

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Intracelulární distribuce enzymů uvolňujících sulfan ve
zrajících oocytech prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Vondráková

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

©2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Intracelulární distribuce enzymů uvolňujících sulfan ve zrajících oocytech prasete 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vstřícnost, ochotu, věcné připomínky a hlavně za trpělivost při gramatické kontrole práce. Děkuji také Ing. Kateřině Zámostné za ochotu při spolupráci v laboratoři a při vypracování diplomové práce.

Intracelulární distribuce enzymů uvolňujících sulfan ve zrajících oocytech prasete

Souhrn

Studium molekulárních mechanismů regulujících reprodukční procesy je nezbytné pro zvyšování efektivity reprodukčních biotechnologií, které jsou v chovech zvířat využívány čím dál častěji. Klíčovou součástí mnoha biotechnologických metod je kultivace oocytů, která simuluje přirozené podmínky vaječníků. Tato simulace je ovšem stále nedokonalá a je limitujícím faktorem úspěšnosti vzniku oplození schopných savčích oocytů.

Meiotické zrání ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří například gasotransmitter sulfan (H_2S). Donedávna byl sulfan známý pouze jako toxický plyn znečišťující životní prostředí. Dnes víme, že sulfan je za nízkých koncentrací důležitou signální molekulou s nesčítelným množstvím fyziologických funkcí. Sulfan je produkován enzymy CBS, CTH a 3-MPST v různých tkáních těla včetně reprodukční soustavy.

Na základě dostupných informací byla stanovena hypotéza, že enzymy odpovědné za endogenní produkci sulfanu, CBS, CTH a 3-MPST, jsou přítomné v prasečích oocytech a jejich přítomnost v buněčných organelách se mění během meiotického zrání. Cílem této práce bylo tuto hypotézu ověřit pomocí kultivace prasečích oocytů, imunocytochemické detekce mitochondrií, endoplazmatického retikula a enzymů uvolňujících endogenní sulfan a pomocí kolokalizační analýzy.

Vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že enzymy uvolňující sulfan, CBS, CTH a 3-MPST, jsou přítomny v prasečích GV oocytech i v oocytech dozrálých do stádia MII po 48 hod. *in vitro* kultivaci. Bylo také zjištěno, že během meiotického zrání dochází ke změnám distribuce těchto enzymů v buněčných organelách oocytu. V mitochondriích docházelo k statisticky významným změnám distribuce enzymů 3-MPST a CBS. U enzymu 3-MPST došlo ke vzrůstu hodnot kolokalizačních koeficientů, naopak u enzymu CBS došlo k poklesu těchto hodnot. V endoplazmatickém retikulu docházelo k statisticky významným změnám distribuce všech tří sulfan-uvolňujících enzymů. Hodnoty kolokalizačních koeficientů pro enzymy CBS a 3-MPST vzrostly, naopak pro kombinaci endoplazmatického retikula a CTH klesly. Tyto poznatky jsou důležité pro objasnění role gasotransmiteru sulfanu během meiotického zrání oocytů savců a jejich aplikaci ve šlechtění hospodářských zvířat i asistované reprodukci člověka.

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

Intracellular distribution of hydrogen sulfide releasing enzymes in maturing porcine oocytes

Summary

The study of the molecular mechanisms regulating reproductive processes is crucial for increasing the efficiency of reproductive biotechnologies that are often used in animal breeding. A key part of many biotechnological methods is the cultivation of oocytes, which simulates natural conditions in the ovaries. However this simulation is still imperfect and presents a limiting factor for successful formation of mammalian oocytes capable of fertilization.

Meiotic maturation is influenced by many factors including for example neurotransmitter hydrogen sulfide (H₂S). Until recently, hydrogen sulfide was known only as toxic gas polluting the environment. It was found that the hydrogen sulfide is at low concentrations important signaling molecule with a lot of physiological functions. Hydrogen sulfide is produced by enzymes CBS, CTH and 3-MPST in various tissues of the body, including the reproductive system.

We hypothesised that enzymes responsible for the endogenous production of hydrogen sulfide, CBS, CTH and 3-MPST, are present in porcine oocytes and their presence varies during meiotic maturation in cellular organelles. The goal of this study was to prove this hypothesis by cultivating porcine oocytes, detection of mitochondria, endoplasmic reticulum and hydrogen sulfide-releasing enzymes using immunocytochemistry and colocalization analysis.

Our results showed that enzymes releasing hydrogen sulfide, CBS, CTH and 3-MPST, are present in GV porcine oocytes and also in the oocytes matured to the MII stage, after 48 hours *in vitro* cultivation. We found that the distribution of these enzymes in cellular organelles in oocyte changed during meiotic maturation. There were significant changes in the distribution of enzymes 3-MPST and CBS in the mitochondria, levels of colocalization coefficients for enzyme 3-MPST increased, these coefficients for enzyme CBS decreased during meiotic maturation. In endoplasmic reticulum we found significant changes in the distribution of all three hydrogen sulfide-releasing enzymes. Levels of colocalization coefficients for CBS and 3-MPST increased, while levels of these coefficients for enzyme

CTH decreased. Results of our experiments on porcine oocytes can help to clarify the role of gasotransmitter hydrogen sulfide during meiotic maturation of oocytes and are highly valuable because their possible application in breeding of farm animals and in human assisted reproduction.

Keywords: oocyte, meiotic maturation, hydrogen sulfide, CBS, CTH, 3-MPST

OBSAH:

1	Úvod.....	10
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Oogeneze.....	12
3.1.1	Fáze množení oocyty.....	12
3.1.2	Fáze růstu oocyty	12
3.1.3	Folikulogeneze	14
3.1.4	Fáze zrání oocyty	16
3.1.4.1	Meióza	17
3.2	Regulační mechanismy meiózy	18
3.2.1	MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).....	18
3.2.2	MPF (M-phase promoting factor)	20
3.2.3	cAMP (Cyklický adenosin 3'5' monofosfát).....	21
3.3	Sulfan (H₂S).....	21
3.3.1	Vlastnosti, toxikologie	21
3.3.2	Biosyntéza a katabolismus	22
3.3.3	Účinky na organismus	23
3.3.4	Sulfan v reprodukční soustavě.....	24
3.3.5	Sulfan v oocytech	25
4	Materiál a metodika	26
4.1	Izolace a <i>in vitro</i> kultivace zrajících oocytů.....	26
4.2	Hodnocení zrání oocytů	26
4.3	Imunocytochemie	27
4.4	Analýza obrazu a kolokalizace	27
4.5	Statistické hodnocení	28
5	Výsledky	29
5.1	Přítomnost CBS v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vit</i>	29
5.2	Přítomnost CTH v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vitro</i>	30
5.3	Přítomnost 3-MPST v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vitro</i>	32
5.4	Přítomnost CBS v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vitro</i>	33
5.5	Přítomnost CTH v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vitro</i>	35

5.6	Přítomnost 3- MPST v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých <i>in vitro</i>	36
6	Diskuze	38
7	Závěr	42
8	Seznam literatury	43

1 Úvod

Reprodukce zvířat hraje významnou roli v ekonomice chovu hospodářských zvířat. Znalost základních fyziologických reprodukčních procesů je tedy klíčovým faktorem pro úspěšný chov zvířat. Často se v chovech hospodářských využívá reprodukčních biotechnologií, jakými jsou inseminace, embryotransfer, klonování apod. Studium molekulárních mechanismů regulujících reprodukční procesy je důležité pro zvyšování efektivity těchto technik. Nezbytnou a klíčovou součástí mnoha biotechnologických postupů je kultivace oocytů *in vitro*. Tyto podmínky pouze simulují optimální podmínky vaječníku samice. Tato simulace je stále nedokonalá a je limitujícím faktorem úspěšnosti zrání savčích oocytů. Biotechnologické postupy a jejich rozvoj jsou proto omezeny zejména množstvím kvalitních oocytů. Proto je nezbytné studovat postupy zlepšující vývojové a fertilizační schopnosti oocytů.

Jedním z faktorů ovlivňujících reprodukční procesy je gasotransmitter sulfan. Jedná se o malou plynnou signalizační molekulu s nesčítelným množstvím fyziologických funkcí. Endogenní produkce sulfanu přímo v buňkách je zajišťována enzymy CBS (cystathionin- β -syntáza), CTH (cystathionin- γ -lyáza) a 3-MPST (3-mercaptopyruvát sulfurtransferáza). Sulfan je produkován v různých tkáních organismu včetně buněk reprodukční soustavy.

Studium gasotrasmitterů, sulfanu a dalších plynů, jsou důležité nejen pro přiblížení se k vytvoření co neoptimálnějších podmínek *in vitro*, ale také proto, aby se objasnily funkce a mechanismy gasotrasmitterů v procesech ovlivňující reprodukci. Je známo, že prase slouží spolehlivě jako experimentální model pro reprodukci člověka, zejména pro podobný průběh meiotického zrání a časného embryonálního vývoje. Proto je výzkum a aplikace jeho výsledků velice důležitá pro základní studium gasotrasmitterů v reprodukčních funkcích stejně jako pro rozvoj biotechnologických postupů s přesahem do humánní reprodukce.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, zda enzymy odpovědné za endogenní produkci neurotransmiteru sulfanu, CBS, CTH a 3-MPST, jsou přítomné v prasečích oocytech a jejich přítomnost v buněčných organelách se mění v závislosti na stádiu meiotického zrání.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze je složitý vývojový proces tvorby oplození schopných samičích pohlavních buněk, oocytů (Kudláč *et al.*, 1987). Vývoj oocytů je rozdělen do tří fází (množení, růstu a zrání). Oogeneze u samic začíná, na rozdíl od spermatogeneze u samců, již před narozením. Fáze množení a částečně i růstu se odehrávají již v prenatálním období vývoje jedince. Proces oogeneze je pozastaven ve fázi růstu ještě před narozením jedince. Fáze růstu a zrání je po dosažení pohlavní dospělosti znovu zahájena. Produkci zralých oocytů začíná pohlavní cyklus samice, který se pravidelně opakuje po celou dobu reprodukčního období samice. Po skončení reprodukčního období nastává klimakterium, přestávají se pravidelně uvolňovat zralé oocyty a ustává pohlavní činnost. (Wassarman, 1988).

