kultivována bez přidání trojkombinace inhibitorů.

Z výsledků experimentu je patrné, že trojkombinace specifických inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů měly signifikantní vliv na meiotické zrání. Podíl oocytů, které během meiotického zrání dosáhly stádia MII ve stejném čase, má po přidání trojkombinace inhibitorů ve srovnání s kontrolní skupinou tendenci se snižovat, kdy hodnota u kontrolní skupiny byla 94,7 %, zatímco u experimentálních skupin se hodnoty pohybovaly od 65,0 až 75,8 % (viz Graf č. 3). Průběh meiotického zrání u experimentálních skupin obsahující

inhibitory oproti kontrolní skupině kultivované klasickým způsobem se se zvyšujícím počtem inhibitorů zpomaluje. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že všechny enzymy uvolňující H₂S hrají úlohu v průběhu meiotického zrání oocytů.

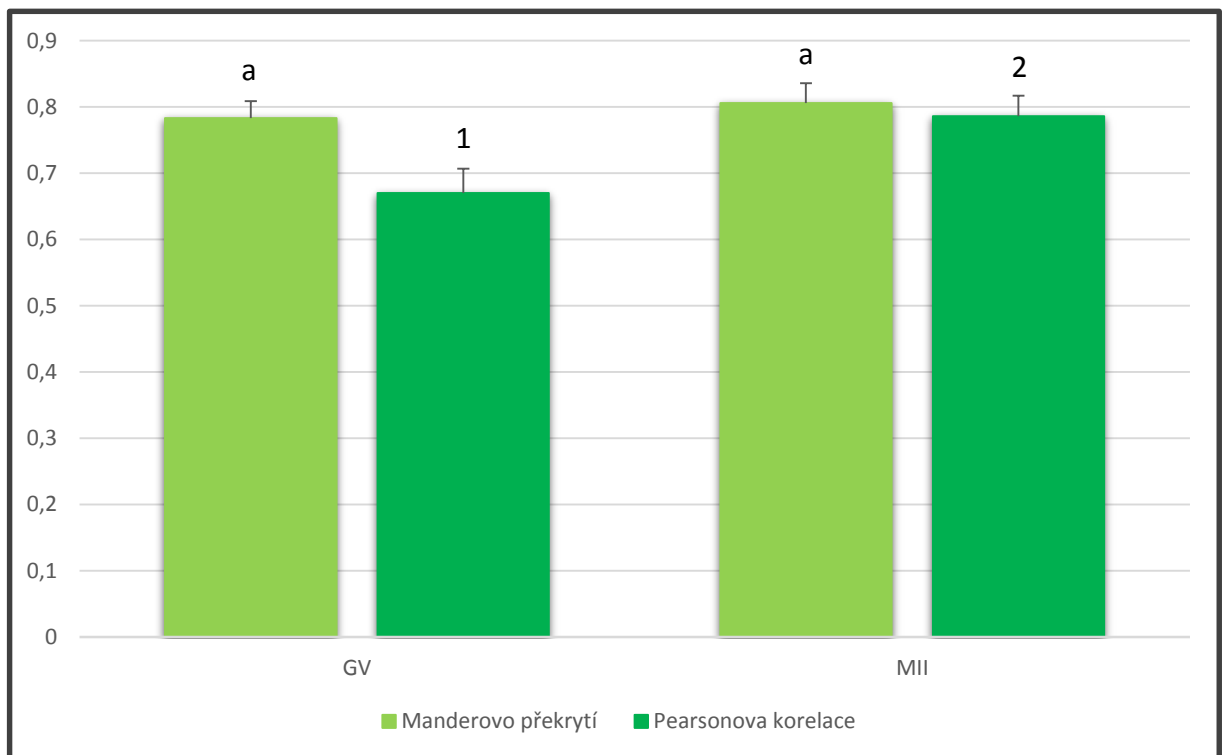


Graf č. 3: Účinek trojkombinace specifických inhibitorů H₂S-uvolňujících enzymů v různé koncentraci na meiotické zrání oocytů po kultivaci 48 hodin. MI: metafáze I; AI/TI přechod z anafáze I do telofáze I; MII: metafáze II; kontrola: kontrolní skupina; 1) 0,25 mM OXAM, 0,25 mM PAG a 0,5 mM KETO; 2) 0,5 mM OXAM, 0,5 mM PAG a 1 mM KETO; 3) 1 mM OXAM, 1 mM PAG a 2,5 mM KETO; 4) 2 mM OXAM, 2 mM PAG a 5 mM KETO. Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ve stejném stádiu meiotického zrání (P < 0,05).

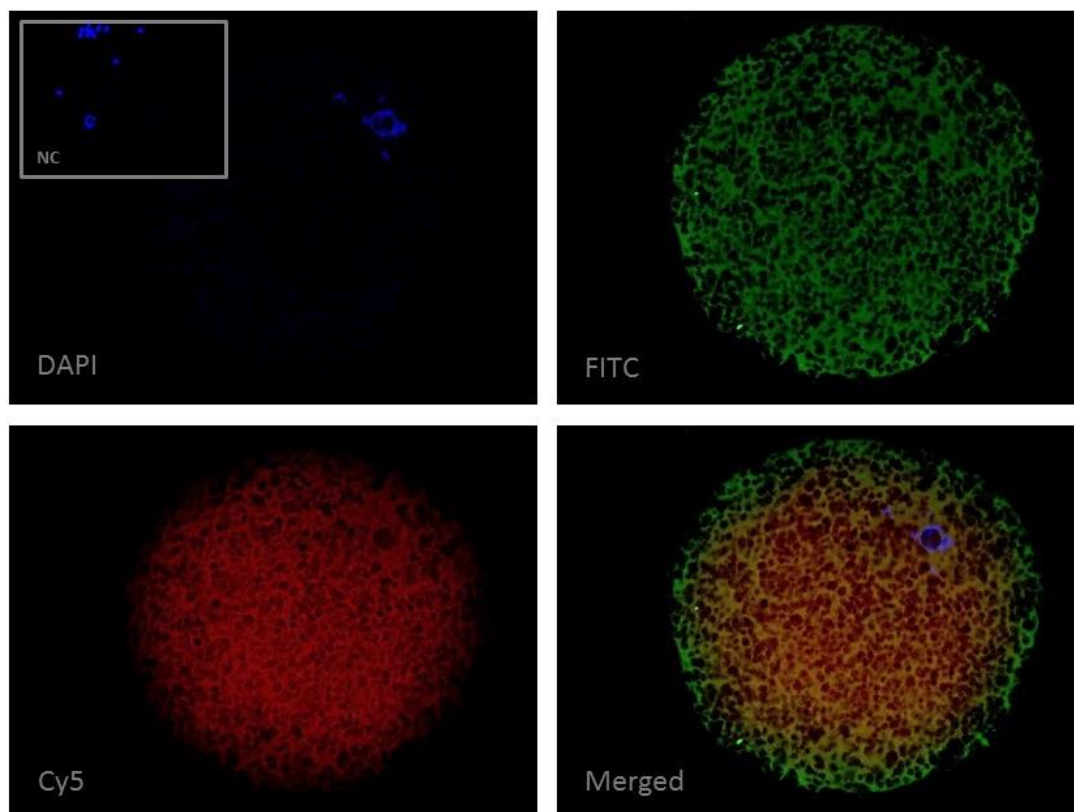
5.3 Vzájemná distribuce enzymů a vyjádření jejich závislosti

Cílem experimentu bylo prokázat vzájemnou distribuci enzymů uvolňujících H₂S a vyjádřit jejich závislost. Na základě specifických protilátek byla provedena kolokalizační analýza vždy dvou signálů v jednom oocytu, která vyhodnocovala vzájemnou lokalizaci enzymů. Výstupem byly hodnoty Manderova koeficientu překrývání (R) a Pearsonova korelačního koeficientu (Rr). Testování probíhalo u nezralých GV oocytů a oocytů dozrálých do stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivace.

Na základě kolokalizační analýzy byly pro kombinaci enzymů CBS a CTH (viz Obrázek č. 8) u GV oocytů zjištěny střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,783 \pm 0,026$ a $Rr = 0,67 \pm 0,037$. Výsledky indikují střední stupeň korelační závislosti mezi distribucí enzymů CBS a CTH u GV oocytů, což znamená, že mohou být tyto enzymy vzájemně distribuovány, ale současně se v oocytech vyskytují také samostatně. U dozrálých MII oocytů byly střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,806 \pm 0,03$ a $Rr = 0,786 \pm 0,031$, kde nárůst Rr byl statisticky signifikantní. Výsledky indikují vysoký stupeň korelační závislosti, a tím i interakci mezi enzymy CBS a CTH u dozrálých MII oocytů (viz Graf č. 4).

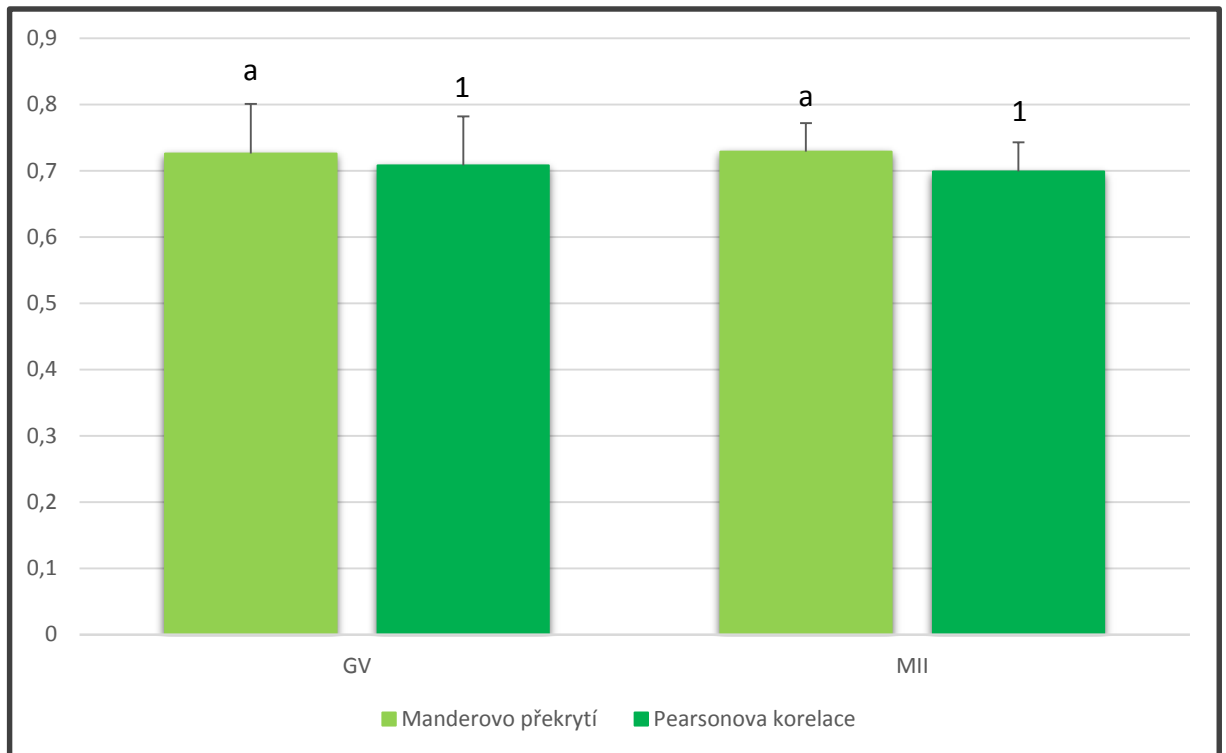


Graf č. 4: Porovnání hodnot Manderova překrytí a Pearsonové korelace u kombinace enzymů CBS a CTH v nezralých GV oocytech a dozrálých MII oocytech. ^{a,b;1,2}Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