3.1.1 Fáze množení oocytu

Během fáze množení se prvovaječné buňky (oogonie) opakovaně mitoticky dělí (Kudláč *et al.*, 1987). Výsledkem mnohonásobného dělení je základ pro několik set tisíc oocytů v obou ováriích. Posledním mitotickým dělením oogonií vznikají oocyty I. řádu, označované také jako oocyty primární (Romanovský *et al.*, 1988). Počet primárních oocytů u samice v době narození je vysoký, u prasnice v jednom ováriu najdeme okolo 60 000 oocytů. Proces množení se uskutečňuje během intrauterinního vývoje jedince částečně také v období postembryonálním (Kudláč *et al.*, 1987). Původní dogma předpokládalo přeměnu oogonií na primární oocyty pouze v průběhu prenatálního období. Nové studie ale poukazují na fakt, že část oocytů je tvořena i v dospělosti a tento jev byl označen jako neo-oogeneze (Johnson *et al.*, 2005). Diploidní primární oocyty ještě v prenatálním období vstupují do profáze prvního meiotického zrání, kdy se meióza zastavuje ve stádiu diplotene, prvním meiotickém bloku. V tomto stádiu oocyt přetrvává až do období pohlavní dospělosti (Kočárek *et al.*, 2010).

3.1.2 Fáze růstu oocytu

Během každého pohlavního cyklu od začátku pohlavní dospělosti vstupuje vždy několik primárních oocytů do fáze růstu. Pro toto období je charakteristické zvětšení objemu cytoplazmy a jádra, aktivní syntéza RNA a proteinů, vznik a hromadění kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránou a také hromadění žlutkových inkluzí. Růst oocytů probíhá současně s růstem folikulů až do velikosti potřebné k tomu, aby mohly dokončit

meiotické dělení (Wassarman, 1988). Zvětšení objemu oocytů koreluje se zvýšeným obsahem bílkovin (Schultz and Wassarman, 1977). Je známo, že rostoucí oocyty v preantrálních (rostoucích) folikulech akumulují prostředky nezbytné pro zrání, oplození a preimplantační rozvoj embrya. Ačkoli oocyty z preantrálních folikulů nejsou schopné pokračovat v meióze (Sorensen and Wassarman, 1976; Wickramasinghe *et al.*, 1991), molekuly podstatné pro zahájení meiózy, jako je například cyklin B a mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK), jsou syntetizovány během této vývojové fáze (Christmann *et al.*, 1994; Harrouk and Clarke, 1995).

Jednou z nejvýznamnějších změn v růstové fázi oocytu je vylučování glykoproteinů, které dávají vzniknout obalu *zona pellucida*. Ta tvoří ochrannou vrstvu kolem oocytu a skládá se ze tří glykoproteinů: ZP1, ZP2 a ZP3. Proteiny *zony pellucidy* jsou nezbytné pro normální vývoj oocytů i folikulů (Soyal *et al.*, 2000).

Nezbytnou součástí rostoucího oocytu jsou kumulární buňky. Kumulární buňky, které obalují oocyt a tvoří tzv. vejconosný hrbolek folikulu, komunikují nejen mezi sebou, ale také tvoří výběžky procházející skrz *zonu pellucidu*, opatřené mezibuněčnými spoji typu „gap junction“. Tyto spoje jsou tvořeny proteiny konexiny, z nichž konexin-37 je obsažen v oocytech po celou dobu jeho růstu (Amleh and Dean, 2002). Pomocí těchto spojů bezprostředně komunikují kumulární buňky s oocytem (Anderson and Albertini, 1976). Spoje usnadňují obousměrnou komunikaci a umožňují přenos živin, metabolických prekurzorů (aminokyselin nebo nukleotidů) a informačních molekul (druhých poslů), které plní úlohu inhibičních a stimulačních signálů pro následné meiotické zrání. Touto cestou nebo přímým kontaktem mezi buňkami na úrovni buněčného povrchu, může rostoucí oocyt aktivně podporovat růst a diferenciaci folikulárních buněk. Na druhou stranu regulaci růstu a zrání oocytu zajišťují folikulární buňky (Hurk and Zhao, 2004).

Během růstové fáze oocytu je pozastavena meióza v prvním meiotickém bloku, který nastal spontánně ve fázi množení oocytu záhy po zahájení meiózy (Wassarman, 1988). Plně dorostlý oocyt v profázi 1. meiotického dělení (1. meiotický blok) se označuje jako oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV, germinal vesicle) (Yanagimachi, 1988). Proteiny, které jsou tvořeny během růstové fáze oocytu, jsou po adekvátně načasované hormonální stimulaci nezbytné pro prolomení 1. meiotického bloku a pro pokračování meiózy v období pohlavní dospělosti (Wassarman, 1988).

3.1.3 Folikulogeneze

Ovariální folikuly jsou útvary různých velikostí přítomné v korové vrstvě vaječníků. Jsou tvořeny oocytem a různým počtem vrstev podpůrných folikulárních buněk. Folikul je od ostatní ovariální tkáně ohraničen dvěma vrstvami: *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa* (viz dále). Toto uspořádání umožňuje vyplnění folikulu folikulární tekutinou tvořící prostředí oocytu a okolním granulózním buňkám.

Přítomnost oocytů je nezbytná pro tvorbu folikulů, bez oocytů folikuly nejsou tvořeny. Brzy po vstupu oocytu do prodloužené diplotenní fáze meiózy začínají předchůdci folikulárních somatických buněk obklopotvat oocyt. Vytvořením jedné dlaždicové vrstvy buněk kolem oocytu vzniká tzv. primordiální folikul. Před narozením vzniklá velká populace nerostoucích primordiálních folikulů slouží jako zdroj folikulů a oocytů až do konce samičího reprodukčního života (Eppig, 2001).

Z primordiálních folikulů se formují primární folikuly. Oocyt v primárním folikulu vstupuje do růstové fáze a obklopující folikulární buňky, nyní nazývané granulózní buňky, získávají kubický tvar a proliferační schopnost (Eppig, 2001). Po narození se na ováriu nachází až několik tisíc primordiálních až primárních folikulů. Velký počet folikulů se během postnatálního vývoje redukuje (Doležal, 2003). Primární folikuly jsou pod vlivem působení pohlavních hormonů a gonadotropinů mobilizovány k folikulárnímu růstu.

Ve chvíli, kdy jsou rostoucí oocyty obklopeny více než jednou vrstvou granulózních buněk, je folikul nazýván sekundárním folikulem (Fortune and Eppig, 1979; Cortvrindt *et al.*, 1997; Eppig *et al.*, 2001). Množství rostoucích folikulů během této fáze podléhá atrezii (zániku). U folikulů, které neatretují, dochází k dalšímu růstu a tvorbě malých dutin uvnitř folikulu. Tyto dutiny se postupně zvětšují, granulózní buňky jsou odtlačovány a vytváří se jednotná dutina (antrum) naplněná folikulární tekutinou (Kudláč *et al.*, 1987). Tvorba folikulární tekutiny naplňující antrum je pro antrální folikuly charakteristická. Antrální tekutina může sloužit jako důležitý zdroj regulačních nebo modulačních látek odvozených od krve nebo výměšků folikulárních buněk, například gonadotropinů, steroidů, růstových faktorů, enzymů, proteoglykanů a lipoproteinů.

Během vývoje folikulů je výroba antrální tekutiny umocněna zvyšující se folikulární vaskularizací a propustností krevních cév, což je spojeno se zvyšováním velikosti antrálního folikulu (Hurk and Zhao, 2004). Tyto antrální folikuly se také nazývají terciálními folikuly. Dosud známými iniciátory vytvoření antra folikulu jsou gonadotropiny: folikuly stimulující hormon (FSH) a lutenizační hormon (LH) nebo aktivin (Hurk and Zhao, 2004). Selektce antrálních folikulů během nízké hladiny FSH (s vysokou pulzní sekrecí LH) je proces, ve kterém se vyvine jeden nebo více dominantních preovulačních antrálních folikulů. Zbývající folikuly z kohorty, které se nestanou dominantními atretují (Hurk and Zhao, 2004).

Preovulační antrální folikuly vylučují velké množství estradiolu a inhibinu a jsou schopné ovulace (Hurk and Zhao, 2004). Dobře vyvinuté antrální folikuly jsou často označovány jako Graafovy folikuly a jejich vývoj je závislý na gonadotropinech (Eppig, 2001). Graafův folikul je tvořen oocytem s průsvitným glykoproteinovým obalem (*zona pellucida*), granulózními buňkami obklopujícími oocyt (*corona radiata*), několikvrstevné epitelové blány (*membrana granulosa*) a dvěma obalovými vrstvami folikulu, zevní (*theca folliculi externa*) a vnitřní (*theca folliculi interna*) (Kudláč *et al.*, 1987), která je bohatá na krevní cévy a její buňky produkují androgeny. V době přechodu z preantrálního folikulu na antrální dochází ke kritické vývojové změně i u oocytů. Před tvorbou folikulárního antra nejsou oocyty schopny pokročit z fáze diplotene meiózy I a dokončit tak první meiotické dělení. Tyto oocyty jsou proto označovány jako meioticky nekompetentní. Nicméně, většina oocytů ve folikulech s vytvořeným antrem jsou již meioticky kompetentní (Handel and Eppig, 1997). Ovšem pouze oocyty z velkých antrálních folikulů jsou způsobilé pokračovat v meióze, dosáhnout metafáze II, a poté podstoupit oplození a další embryonální vývoj. Z tohoto důvodu je růst a vývoj oocytů koordinován s folikulárním vývojem, kde pouze folikuly velikosti minimálně 3 mm obsahují oocyty schopné dokončit meiotické zrání (Ješeta *et al.*, 2014; Milakovic *et al.*, 2015).

Preovulační nárůst gonadotropinů indukuje výrazné změny ve folikulu a komplexu kumulárních buněk a oocytu. Oocyty pokračují v meióze a vývoji do fáze metafáze II. Preovulační vlna gonadotropinů vyvolává zrání oocytu a u kumulárních buněk tato vlna vyvolá vylučování kyseliny hyaluronové, nesulfatovaného glykosaminoglykanu vázaného na kumulární buňky pomocí vazebných proteinů (Eppig, 1979). Když se kyselina hyaluronová stává hydratovanou, mezery mezi kumulárními buňkami se zvětšují a buňky se stávají obklopené lepkavým mucifikovaným matrixem. Tento proces je nazýván expanze

kumulárních buněk nebo mucifikace. Pokud je kumulární expanze potlačena, proces ovulace je výrazně zkomplikován (Chen *et al.*, 1993). Kumulární expanze je jeden z klíčových procesů, které musí nastat v preovulačním folikulu, aby mohlo dojít k fyziologické iniciaci meiotického zrání a ovulaci meioticky dozrálého oocyty schopného oplození a embryonálního vývoje (Eppig, 2001).

3.1.4 Fáze zrání oocyty

Meióza samičích pohlavních buněk je zahájena již v časném fetálním období samice. V tomto období je ve fázi diplotene prvního meiotického zrání oocyty spontánně pozastaveno. Oocyt v prvním bloku meiózy je charakteristický jadernou strukturou nazývanou zárodečný váček (germinal vesicle - GV) (Dekel, 2005). Meióza za určitých podmínek v oocyty pokračuje, některé oocyty ale degenerují a meiózu nedokončují (Hunter, 2000). K přerušení prvního meiotického bloku dochází před ovulací, meióza pokračuje a oocyty vstupují do fáze zrání. V *in vivo* podmínkách je zahájení meiózy iniciováno preovulační vlnou luteinizačního hormonu (LH) a to pouze u plně dorostlých, meioticky kompetentních oocytů z dominantních preovulačních folikulů. Před a v době vzestupu LH, je oocyt obklopen kompaktními kumulárními buňkami. Jelikož v oocytech nebyly detekovány žádné LH receptory (Peng *et al.*, 1991), signály vedoucí ke zrání oocytů tedy pravděpodobně pocházejí z jejich okolních folikulárních buněk. Navzdory mezidruhovým rozdílům sdílí oocyty základní mechanismus, kterým je řízen proces zrání oocyty v reakci na vlny LH, několik regulačních drah. Jedná se například o změnu fosforylace proteinů, hladiny iontů Ca^{2+} a signální dráhu cAMP (Hurk and Zhao, 2004).

V období mezi vlnou LH a ovulací podstupuje oocyt řadu změn jak na úrovni chromatinu, tak v cytoplasmě, které změnám chromatinu předcházejí. Komplexní proces změn je známý jako proces zrání oocyty. Oocyt pokračuje v prvním meiotickém dělení a v jádře mizí jaderná membrána. Tento proces je v oocyty označován jako proces rozpadu zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown - GVBD) (Motlik and Fulka, 1976). Zrání oocyty pokračuje metafází I, profází I a anafází I, kdy se jedna ze sad chromozómů s malým množstvím cytoplazmy oddělí od oocyty. Vzniká první pólóvé tělísko a oocyt II. řádu. Meióza je během vývoje oocyty pozastavena celkem dvakrát a k druhému bloku meiózy dochází právě v metafázi druhého meiotického dělení. Oocyt II. řádu obsahuje haploidní počet chromozómů a dokončuje meiotické zrání s vydělením druhého pólóvého tělíska pouze v případě oplození (Yanagimachi, 1988). Oogeneze se v plném rozsahu uskuteční jen

u malého počtu pohlavních buněk. Výsledkem zrání oocyty je pouze jedna funkční pohlavní buňka a dvě pólová tělíska.

3.1.4.1 Meióza

Během fáze zrání dochází v oocyty k meiotickému dělení. Wassarman (1988) meiózu popisuje jako modifikované dvakrát po sobě jdoucí mitotické dělení bez interfáze, které se uplatňuje při zrání pohlavních buněk. Během meiotického dělení dochází k redukci počtu chromozomů. Tato redukce je důležitá pro splynutí dvou gamet, oocyty a spermií, kdy vznikne opět diploidní buňka. Meiotické zrání je jedna ze základních fyziologických podmínek pro vznik života a tedy přežití druhu (Alberts *et al.*, 1998).

První meiotické dělení označujeme jako redukční neboli heterotypické, do něhož vstupuje diploidní buňka s dvouchromatidovými chromozómy. První zrací dělení zahrnuje dlouhou profázi I, která se skládá z několika stádií, metafázi I, anafázi I a telofázi I. Profázi u oocytů, která je mnohem delší a složitější než u běžných somatických buněk, dělíme do fází: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Na úplném začátku profáze jsou chromozómy stále téměř nezřetelné, jen pohlavní chromozómy mají podobu heterogenního tělíska. Fáze leptotene je vlastním počátkem profáze. Chromozómy jsou špatně pozorovatelné a připomínají tenká vlákna. Chromozómy se začínají spiralizovat, dehydratovat a jejich hmota kondenzuje v jádru. Nejdříve vzhledově připomínají klubíčko, ale pak dochází k jejich přesouvání a vytvoří tvar růžice tzv. leptotenní buket. Zygotene je obdobím, kdy dochází k přikládání homologních chromozómů a dochází k jejich splývání neboli konjugaci. Vznikají útvary zvané bivalenty. Propojování chromozómů umožňuje proteinový aparát, synaptemální komplex. Počet konjugovaných dvojic je nyní poloviční oproti původnímu počtu chromozómů. Pachytene je fází, pro kterou je typická přítomnost bivalentů a tetrad. Tyto útvary vznikají úplným propojením homologních chromozómů již zmiňovaným synaptemálním komplexem. Bivalenty vznikají pospojováním dvou chromozómů, tetrady v každém bivalentu obsahují 4 chromatidy homologních chromozómů. V bivalentech dochází ke crossing-overu, vzájemné výměně částí chromatid mezi homologickými chromozómy. Takto vznikají nové kombinace alel genů, které přispívají k větší variabilitě potomstva. Tvorbou tetrad se tvoří optimální podmínky pro redukci chromozómů, protože během 2 meiotických dělení se 4 části tetrad rozdělí mezi 4 gamety. V diplotenních stádiu se od sebe začínají homologické chromozómy oddělovat a synaptemální komplex zaniká. Chromatidy chromozómů zůstávají spojeny v místech tzv. chiazmatech, kde dochází k dokončování

výměny genetického materiálu. Diakineze je poslední fází první profáze. V této fázi dochází k tzv. terminalizaci, přesunu chiazmat ke koncům chromozómů v bivalentech. Na konci diakineze také zaniká jaderný obal.

Zbytek meiotického dělení probíhá stejně jako u mitotického dělení, metafází I. V metafázi jsou bivalentní chromozómy srovnány v ekvatoriální rovině vřeténka, uprostřed mezi jeho póly. Dochází k připojování chromozómů z bivalentů na vznikající dělicí vřeténko. Centromery každé dvojice chromozómů se náhodně orientují k různým pólům. Během anafáze dochází k synchronnímu oddělování párových chromatid a tvoří se dva dceřiné chromozómy, které jsou pomalu taženy k pólům vřeténka. Zkracují se kinetochorové mikrotubuly a póly se oddalují, což přispívá k separaci chromozómů. Na konci telofáze vznikají dvě dceřiná jádra, každé z nich obsahuje dvouchromatidové chromozómy v haploidním počtu (Wassarman, 1988).

Dceřiné buňky velmi brzy poté vstupují do druhého meiotického dělení, též nazývaného ekvační nebo homeotypické. Jde v podstatě o mitózu, kdy dochází k rozdělení dvouchromatidových chromozómů na jednochromatidové. V druhém meiotickém dělení již nedochází k replikaci DNA ani nijak významné telofázi. Utváří se vřeténko, chromozómy se uspořádávají do ekvatoriální roviny, sesterské chromatidy se rozcházejí a vznikají dvě dceřiné buňky s haploidním počtem chromozómů (Alberts *et al.*, 1994).

3.2 Regulační mechanizmy meiózy

Meiotické zrání oocyty je proces, při kterém oocyt dokončuje první meiotické dělení, postupuje do metafáze 2. meiózi a podstupuje další cytoplazmatické změny. Vzhledem k tomu, že zralý oocyt má v samičím reprodukčním traktu relativně krátkou oplození schopnost a životaschopnost, načasování zrání musí být přísně regulované (Mehlmann, 2005).

3.2.1 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) zahrnují skupinu kináz, které se účastní přenosů signálů řídících intracelulární události, včetně akutní hormonální reakce na hlavní vývojové změny v organismech (Pearson *et al.*, 2001). Mezi charakteristické rysy MAP kináz patří aktivace přímo fosforylací v nepřítomnosti regulační podjednotky a obvykle

dvě aktivační fosforylační místa v aktivační smyčce kináz: jeden tyrosin a jeden threonin, které jsou oddělené jedním variabilním zbytkem. Dnes je známo téměř 20 savčích MAP kináz, ale toto číslo jistě není konečné (Pearson *et al.*, 2001).