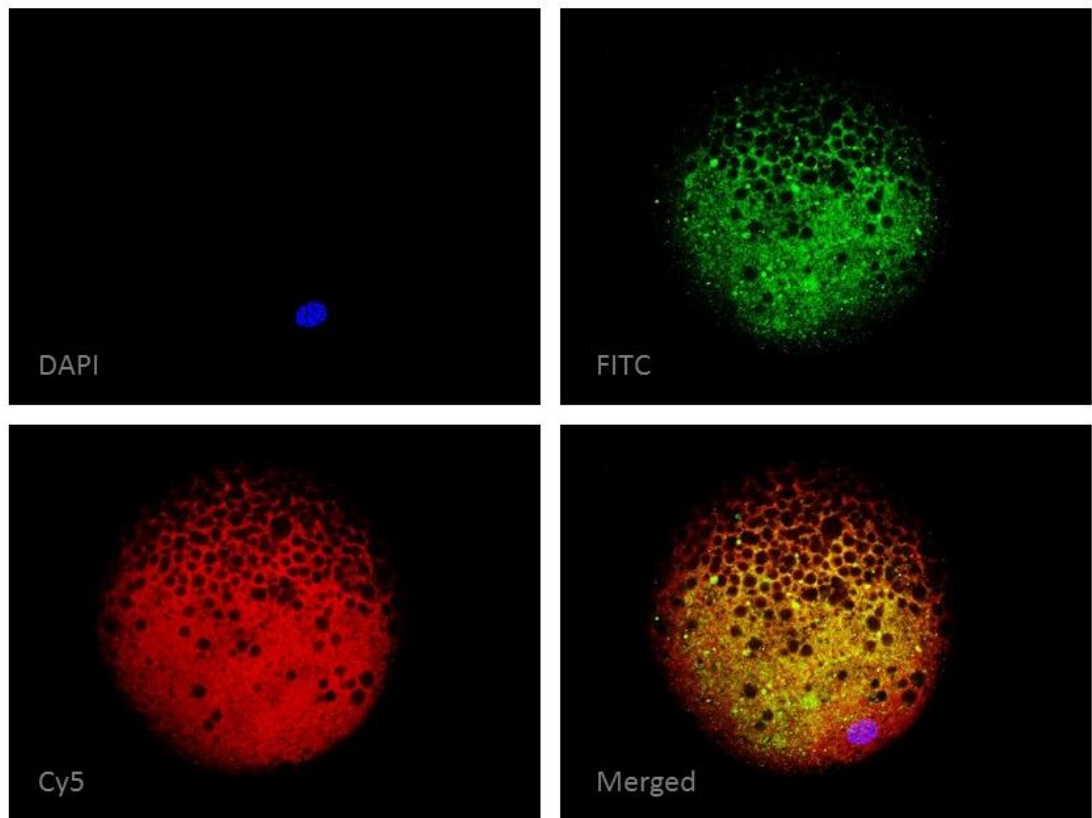


Obrázek č. 8: Imunocytochemická lokalizace enzymů CBS a CTH v GV oocyty. NC: negativní kontrola; DAPI: DNA; FITC: CBS; Cy5: CTH; Merged: DAPI-FITC-Cy5. Zvětšení 400x.

Na základě kolokalizační analýzy provedené i pro kombinaci enzymů CBS a 3-MPST (viz Obrázek č. 9) byly u GV oocytů střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,726 \pm 0,075$ a $Rr = 0,708 \pm 0,074$. Výsledky indikují vysoký stupeň korelační závislosti mezi distribucí enzymů CBS a 3-MPST u GV oocytů, čímž udávají jejich vzájemnou interakci. U dozrálých MII oocytů byly střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,729 \pm 0,043$ a $Rr = 0,699 \pm 0,044$, kde tyto výsledky poukazují na vysoký stupeň korelační závislosti. Tato vysoká korelace poukazuje na vzájemnou distribuci enzymů CBS a 3-MPST u MII oocytů. Oba kolokalizační koeficienty zůstaly v průběhu meiotického zrání téměř na stejné úrovni (viz Graf č. 5).