Kaskáda MAP kinázy je jedním z hlavních regulačních systémů, který interaguje a funguje zároveň s MPF (M-phase promoting factor) a společně podněcují progresi meiotického buněčného cyklu oocytů. MOS/MEK1/MAPK/p90rsk signální dráha reguluje buněčný cyklus přes kaskádu protein kinázové fosforylace. MAPK, která je označována také jako extracelulární regulující kináza (ERK), patří do skupiny serin/threonin proteinkináz, která vyžaduje dvojitou fosforylaci threoninových a tyrosinových zbytků, aby se stala plně aktivovanou. Existují dvě isoformy MAPK, které hrají klíčovou roli v meióze objevující se v savčích oocytech, ERK1 a ERK2 (Sun *et al.*, 1999a). MAPK kináza (známa také jako MAPK-ERK kináza 1 či MEK1), přímý aktivátor MAPK, je duálně specifická proteinkináza, která aktivuje MAPK prostřednictvím fosforylace threoninu-183 a tyrosinu-185 v jejich aktivačních doménách (Crews and Erikson, 1992). MEK-1 je také aktivována fosforylací a jejím aktivátorem u obratlovců je MOS, produkt protoonkogenu c-mos. C-mos mRNA je uložena jako mateřská informace v rostoucích oocytech a je přeložena do proteinu, který dává podnět MAPK kaskádě k fosforylaci v průběhu zrání oocytů (Gebauer and Richter, 1996).

Aktivita MAPK zůstává vysoká po celou dobu meiotického zrání a snižuje se až po překonání druhého meiotického bloku vstupem oocytu do interfáze (Stojkovic *et al.*, 1999). Časování aktivace MAPK u savčích druhů se v průběhu zrání oocytů na rozdíl od MPF liší. U některých druhů, jako je například myš a krysa, aktivace MAPK není nutná pro počáteční aktivaci MPF a dochází k ní přibližně 2 hodiny po spontánním rozpadu zárodečného váčku (GVBD) (Lu *et al.*, 2001; Verlhac, 1993). V oocytech velkých domácích druhů je časová souvislost mezi aktivací MAPK a GVBD více variabilní. U kozích oocytů se aktivita MAPK objevuje později než aktivace MPF a GVBD (Dedieu *et al.*, 1996). U prasečích oocytů je aktivita MAPK nízká ve fázi GV a prudký nárůst je zaznamenán ve fázi MI (Inoue *et al.*, 1995).

Obecně je funkcí kináz přenos fosfátu z vysokoenergetické molekuly ATP na cílovou molekulu - substrát. V případě proteinkináz je fosfátová skupina přenášena na protein, přesněji na (-OH) skupinu postranních řetězců aminokyselin. MAP kinázy jsou hlavními složkami drah ovládajících embryogenezi, diferenciaci buněk, buněčnou proliferaci a buněčnou smrt (Pearson *et al.*, 2001). MAPK kaskáda hraje klíčovou roli v regulaci meiotické

progrese v buněčném cyklu oocytů. Aktivace této kinázy je nezbytná pro zachování metafáze II (meiotického bloku), její inaktivace je předpokladem pro tvorbu prvojádra po oplození nebo aktivaci partenogeneze. Po rozpadu zárodečného váčku (GVBD) je MAPK zapojena do regulace organizace mikrotubulu a meiotického dělicího vřeténka. MAPK kaskáda značně interaguje s dalšími proteinkinázami, jako jsou MPF, protein kináza A, proteinkináza C, a kalmodulin-dependentní proteinkináza II, stejně jako s proteinfosfatázami při meiotické regulaci buněčného cyklu (Fan and Sun, 2004).

3.2.2 MPF (M-phase promoting factor)

M-phase promoting factor (MPF) je serin/threonin proteinkináza zapojena do regulace buněčného cyklu. MPF je heterodimer, který se skládá z katalytické CDK1 (p34cdc2) podjednotky a regulační cyklin B podjednotky. Existují nejméně tři druhy cyklinu B (B1, B2 a B3). Syntéza a degradace proteinu cyklinu upravuje činnost MPF, vzhledem k tomu, že CDK1 je běžně přítomná v dělicích se buňkách (Murray and Kirschner, 1989; Murray *et al.*, 1989). Je pravděpodobné, že u savců je to právě cyklin B1, který je primárně zodpovědný za MPF aktivitu (Jones, 2004). Bylo zjištěno, že plně dorostlé oocyty obsahují zásobu neaktivního MPF ve formě pre-MPF (Hagting *et al.*, 1999) a aktivace MPF je obvykle indukována tyrosinovou defosforylací CDK1 a syntézou cyklin B (Sun and Nagai, 2003).

MPF aktivita se objevuje těsně před GVBD, dosahuje vrcholu v každé metafázi (Gerhart *et al.*, 1984; Picard *et al.*, 1987; Tachibana *et al.*, 1987) a téměř mizí v době emise polárního tělíska (Kishimoto, 1988). Během MII fáze dosahuje MPF aktivita nejvyšší úrovně a zvýšená šance pro aktivaci oocytů souvisí se snížením aktivity MPF (Kikuchi *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 2002).

Stejně jako MAPK i MPF vykazuje proteinkinázovou aktivitu a přenáší fosfátovou skupinu na proteiny. Aktivace MPF vyvolává sérii reakcí vedoucí k členění jaderné membrány, kondenzaci chromozómů a formaci dělicího vřeténka. MPF je také považován za důležitou složku CSF (cytostatického faktoru), který navozuje druhý meiotický blok v prasečích oocytech. Nejedná se o jednu konkrétní molekulu, ale o komplex molekul a mimo jiné aktivita CSF zabraňuje degradaci metafázových cyklinů proteázomem a tím inaktivaci MPF (Tunquist and Maller, 2003).

3.2.3 cAMP (Cyklický adenosin 3'5' monofosfát)

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) zastává funkci druhého posla v řadě signálních drah. cAMP je rozpustný ve vodě a může tedy přenášet signál z místa na membráně, kde je tvořen, k proteinům v cytosolu, jádru nebo jiným částem membrány (Alberts *et al.*, 1998). Jedna hypotéza tvrdí, že cAMP je produkován folikulárními buňkami a difunduje přes spoje gap junctions do oocyty (Anderson and Albertini, 1976; Bornslaeger and Schultz 1985). Alternativní hypotéza tvrdí, že si oocyt vyrábí vlastní cAMP a v plně dospělých oocytech jsou tak udržovány vysoké hladiny cAMP (Mehlmann, 2005). U oocytů hlodavců je cAMP tvořen v oocytech prostřednictvím aktivity receptoru spřaženého s G-proteinem (Mehlmann *et al.*, 2004, 2002).

Meiotický buněčný cyklus u savčích oocytů je regulován na úrovni translace proteinů, jejich degradací i jejich post-translačních modifikací. A právě cAMP je negativním klíčovým regulátorem těchto událostí (Dekel, 2005). cAMP udržuje oocyt v meiotickém bloku a opětovné zahájení meiózy následuje po poklesu koncentrace tohoto cyklického nukleotidu a v přítomnosti PKA (proteinkinázy A), vzniklé při inaktivaci cAMP (Cho *et al.*, 1974; Schultz *et al.*, 1983; Kim and Menino, 1995). MAP kináza jakožto klíčový regulátor buněčného růstu je inhibována zvýšenou hladinou cAMP (Fan, 2002), takže pokles hladin cAMP v GV oocytech je předpokladem aktivace MAPK (Sun *et al.*, 1999b). Hladina cAMP uvnitř vajíčka ovlivňuje také aktivitu MPF. Vysoké hladiny cAMP v rámci oocytů mají za následek fosforylaci CDK1 na threoninu-14 a tyrosinu-15, které MPF činí neaktivním (Duckworth *et al.*, 2002). Pokles cAMP v oocytech na počátku zrání vede k aktivaci komplexu MPF a oocyty jsou tak znovu schopné vstoupit do meiózy. Současně s potlačením MPF aktivity snižuje cAMP syntézu cyklin B1 a tím minimalizuje jeho dostupnost pro pre-MPF (Josefsberg *et al.*, 2003). Jednotlivý soubor kroků, jimiž cAMP aktivuje nebo deaktivuje MPF, jsou stále předmětem výzkumů (Mehlmann, 2005).

3.3 Sulfan (H₂S)

3.3.1 Vlastnosti, toxikologie

Sulfan (H₂S), dříve označován jako sirovodík, je bezbarvý prudce jedovatý plyn s typickým zápachem zkažených vajec. Sulfan má silně redukční účinky (Vacík *et al.*, 1999).

Plazmatické membrány jsou propustné pro sulfan a jeho rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech je pětikrát větší než ve vodě (Wang, 2002). Až do nedávna byl sulfan znám pouze jako toxický plyn znečišťující životní prostředí. V posledních letech se ale k sulfanu přistupuje jako k biologicky významné signalizační molekule s nesčítelným množstvím fyziologických funkcí. Zda bude mít sulfan na organismus pozitivní nebo negativní vliv záleží na koncentraci plynu a také metabolismu a druhu organismu (Lavu *et al.*, 2011).

Deriváty sulfanu, sulfidy, interagují s řadou enzymů a makromolekul včetně hemoglobinu a myoglobinu. Interakcí s hemoglobinem vzniká sulphaemoglobin. Cílovým enzymem sulfidu je mitochondriální cytochrom oxidáza, která je součástí elektronového transportního systému oxidativní fosforylace, hlavního systému tvorby buněčné energie. Kyslík je konečný substrát tohoto systému a je nezbytný pro jeho funkci (Geer *et al.*, 1995). Ve skutečnosti je sulfan silnějším inhibitorem mitochondriální respirace než kyanid (Reiffenstein *et al.*, 1992). Následky účinku sulfidu jsou stejné jako při nedostatku kyslíku v organismu nebo při dušení (Geer *et al.*, 1995). Akutní otravy sulfanu vedou k reverzibilnímu bezvědomí v důsledku respirační paralýzy a buněčné anoxie (Burnett *et al.*, 1977). Hranice mezi toxickými a fyziologickými účinky sulfanu je však velmi tenká (Warenycia *et al.*, 1989).

3.3.2 Biosyntéza a katabolismus

Sulfan je produkován v buňkách třemi enzymy: cystathionin- β -syntázou (CBS), cystathionin- γ -lyázou (CTH) a 3-mercaptopyruvát sulfurtransferásou (3-MPST). Exprese a aktivita těchto enzymů se liší v různých tkáních (Wang, 2002; Shibuya *et al.*, 2009). V některých tkáních je pro tvorbu sulfanu potřeba přítomnost enzymů více typů enzymů zároveň, zatímco v jiných jeden enzym postačuje (Wang, 2002). Nejvyšší míra produkce byla zaznamenána v mozku, kardiovaskulární soustavě, játrech a ledvinách (Doeller *et al.*, 2005). Hladina sulfanu v mozku je až třikrát vyšší než v krevním séru, tato hladina úzce hraničí s toxickou koncentrací. Jediným substrátem pro generování endogenního sulfanu je L-cystein, aminokyselina obsahující síru (Lowicka and Betowski, 2007).

CTH katalyzuje přeměnu cystinu (cysteinového disulfidu) na thiocystein, pyruvát a amoniak. Thiocystein se poté neenzymaticky rozkládá na cystein a sulfan. Vznik sulfanu enzymem CBS zahrnuje pravděpodobně kondenzaci homocysteinu s cysteinem za vzniku cystathioninu a uvolnění sulfanu. Enzym CBS je převládajícím zdrojem sulfanu v centrálním nervovém systému, oproti tomu CTH vytváří většinu sulfanu v kardiovaskulárním systému

(Chen *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že sulfan vykazuje negativní zpětný účinek na aktivitu těchto enzymů. Zvýšená hladina sulfanu potlačuje aktivitu CTH (Kredicche *et al.*, 1973) a míru glukoneogeneze z cysteinu (Simpson and Freedland, 1976).

Mechanismus degradace sulfanu je nutný pro udržení adekvátních netoxických tkáňových hladin. Sulfan rychle oxiduje, především v mitochondriích, zpočátku na thiosulfát, který je dále metabolizován na sulfát a poté na síran (Lowicka and Betowski, 2007). Močový thiosulfát je považován za specifický marker celotělové produkce sulfanu (Belardinelli *et al.*, 2001). Druhá cesta katabolismu sulfanu je jeho methylace pomocí thiolové S-methyltransferázy (TSMT) na methanthiol a dimethylsulfid (Furne *et al.*, 2001). Tato reakce probíhá hlavně v cytosolu (Lowicka and Betowski, 2007).

3.3.3 Účinky na organizmus

Předpokládá se, že sulfan je třetím endogenním signalizačním gasotransmitterem, vedle oxidu dusnatého (NO) a oxidu uhelnatého (CO). V mnoha systémech je účinek sulfanem zprostředkován draslíkovými kanály (K_{ATP}) (Cheng *et al.*, 2004). Přesný mechanismus, kterým sulfan stimuluje K_{ATP} kanály, není ovšem zcela jasný.

Bylo zjištěno, že sulfan ovlivňuje mnoho typů tkání a systémů. Například regulací iontových kanálů a činností kináz se podílí na regulaci apoptózy somatických buněk. Jeho účinek může být proapoptotický nebo anti-apoptotický v závislosti na situaci a typu buňky (Yang *et al.*, 2004; Yang and Wang, 2007). Inhibice endogenní produkce sulfanu vede k apoptóze (Li *et al.*, 2014). Sulfan reguluje aktivitu proteinů nahrazením skupiny SH s SSH skupinou v proteinu. Tato reakce (sulfhydratace) je důležitým faktorem, který řídí činnost 10 až 25% proteinů v játrech (Mustafa *et al.*, 2009). Sulfan také reguluje membránové iontové kanály mozkové tkáně a činnost mnoha enzymů, které mohou mít vliv na mozkovou činnost. Sulfan, podobně jako oxid dusnatý, patří mezi molekuly, které se účastní předávání informací mezi nervovými buňkami a je zapojen do procesů formování paměti a učení (Abe and Kimura, 1996). Byly prokázány protektivní účinky sulfanu v neurologických systémech (Olson, 2011).

Sulfan, podobně jako oxid dusnatý, reguluje kontraktilitu cév (Zhao *et al.* 2001). Tyto účinky sulfanu spočívají v působení na buňky hladkých svalů (Lowicka and Beltowsky, 2007), např. v gastrointestinálním traktu (Wallace *et al.*, 2007) či dýchacím systému (Olson, 2011). V buňkách hladkého svalstva izolovaných z krevních cév sulfan zvyšuje propustnost

kanálů K_{ATP} a následně hyperpolarizuje buněčnou membránu (Starka, 2009). Sulfan snižuje adhezi leukocytů, inhibuje agregaci destiček, snižuje škodlivou remodelaci cév, která často doprovází poškození cév (Li *et al.*, 2009). Byl prokázán současně negativní i kardioprotektivní účinek sulfanu na srdce (Olson, 2011).

Bylo zjištěno, že sulfan také působí protizánětlivě, např. v dýchacím systému (Olson, 2011) a v tlustém střevě dokonce zlepšuje hojení vředů (Wallace *et al.*, 2007)

Celková nedostatečná činnost enzymu CBS v organismu vede ke zvýšení hladiny homocysteinu související s kardiovaskulárními, očními, nervovými a kosterní problémy (Maron and Loscalzo, 2009). Nedostatek CTH způsobuje cystathioninurii, která je sekundárně spojena s velkým množstvím onemocnění, např. diabetes insipidus, Downovým syndromem, neuroblastomem, hepatoblastomem a celiakií (Kabil and Banerjee, 2010).

3.3.4 Sulfan v reprodukční soustavě

Sulfanu je v dnešní době věnována pozornost především pro jeho vlastnosti, které usnadňují erekci penisu. Podle Srilatha *et al.* (2006) se sulfan podílí na uvolňování hladkého svalstva v krevních cévách, což je jeden ze základních principů erekce penisu. Současně má sulfan pozitivní vliv na tlak v topořivých těliscích u primátů. Ve varlatech krysu byla odhalena odlišná distribuce dvou enzymů. CBS je přítomen hlavně v Leydigových, Sertoliho a zárodečných buňkách, zatímco CTH byl detekován pouze v nezralých zárodečných a Sertoliho buňkách (Sugiura *et al.*, 2005). Z jiných studií lze předpokládat, že se sulfan podílí na regulaci funkcí varlete (Šmelcová and Tichovská, 2011).

V samičí reprodukční soustavě Patel *et al.* (2009) prokázali distribuci enzymů CBS a CTH v děloze, plodových obalech a placentě krysu. Také v myších ovariích a granulózních buňkách byla nalezena vysoká exprese CBS (Liang *et al.*, 2006). Myši, kterým byl vyblokován gen pro CBS, vykazovaly nižší počty rozvíjejících se folikulů, kratší a nepravidelné estrální cykly (Guzman *et al.*, 2006). Kromě toho Liang *et al.* (2007) zjistili, že potlačením exprese CBS v granulózních buňkách, dojde k inhibici meiotického zrání oocyty. Podobně jako NO a CO je sulfan zapojen do regulace kontraktility dělohy. Sidhu *et al.* (2001) prokázali, že sulfan snižuje děložní kontrakce během březosti u krysu a tím oddaluje porod. Sulfidové ionty brání vázání oxytocinu na jeho receptory, čímž potlačují děložní kontrakce (Hayden *et al.*, 1989). Nedávno bylo také zjištěno, že sulfan uvolňuje hladkou svalovinu

reprodukčního traktu pomocí signální dráhy oxidu dusnatého a zvýšením propustnosti K_{ATP} kanálů (Srilatha *et al.*, 2009).

3.3.5 Sulfan v oocytech

V oocytech byla pozorována přítomnost CBS, CTH i 3-MPST, enzymů uvolňující sulfan. Endogenní produkce sulfanu byla zjištěna u nezralých i dozralých oocytů. Nedávné studie zjistily, že sulfan je důležitým buněčným poslem během meiózy savčích oocytů a kumulární expanze buněk (Nevoral *et al.*, 2015). Dosud však není objasněna přesná intracelulární distribuce těchto enzymů v buňkách.

Studie Nevorala a kolektivu (2015) prokázaly účinek exogenního sulfanu na meiotické zrání prasečích oocytů. Bylo zjištěno, že sulfan urychluje zrání oocyty pomocí řízení aktivity MPF a MAPK. Přesný princip regulace těchto faktorů ovšem není znám. Dále bylo zjištěno, že sulfan ovlivňuje expanzi kumulárních buněk a produkci kyseliny hyaluronové, která je vylučovaná kumulárními buňkami během jejich expanze (Nevoral *et al.*, 2014). Snížená produkce kyseliny hyaluronové může způsobit selhání zrání oocyty (Tunjung *et al.*, 2009). Kyselina hyaluronová funguje jako signální molekula, která reguluje zrání oocytů (Yokko *et al.*, 2007) a expandovaný kumululus zabraňuje přívodu inhibitorů meiózy do oocyty (Dekel *et al.*, 1981; Tornell *et al.*, 1984). Bylo zjištěno, že snížená produkce sulfanu je zřejmě jedním z markerů procesu stárnutí oocyty (Krejčová *et al.*, 2015). Dále studie Krejčové *et al.*, (2015) jasně prokázaly roli sulfanu v ochraně prasečích oocytů proti procesu stárnutí. Je známo, že oocyty procházejí během stárnutí funkčními a morfologickými změnami. Snižování činnosti MAPK a inaktivace MPF vedou k jednomu z hlavních projevů stárnutí, ke spontánní aktivaci partenogeneze. Stárnoucí oocyty mohou díky vysoké aktivitě MAPK fragmenovat (apoptovat) nebo podléhat lýze (Petrova *et al.*, 2004). Naproti tomu produkce sulfanu potlačuje fragmentaci v průběhu stárnutí oocyty (Krejčová *et al.*, 2015).