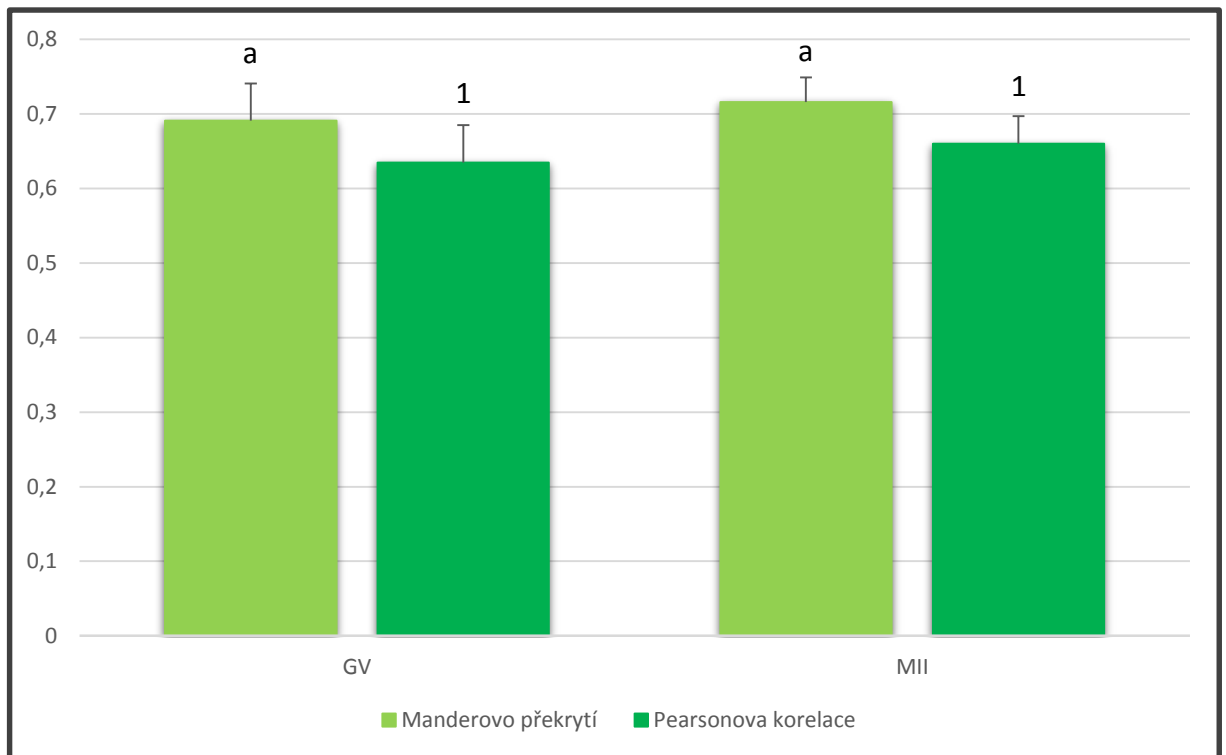


Graf č. 5: Porovnání hodnot Manderova překrytí a Pearsonové korelace u kombinace enzymů CBS a 3-MPST v nezralých GV oocytech a dozrálých MII oocytech. ^{a,b,1,2}Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

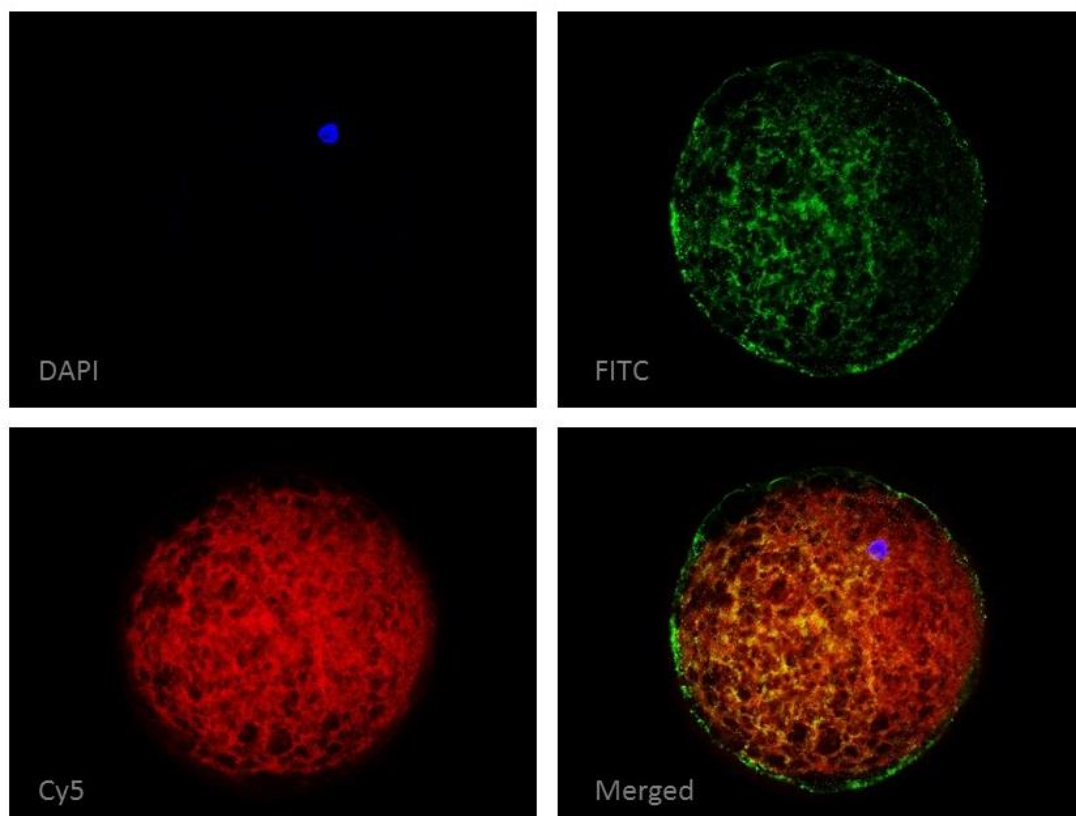


Obrázek č. 9: Imunocytochemická lokalizace enzymů CBS a 3-MPST v MII oocytu. DAPI: DNA; FITC: CBS; Cy5: 3-MPST; Merged: DAPI-FITC-Cy5. Zvětšení 400x.

Na základě kolokalizační analýzy pro poslední kombinaci enzymů CTH a 3-MPST (viz Obrázek č. 10) byly u GV oocytů střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,691 \pm 0,05$ a $Rr = 0,635 \pm 0,05$. Výsledky indikují střední stupeň korelační závislosti mezi distribucí enzymů CTH a 3-MPST u GV oocytů. U dozrálých MII oocytů byly střední hodnoty kolokalizačních koeficientů $R = 0,716 \pm 0,033$ a $Rr = 0,66 \pm 0,037$, kde tyto výsledky indikují také střední korelační závislosti. Výsledky tedy udávají možnou vzájemnou interakci enzymů CTH a 3-MPST jak v GV oocytech, tak i v MII oocytech. S tím, že v MII oocytech nedochází k signifikantnímu nárůstu jejich hladiny (viz Graf č. 6).