4 Materiál a metodika

4.1 Izolace a *in vitro* kultivace zrajících oocytů

Prasečí vaječníky použité v experimentech byly získány od 6 až 8 měsíců starých necyklujících prasnic (kříženec Landrace x Large White). Vaječníky byly dováženy z jatek (Jatky Plzeň a.s., Plzeň, Česká republika) přímo z poražených zvířat. Poté byly ihned transportovány do laboratoře v termolahvách o teplotě 39 °C. V laboratoři byly kumulo-oocytární komplexy (COCs) získány z vaječnicků aspirací folikulární tekutiny pomocí jehly 20 - gauge. Aspirovná folikulární tekutina s oocyty, s průměrnou velikostí 2-5 mm, byla přemístěna z injekční stříkačky do Petriho misky. Následně byly pod binokulární lupou z folikulární tekutiny skleněnou kapilárou vybírány oocyty. Pro experiment byly následně vyselektovány pouze zcela vyvinuté oocyty s neporušenou cytoplazmou, obklopené kompaktním kumulem.

Zrání vybraných COCs probíhalo v modifikovaném médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA), s přidavkem 32,5 mM hydrogenuhličitanu sodného, 2,75 mM vápníku L-laktátu, 0,025 mg/ml gentamicinu, 6,3 mM HEPES, 13,5 IU EKG: 6,6 IU hCG/ml (P.G.600; Intervet International B. V., Boxmeer, Holandsko) a 5% (v/v) fetálního hovězího séra (Sigma Aldrich, USA). COCs byly kultivovány ve 4- jamkových Petriho miskách (Nunc, Fisher Scientific, USA), které obsahovaly 1,0 ml kultivačního média. Kultivace probíhala po dobu 48 h při teplotě 39 °C ve směsi 5% CO₂ se vzduchem.

4.2 Hodnocení zrání oocytů

Na konci kultivace byla do média přidána 0,1% hovězí testikulární hyaluronidáza (Sigma Aldrich, USA) rozpuštěná v M199 médiu. Opakovaným pipetováním, úzkou skleněnou pipetou, byly od oocytů odděleny kumulární buňky. Následně byly oocyty montovány na mikroskopické podložní sklíčko s vazelínou, zakryty krycím sklem a fixovány v ethanolu a kyselině octové (3:1, v/v) po dobu nejméně 48 hodin. Následně byly oocyty barveny 1,0% orceinem v 50 % vodném roztoku kyseliny octové a zkoumány pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon, Japan). V souladu s publikovanými kritérii byly oocyty dle Motlíka *et* Fulky (1976) rozřazeny do pěti skupin podle fáze meiotického zrání: GV - zárodečný váček, LD - pozdní diakineze, MI - metafáze I, AITI- přechod anafáze I a telofáze I, MII- metafáze II.

4.3 Imunocytochemie

Po ukončení kultivace byly odstraněny kumulární buňky pomocí 0,1% hyaluronidázy v PBS-PVA (0,1%) a mitochondrie a endoplasmatické retikulum oocytů bylo následně vitálně barveno za použití mitotrackeru (M7510; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) o finální koncentraci 400nm; nebo ERtrackeru (E34250; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) o finální koncentraci 400nm v podmínkách řízené atmosféry po dobu 10 minut. Po ukončení inkubace byly oocyty nafixovány 2% formaldehydem a následně imunocytochemicky zpracovány.

CBS, CTH a 3-MPST byly vizualizovány metodou imunocytochemie podle Yi *et al* (2014). Nezralé GV a zralé MII (viditelné pólové tělísko) byly po kultivaci zbaveny kumulárních buněk. Následně byla 0.5 % pronásova (Sigma) odstraněna *zona pellucida* a oocyty byly fixovány 40 min. při pokojové teplotě ve 2 % formaldehydu, následně promyty v PBS-NaN₃ a 40 min. permeabilizovány v PBS- NaN₃ s 0.1 % Triton-X-100 (PBS-NaN₃-TX). Poté byly oocyty 25 min. inkubovány v PBS-NaN₃-TX obohaceném o 5 % normální kozi sérum (NGS). Následně byly oocyty přes noc při teplotě 4 °C inkubovány s králičí polyklonální anti-HBs (ab 96252, 1:200; Abcam, Velká Británie), králičí polyklonální anti-CTH (sc-135203, 1:200, Santa-Cruz Biotechnology, USA) nebo králičí polyklonální anti-3-MPST (ab85377, 1:200; Abcam, UK), které byly ředěny v PBS-NaN₃-TX s 1 % NGS (1:200; Abcam, UK). Poté byly oocyty dvakrát promyty PBS-NaN₃-TX s 1 % NGS a montovány do Vectashield s 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, USA). 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). U vzorků negativní kontroly se postupovalo shodně, pouze nebyly inkubovány se specifickou protilátkou. Snímky negativní kontroly byly zpracovány pro srovnání a vyhotovení výsledných hodnot pokusu.

4.4 Analýza obrazu a kolokalizace

Analýza obrazu, spolu s 2D dekonvolucí, byla provedena pomocí NIS Elements a intenzity signálu CBS, CTH nebo 3-MPST byly sníženy o bazální intenzity signálu příslušné negativní kontroly. Dále byla provedena kolokalizace signálů. Kolokalizace je nejčastěji popisována pomocí těchto koeficientů: Pearsonovým korelačním koeficientem a Manderovým koeficientem. Pearsonův korelační koeficient vyjadřuje korelaci intenzity

distribuce signálu mezi kanály. Jeho hodnoty se pohybují od -1.0 do 1.0. Hodnota 0 poukazuje na neexistující signifikantní korelaci a jeho negativní hodnoty popisují negativní korelaci. Manderův koeficient překryvu popisuje prostý překryv signálů, bez ohledu na intenzitu signálů. Hodnoty se pohybují od 0 do 1.0. Hodnota 0.5 popisuje 50% kolokalizaci signálů, 0 hodnota značí, že nedochází k žádnému překryvu signálu.

4.5 Statistické hodnocení

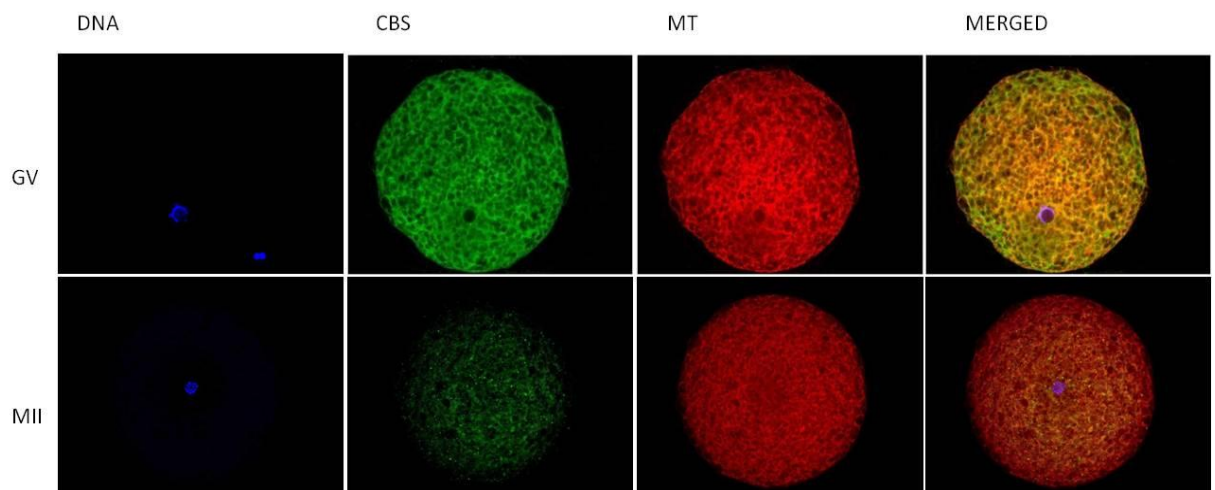
Data všech experimentů byla podrobena statistické analýze. Experimenty byly opakovány min. 3x. Data získaná z experimentů pak byla zpracována prostřednictvím obecných lineárních modelů (GLM) v programu Statistica. Pro stanovení významných rozdílů mezi skupinami byl použit Scheffes. Stupeň odlišnosti byl stanoven s odchylkou $P < 0.05$.

5 Výsledky

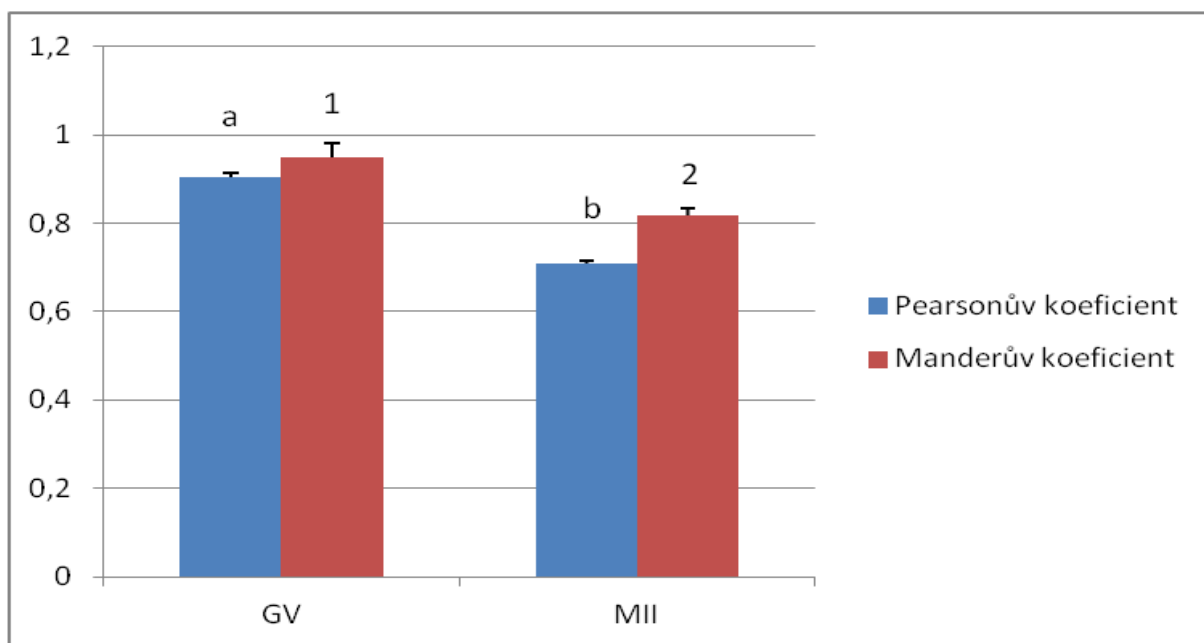
5.1 Přítomnost CBS v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym CBS vyskytuje v mitochondriích prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozrálé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 1).