Graf č. 6: Porovnání hodnot Manderova překrytí a Pearsonové korelace u kombinace enzymů CTH a 3-MPST v nezralých GV oocytech a dozrálých MII oocytech. ^{a,b;1,2}Různé superskripty vyjadřují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).



Obrázek č. 10: Imunocytochemická lokalizace enzymů CTH a 3-MPST v GV oocyty. DAPI: DNA; FITC: CTH; Cy5: 3-MPST; Merged: DAPI-FITC-Cy5. Zvětšení 400x.

6 Diskuze

Meiotické zrání oocytů představuje jeden z klíčových fyziologických dějů odehrávajícího se v organismu samice pro zachování druhu, kdy pouze dozrálý oocyt je schopný podstoupit oplození a zahájit embryonální vývoj. Tento komplexní proces je řízen mnoha faktory, jejichž dynamika reguluje prolomení meiotického bloku, znovuzahájení a dokončení meiotického zrání (Fan *et al.*, 2002). Jedním z faktorů je skupina gasotransmiterů, která představuje malé plynné molekuly plnicí v organismu fyziologické funkce (Wang, 2002). Mimo CO a NO se do této skupiny řadí i H₂S. Původně byl H₂S objeven jako toxický plyn, který v organismu narušuje respirační centra v mozgovém kmeni (Guidotti, 1996). Teprve v nedávném čase byl objeven jeho fyziologický vliv a jeho endogenní syntéza byla prokázána v různých tělních buňkách (Abe *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001; Srilatha *et al.*, 2007; Srilatha *et al.*, 2009).

Tkáňové koncentrace endogenního H₂S se pohybují v rozmezí od 50 μM do 160 μM (Furne *et al.*, 2001) a tato koncentrace je udržována syntézou H₂S prostřednictvím enzymů CBS, CTH a 3-MPST (Wang, 2002; Shibuya *et al.*, 2009). Do nedávné doby nebyla zjištěna endogenní produkce H₂S přímo oocyttem, ačkoliv v granulóznicích buňkách obklopujících oocyt byl enzym CBS a jeho účinek na oocyt zaznamenán (Liang, R. *et al.*, 2007). Až teprve opravdu nedávno byla přítomnost těchto tří enzymů prokázána u stádií GV, MI a MII prasečích oocytů (Nevoral *et al.*, 2015). Výsledky experimentu č. 1 této práce se shodují s nedávno získanými poznatky a potvrzují přítomnost H₂S-uvolňujících enzymů v prasečích GV a MII oocytech.

Vliv enzymů na meiotické zrání byl popsán u enzymu CBS v granulóznicích buňkách, kdy potlačením jeho exprese došlo k inhibici meiotického zrání oocytu (Liang, R. *et al.*, 2007). Výsledky experimentu č. 2 potvrdily efekt enzymů CBS, CTH a 3-MPST na průběh meiotického zrání oocytů. Z předkládaných výsledků lze říci, že ani jednotlivé inhibitory ani dvojkombinace specifických inhibitorů pro H₂S-uvolňující enzymy neovlivňovaly meiotické zrání. V případě oocytů ošetřených trojkombinací specifických inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S došlo k ovlivnění průběhu meiotického zrání. Efekt se projevil zpomalením meiotického zrání, a tím pomalejším přechodem oocytů do stádia MII po 48 hodinové *in vitro* kultivaci. Výsledky této práce jsou v souladu s již publikovanými informacemi (Nevoral *et al.*, 2015). Na základě těchto dostupných znalostí lze potvrdit, že enzymy uvolňující H₂S mají vliv na průběh meiotického zrání oocytů. Až potlačení všech tří H₂S-uvolňujících enzymů způsobilo zpomalení meiotického zrání. Lze předpokládat, že enzymy jsou schopné kompenzovat se vzájemně, a vyrovnat tak vzniklou disbalanci v jejich zastoupení. Z toho důvodu má podstatný

důsledek výhradně paralelní inhibice všech tří enzymů uvolňujících H₂S. Je pravděpodobné, že podobný průběh procesu kompenzace H₂S-uvolňujících enzymů lze očekávat i v případě somatických buněk (Sanokawa-Akakura *et al.*, 2014).

Cílem dalšího experimentu bylo prokázat vzájemnou distribuci enzymů uvolňujících H₂S a vyjádřit jejich závislost. Byla prokázána schopnost H₂S interagovat a vázat se na jiné látky. Podobně jako na CO a NO, se H₂S váže na hemoglobin, se kterým vytváří komplex sulfhemoglobin (Stárka, 2009). Kromě toho může H₂S reagovat s gasotransmiterem NO, kdy výslednou sloučeninou je nitrosothiol, která se podílí na zpětné regulaci aktivity NOS enzymu (Whiteman *et al.*, 2006). Proto se tato práce zaměřila na vzájemnou interakci enzymů uvolňujících H₂S během meiotického zrání. Předkládané výsledky poukázaly na možnou vzájemnou distribuci mezi kombinacemi enzymů nezávisle na tom, v jakém stádiu se oocyt nachází. U kombinace enzymů CBS a 3-MPST byla zaznamenána vysoká korelační závislost, a tím potvrzena jejich interakce jak v GV, tak i MII oocytech. Lze se domnívat, že H₂S-uvolňující enzymy jsou nezbytné po celý průběh meiotického zrání oocytů. Na základě získaných dat této práce dosahovaly střední hodnoty kolokalizačních koeficientů pro stanovené kombinace enzymů téměř podobných úrovní v GV a MII stádiích oocytů, z toho je možné usoudit, že každý enzym zastupuje významnou roli v syntéze H₂S a není jeden ze tří enzymů upřednostňován pro syntézu H₂S.