Z výsledků je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu CBS statisticky významně liší. V oocytech dochází ke snižování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu CBS a mitochondrií (hodnota GV: $0,91 \pm \text{SEM}: 0,01$ versus hodnota MII: $0,71 \pm \text{SEM}: 0,03$). Podobný trend vykazuje také Manderův koeficient, kdy během zrání oocytů dochází k jeho snižování o hodnotu $0,13 \pm \text{SEM}: 0,01$. Hodnoty Pearsonova koeficientu a Manderova koeficientu pro enzym CBS kolokalizovaný s MitoTracker Red v GV a MII oocytech jsou shrnuty v obrázku 2.



Obrázek 1: Imunocytochemická lokalizace enzymu CBS v mitochondriích a analýza obrazu oocytu ve stádiu GV a MII. MT- lokalizované mitochondrie pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+CBS+MT.

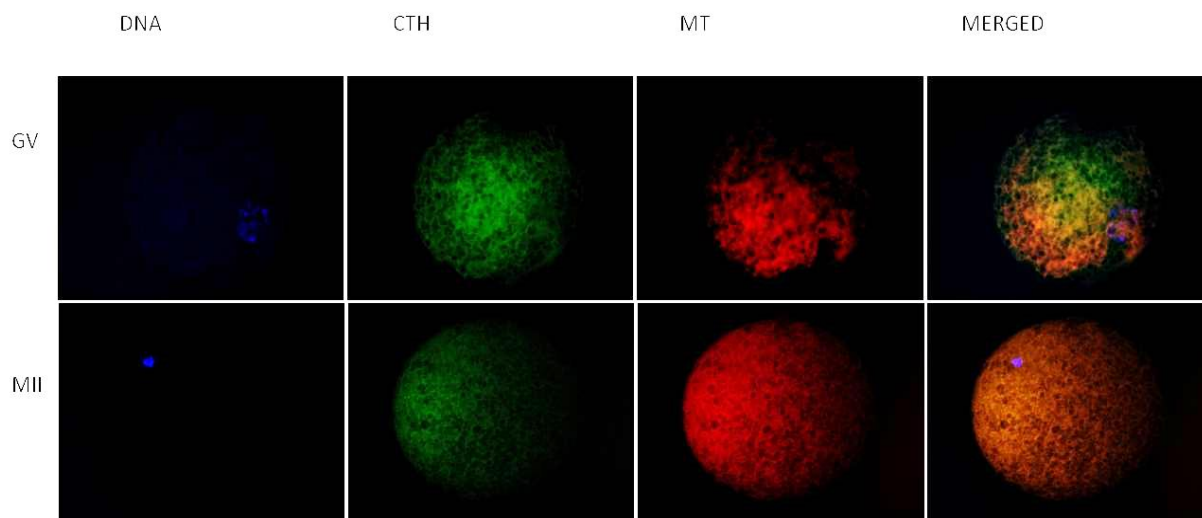


Obrázek 2: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu CBS v mitochondriích GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

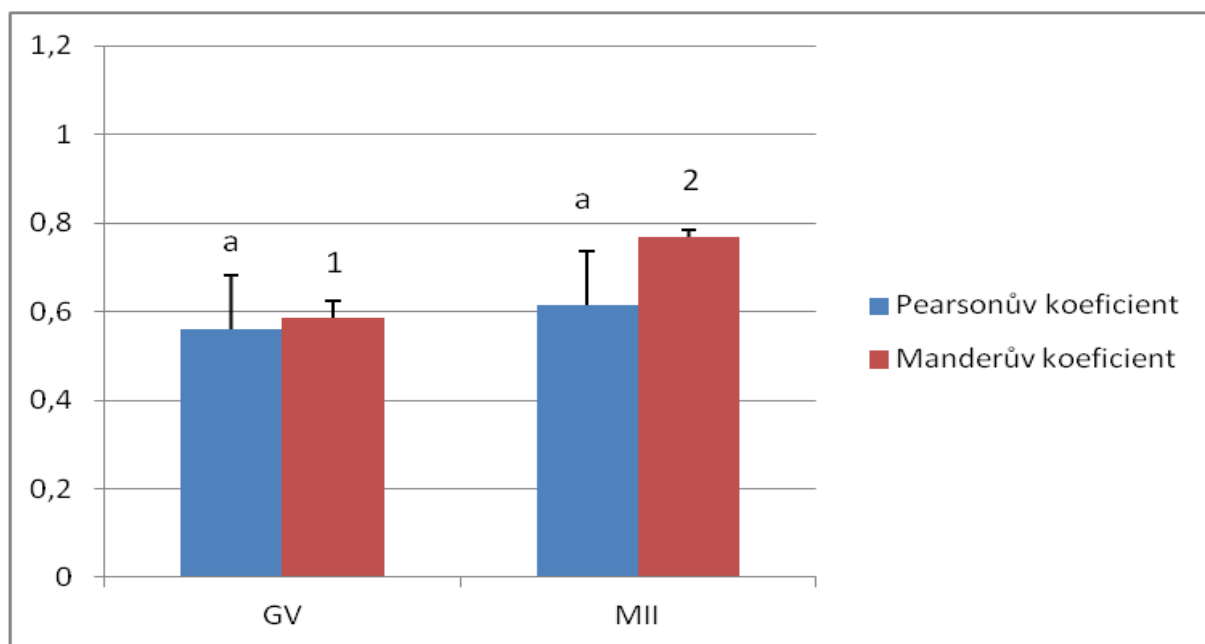
5.2 Přítomnost CTH v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym CTH vyskytuje v mitochondriích prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozralé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 3).

Z výsledků získaných a zanesených do obrázku 4 je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu CTH liší. V oocytech dochází ke zvyšování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu CTH a mitochondrií (hodnota GV: $0,56 \pm \text{SEM}: 0,12$ versus hodnota MII: $0,61 \pm \text{SEM}: 0,04$). Podobný trend vykazuje také Manderův koeficient, u nějž dochází během zrání oocytů k nárůstu o hodnotu $0,18 \pm \text{SEM}: 0,11$.



Obrázek 3: Imunocytochemická lokalizace enzymu CTH v mitochondriích a analýza obrazu oocyty ve stádiu GV a MII. MT - lokalizované mitochondrie pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+CTH+MT.

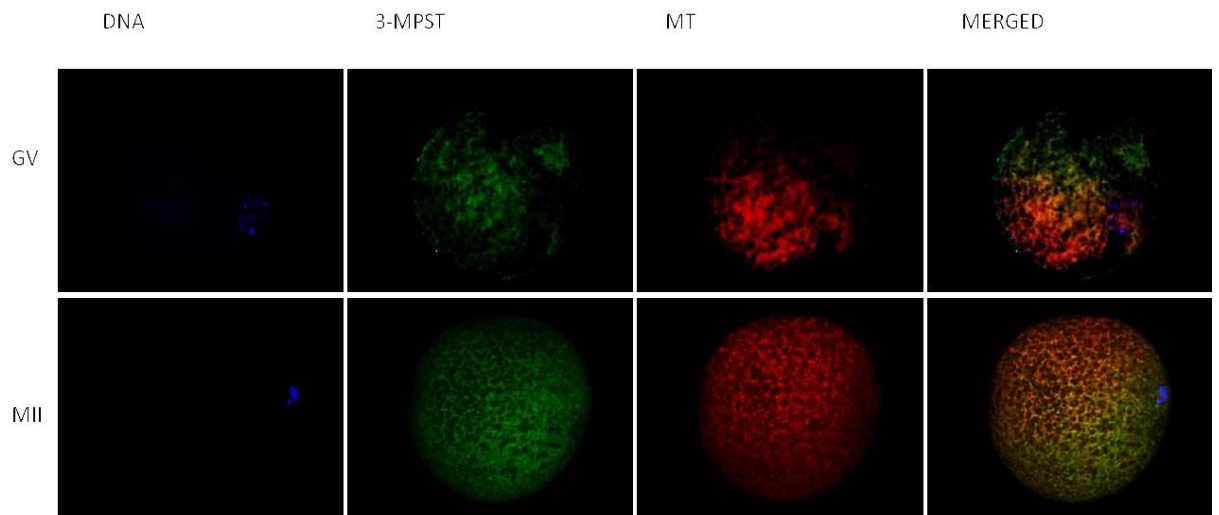


Obrázek 4: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu CTH v mitochondriích GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

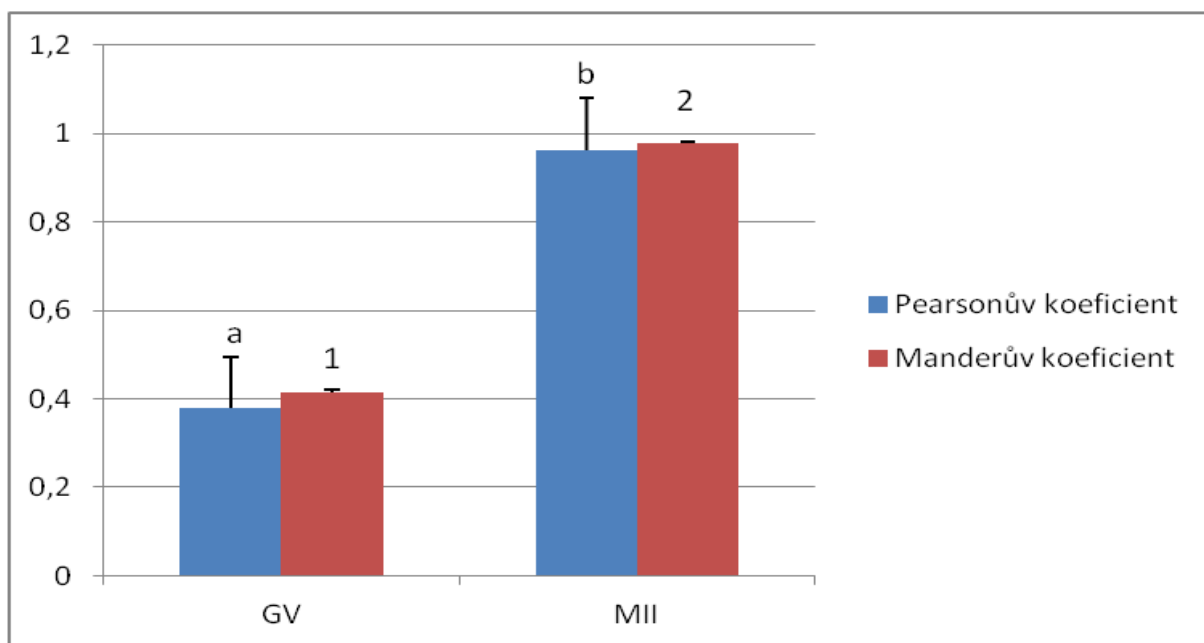
5.3 Přítomnost 3-MPST v mitochondriích prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym 3-MPST vyskytuje v mitochondriích prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozrálé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 5).