Při úplné inhibici všech tří H₂S-uvolňujících enzymů bylo pozorováno narušené meiotické zrání v závislosti na koncentraci použitých inhibitorů. Způsobem, jakým by H₂S mohl ovlivňovat aktivitu celé řady faktorů a kináz zapojených do regulace meiotického zrání, je S-sulfhydratace. Během procesu sulfhydratace se thiolová skupina (-SH) cysteinových zbytků proteinů mění na hydropersulfidovou skupinu (-SSH), a tím je pozměněná funkce takto post-translačně modifikovaného proteinu. Sulfhydratace může být důležitým mechanismem, který řídí mnoho dalších metabolických procesů v těle zvířat (Mustafa *et al.*, 2009). Její účinek byl prokázán Zhao *et al.* (2014) na endoteliálních buňkách a fibroblastech, kde došlo k post-translačním modifikacím u kinázy MEK1 na cysteinu 341, která je zapojena do průběhu aktivace MPF a MAPK. Obdobný mechanismus endogenně syntetizovaného H₂S lze proto očekávat také během meiotického zrání oocytů, kdy může docházet k sulfhydrataci signálních drah regulující zrání oocytů. Pokud by došlo v oocyту k narušení fyziologické koncentrace H₂S, je možné usuzovat, že následek se projeví v oslabené aktivitě faktorů podílejících se na meiotickém zrání oocytů.

Experimenty a z nich získané výsledky potvrdily endogenní syntézu H₂S-uvolňujících enzymů v prasečích oocytech v průběhu meiotického zrání. Zároveň poukázaly na funkci těchto enzymů v souvislosti s regulací meiotického zrání, kdy inhibicí H₂S-uvolňujících enzymů došlo ke zpomalení meiotického zrání oocytů. Dále byla prokázána střední korelační závislost ve vzájemné interakci enzymů CBS, CTH a 3-MPST. V případě kombinace CBS a 3-MPST byla zaznamenána vysoká korelační závislost, a tím potvrzena jejich interakce jak v GV, tak i MII oocytech.

7 Závěr

Meiotické zrání představuje komplexní proces, jehož výsledkem je dozrálý oocyt schopný podstoupit oplození a zahájit embryonální vývoj. Na regulaci se podílí široké spektrum faktorů, včetně malých plynných molekul, tzv. gasotransmiterů. Tyto plyny vykazují řadu fyziologických funkcí v organismu a posledně objeveným gasotransmiterem je sulfan (H_2S).

V rámci této diplomové práce získané výsledky prokázaly vliv této signální molekuly na meiotické zrání v prasečích oocytech, ale především přítomnost enzymů uvolňujících H_2S (CBS, CTH a 3-MPST) v prasečích oocytech. Výsledky také poukázaly na vzájemnou interakci enzymů CBS, CTH a 3-MPST v prasečích oocytech u stádia GV a MII, kdy nejsilnější interakce byla pozorována u CBS a 3-MPST. V oocytech, které podstoupily meiotické zrání a dosáhly stádia MII, zjevně nedošlo k výrazným dynamickým změnám těchto interakcí. Na základě dosažených výsledků se lze domnívat, že H_2S -uvolňující enzymy jsou nezbytné po celý průběh meiotického zrání oocytů.

S rozvíjejícím se zájmem o využívání biotechnologických metod souvisí podrobné studování a pochopení mechanismů a vlivů působících na správný vývoj oocytů. Vylepšení podmínek kultivace *in vitro* umožňuje nabývat vyšší efektivity biotechnologických metod, kde získané informace z výzkumů na prasečích oocytech mohou velmi dobře posloužit nejen v rámci šlechtění hospodářských zvířat, ale i v oblasti asistované reprodukce člověka.

Je zřejmé, že doposud pozorované účinky H_2S představují jen část biologických efektů, kterými tato signální molekula může disponovat. Pro popsání a vysvětlení mechanismů působení H_2S je zapotřebí dalších experimentů, zaměřených na procesy oplození a časný embryonální vývoj.

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.

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. DOI:10.1186/1477-7827-3-28.

Anderson, E., Albertini, D. F. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *Journal of Cell Biology*. 71. 680 – 686.

Arnold, I. M. F., Dufresne, R. M., Alleyne, B. C., Stuart, P. J. W. 1985. Health implication of occupational exposures to hydrogen sulfide. *Journal of Occupational Medicine*. 27(5). 373 - 376.

Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 13(1). 25 - 97.

Bielanska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6(2). 161 - 193.

Boers, G. H., Smals, A. G. H., Trijbels, F. J. M., Fowler, B., Bakkeren, J. A. J. M., Schoonderwaldt, H. C., Kleijer, W. J., Kloppenborg, P. W. C. 1985. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *New England Journal of Medicine*. 313. 709 - 715.

Dekel, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234. 19 – 25.

Delaval, B., Doxsey, S. J. 2010. Pericentrin in cellular function and disease. *Journal of Cell Biology*. 188(2). 181 – 190.

- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., Olson, K. R. 2004. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 286(4). 678 – 85.
- Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Armstrong, D. T., Gilchrist, R. B. 2005. Role of oocyte-secreted Growth Differentiation Factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*. 146(6). 2798 – 2806.
- Du, Q., Jovanovic, S., Sukhodub, A., Barratt, E., Drew, E., Whalley, K. M., Kay, V., McLaughlin, M., Telfer, E. E., Barratt, Ch. L. R., Jovanovic, A. 2010. Human oocytes express ATP-sensitive K⁺ channels. *Human Reproduction*. 25(11). 2774 – 2782.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S., Ruderman, J. V. 2002. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *PNAS*. 99(26). 16794 – 16799.
- Fan, H.-Y., Li, M.-Y., Tong, Ch., Chen, D.-Y., Xia, G.-L., Song, X.-F., Schatten, H., Sun, Q.-Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*. 63(4). 480 – 487.
- Furne, J., Springfield, J., Koenig, 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.
- Glass, D. C. 1990. A review of the health effects of hydrogen sulphide exposure. *Annals of Occupational Hygiene*. 34(3). 323 - 327.
- Guidotti, T. L. 1996. Hydrogen sulphide. *Occupational Medicine*. 46(5). 367 - 371.
- Guzman, M. A., Navarro, M. A., Carnicer, R., Sarria, A. J., Acin, S., Arnal, C., Muniesa, P., Surra, J. C., Arbones-Mainar, J. M., Maeda, N., Osada, J. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics*. 15(21). 3168 – 3176.

Hayden, L. J., Franklin, K. J., Roth, S. H., Moore, G. J. 1989. Inhibition of oxytocin-induced but not angiotensin-induced rat uterine contractions following exposure to sodium sulfide. *Life Sciences*. 45(26). 2557 – 2560.

Huang, Y., Li, F., Tong, W. D., Zhang, A. P., He, Y., Fu, T., Liu, B. 2010. Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of intestinal cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 221(2). 125 – 132.

Cheng, Y., Ndisang, J. F., Tang, G., Cao, K., Wang, R. 2004. Hydrogen sulfide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 287(5). 2316 – 2323.

Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., Banerjee, R. 2009. H₂S biogenesis by human cystathionine γ -lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry*. 284(17). 11601 - 11612.

Kamoun, P. 2001. Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical Hypotheses*. 57(3). 389 - 392.

Kawabata, A., Ishiki, T., Nagasawa, K., Yoshida, S., Maeda, Y., Takahashi, T., Sekiguchi, F., Wada, T., Ichida, S., Nishikawa, H. 2007. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain*. 132. 74 – 81.

Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15(6). 654 – 663.

Kredich, N. M., Foote, L. J., Keenen, B. S. 1973. The stoichiometry and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*. 248(17). 6187 - 6197.

- Krejčová, T., Šmelcová, M., Petr, J., Bodart, J-F., Sedmíková, M., Nevorál, J., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Kučerová-Chrpová, V., Chmelíková, E., Tůmová, L., Jílek, F. 2015. Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. PLOS ONE. DOI: 10.1371/journal.pone.0116964.
- Lamar, C. A., Mahesh, V. B., Brann, D. W. 1996. Regulation of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: a regulatory role for carbon monoxide?. *Endocrinology*. 137(2). 790 - 793.
- Lee, K.-B., Zhang, M., Sugiura, K., Wigglesworth, K., Uliasz, T., Jaffe, L. A., Eppig, J. J. 2013. Hormonal Coordination of Natriuretic Peptide Type C and Natriuretic Peptide Receptor 3 Expression in Mouse Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*. 88(2). 1 – 9.
- Li, C., Guo, Z., Guo, B., Xie, Y., Yang, J., Wang, A. 2014. Inhibition of the endogenous CSE/H₂S system contributes to hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*. 9(6). 2467 – 2472.
- Liang, Ch.-G., Su, Y.-Q., Fan, H.-Y., Schatten, H., Sun, Q.-Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*. 21(9). 2037 – 2055.
- Liang, R., Yu, W.-D., Du, J.-B., Yang, L.-J., Yang, J.-J., Xu, J., Shang, M., Guo, J.-Z. 2007. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24(1). 89 – 96.
- Liu, Y.-H., Lu, M., Hu, L.-F., Wong, P. T.-H., Webb, G. D., Bian, J.-S. 2012. Hydrogen sulfide in the mammalian cardiovascular system. *Antioxidants and Redox Signaling*. 17(1). 141 - 185.
- Ma, W., Viveiros, M. M. 2014. Depletion of Pericentrin in Mouse Oocytes Disrupts Microtubule Organizing Center Function and Meiotic Spindle Organization. *Molecular Reproduction & Development*. 81(11). 1019 - 1029.

Manandhar, G., Feng, D., Yi, Y.-J., Lai, L., Letko, J., Laurincik, J., Sutovsky, M., Salisbury, J. L., Prather, R. S., Schatten, H., Sutovsky, P. 2006. Centrosomal protein centrin is not detectable during early pre-implantation development but reappears during late blastocyst stage in porcine embryos. *Reproduction*. 132(3). 423 - 434.

Mancuso, C., Navarra, P., Preziosi, P. 2010. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neurochemistry*. 113(3). 563 - 575.

McGaughey, R. W., Montgomery, D. H., Richter, J. D. 1979. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *Journal of Experimental Zoology*. 209(2). 239 - 254.

Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130(6). 791 - 799.

Meinecke, B., Janas, U., Podhajsky, E., Meinecke-Tillmann, S. 2001. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod Dom Anim*. 36. 183 - 188.

Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kaláb, P. 1998. Interplay between Cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Thenogenology*. 49. 461 - 469.

Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K. D., Wilcken, B., Pyeritz, R. E., Andria, A., Boers, G. H. J., Bromberg, I. L., Cerone, R., Fowler, B., Gröbe, H., Schmidt, H., Schweitzer, L. 1985. The Natural History of Homocystinuria Due to Cystathionine β -Synthase Deficiency. *American Society of Human Genetics*. 37. 1 - 31.

- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S. H. 2009. H₂S signals through protein S-Sulfhydration. *Science Signalling*. 2(96). 1 – 8.
- Naito, K., Hawkins, C., Yamashita, M., Nagahama, Y., Aoki, F., Kohmoto, K., Toyoda, Y., Moor, R. M. 1995. Association of P34^{CDC2} and Cyclin B1 during Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Developmental Biology*. 168(2). 627 - 634.
- 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*. DOI: 10.1371/journal.pone.0099613.
- Nevoral, J., Žalmanová, T., Zámotná, 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 Oxid*. 51. 24 – 35.
- Nichols, C. G. 2006. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*. 440. 470 – 476.
- 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.
- Pan, T.-T., Neo, K. L., Hu, L.-F., Yong, Q. C., Bian, J.-S. 2008. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 294(1). 169 – 177.
- Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. J. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*. DOI: 10.1186/1477-7827-7-10.

- Paulini, F., Silva, R. C., de Paula Rolo, J. L. J., Lucci, C. M. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. 7. 102.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27–37.
- Prasad, S. V., Skinner, S. M., Carino C., Wang, N., Cartwright, J., Dunbar, B. S. 2000. Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona Pellucida. *Cells Tissues Organs*. 166(2). 148 - 164.
- Prevot, V., Croix, D., Rialas, C. M., Poulain, P., Fricchione, G. L., Stefano, G. B., Beauvillain, J. C. 1999. Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology*. 140(2). 652 - 659.
- Raz, E. 2004. Guidance of primordial germ cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 16(2). 169 - 173.
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 32. 109 - 134.
- Sanokawa-Akakura, R., Ostrakhovitch, E. A., Akakura, S., Goodwin, S., Tabibzadeh, S. 2014. A H₂S-Nampt dependent energetic circuit is critical to survival and cytoprotection from damage in cancer cells. *PLOS ONE*. 9(9). e108537.
- Sathananthan, A. H., Selvaraj, K., Girijashankar, M. L., Ganesh, V., Selvaraj, P., Trounson, A. O. 2006. From Oogonia to Mature Oocytes: Inactivation of the Maternal Centrosome in Humans. *Microscopy Research and Technique*. 69. 396 – 407.
- Searcy, D. G., Lee, S. H. 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 282(3). 310 - 322.

Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S. H. 2012. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-kappaB mediates its antiapoptotic actions. *Molecular Cell*. 45(1). 13 – 24. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.021.

Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11(4). 703 – 714.

Shuhaibar, L. C., Egbert, J. R., Norris, R. P., Lampe, P. D., Nikolaev, V. O., Thunemann, M., Wen, L., Feil, R., Jaffe, L. A. 2015. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 112(17). 5527 – 5532. DOI: 10.1073/pnas.1423598112.

Schatten, H., Sun, Q.-Y. 2011. Centrosome Dynamics During Mammalian Oocyte Maturation With a Focus on Meiotic Spindle Formation. *Molecular Reproduction and Development*. 78. 757 – 768.

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. 198 – 203.

Simpson, R. C., Freedland, R. A. 1976. Factors affecting the rate of gluconeogenesis from l-cysteine in the perfused rat liver. *Journal of Nutrition*. 106(9). 1272 - 1278.

Sitdikova, G. F., Weiger, T. M., Hermann, A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflügers Archiv*. 459. 389 - 397.

Soleymanlou, N., Jurisica, I., Nevo, O., Ietta, F., Zhang, X., Zamudio, S., Post, M., Caniggia, I. 2005. Molecular Evidence of Placental Hypoxia in Preeclampsia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 90(7). 4299 - 4308.

- 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). 1304–1311.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., Moore, P. K. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction – a pilot study. *European Journal of Pharmacology*. 535. 280 – 282.
- Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, P. G., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6(7). 1875 – 1884.
- Stárka, L. 2009. Hydrogen sulfide – another gaseous hormone?. *Chemické Listy*. 103(1). 28 – 31.
- 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 and Redox Signaling*. 7. 781 – 787.
- Sullivan, J. M., Traynelis, S. F., Chen, H.-S., Escobar, W., Heinemann, S. F., Lipton, S. A. 1994. Identification of two cysteine residues that is required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron*. 13. 929 – 936.
- Swaroop, M., Bradley, K., Ohura, T., Tahara, T., Roper, M. D., Rosenberg, L. E., Kraus, J. P. 1992. Rat cystathionine beta-synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 267(16). 11455 - 11461.
- Šmelcová, M., Tichovská, H. 2011. Gasotransmitter in the reproductive system: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 42(4). 188 – 198.
- Tang, G., Wu, L., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37(7). 753 – 763.

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61. 414 – 424.

Vaccari, S., Weeks, J. L. II, Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81(3). 595 - 604.

Van den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E. E., Bevers, M. M. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction*. 6(5). 457 – 474.

Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. DOI: 10.2741.

Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal*. 16(13). 1792 - 1798.

Wang, R. 2004. *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO, and H₂S in Biology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, USA. 94(1). p. 139.

Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil E., Neil J. *The physiology of reproduction*. New York. Raven Press. 70 –102.

Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, Ch., Qi, H., Williams, Z. 1999. Structure and Function of the Mammalian Egg Zona Pellucida. *Journal of Experimental Zoology*. 285(3). 251 – 258.

Whiteman, M., Li, L., Kostetski, I., Chu, S. H., Siau, J. L., Bhatia, M., Moore, P. K. 2006. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 343(1). 303 – 310.

Ye, J., Flint, A. P., Luck, M. R., Campbell, K. H. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125. 645 – 656.

Ying, Y., Qi, X., Zhao, G.-Q. 2001. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(14). 7858 – 7862.

Young, J. M., McNeilly, A. S. 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 140. 489 – 504.

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO Journal*. 20. 6008 – 6016.

Zhao, K., Ju, Y. J., 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(7). 792 - 800.