Z výsledků je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu 3-MPST statisticky významně liší. V oocytech dochází ke zvyšování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu 3-MPST a mitochondrií (hodnota GV: $0,38 \pm \text{SEM}: 0,12$ versus hodnota MII: $0,96 \pm \text{SEM}: 0,01$). Podobný trend vykazuje také Manderův koeficient, kdy během zrání oocytů dochází k jeho zvyšování o hodnotu $0,56 \pm \text{SEM}: 0,11$. Hodnoty Pearsonova koeficientu a Manderova koeficientu pro enzym 3-MPST kolokalizovaný s MitoTracker Red v GV a MII oocytech jsou shrnuty v obrázku 6.



Obrázek 5: Imunocytochemická lokalizace enzymu 3-MPST v mitochondriích a analýza obrazu oocytu ve stádiu GV a MI. MT - lokalizované mitochondrie pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+3-MPST+MT.



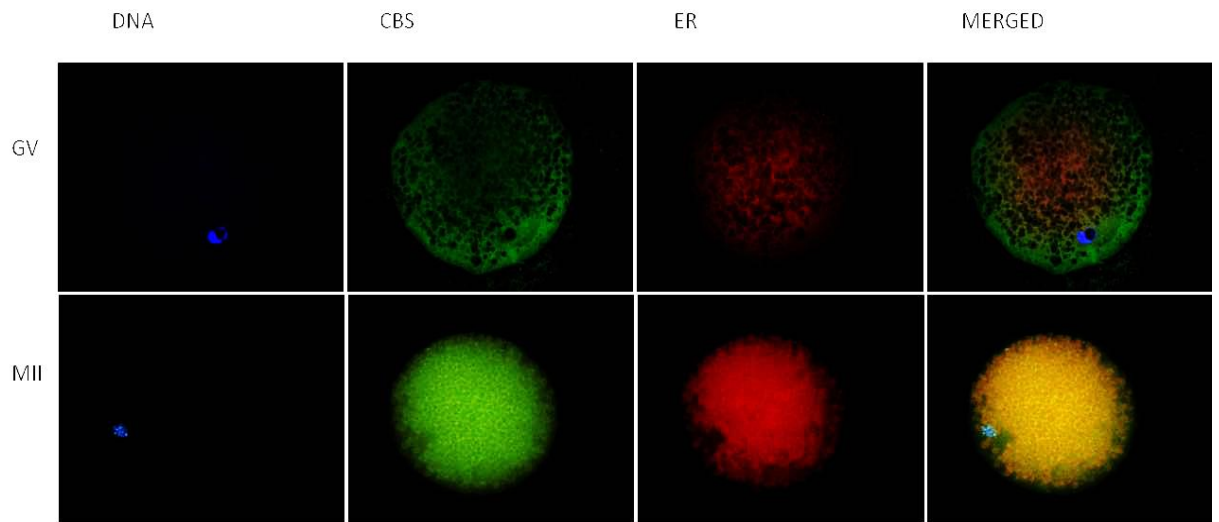
Obrázek 6: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu 3-MPST v mitochondriích GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

5.4 Přítomnost CBS v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

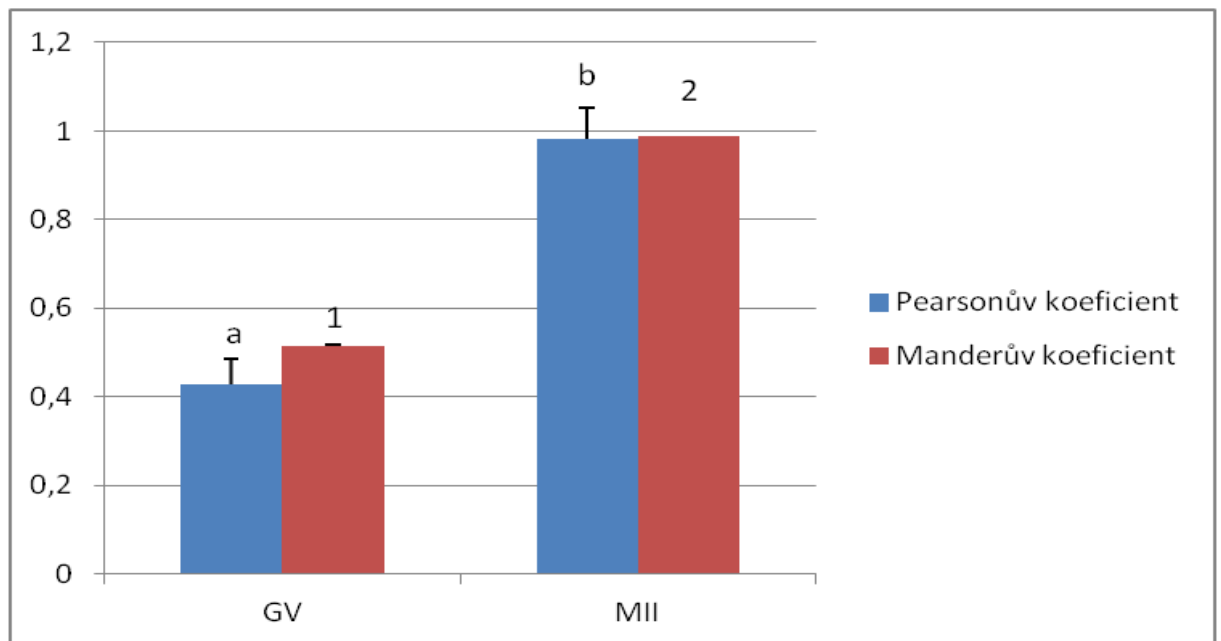
Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym CBS vyskytuje v endoplasmatickém retikulu prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozrálé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 7).

Z výsledků získaných a zanesených do obrázku 8 je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu CBS statisticky významně liší. V oocytech dochází ke zvyšování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu CBS a endoplasmatického retikula (hodnota GV: $0,43 \pm \text{SEM}: 0,06$ versus hodnota MII: $0,98 \pm \text{SEM}: 0$). Podobný trend vykazuje také

Manderův koeficient, u nějž dochází během zrání oocytů k nárůstu o hodnotu $0,47 \pm \text{SEM}$: $0,07$.



Obrázek 7: Imunocytochemická lokalizace enzymu CBS v endoplazmatickém retikulu a analýza obrazu oocyty ve stádiu GV a MII. ER - lokalizované endoplasmatické retikulum pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+CBS+ER.

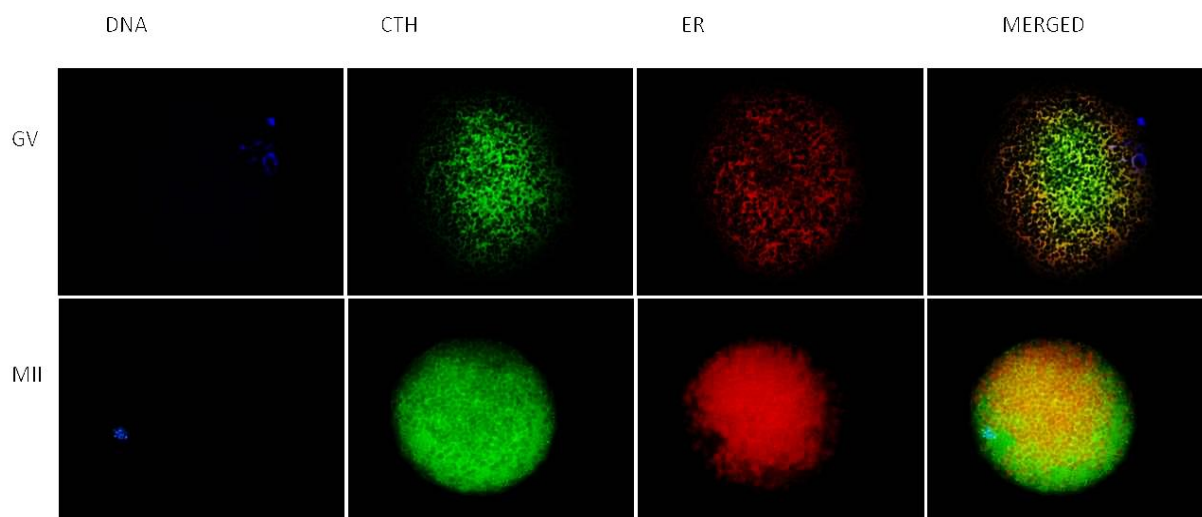


Obrázek 8: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu CBS v endoplasmatickém retikulu GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

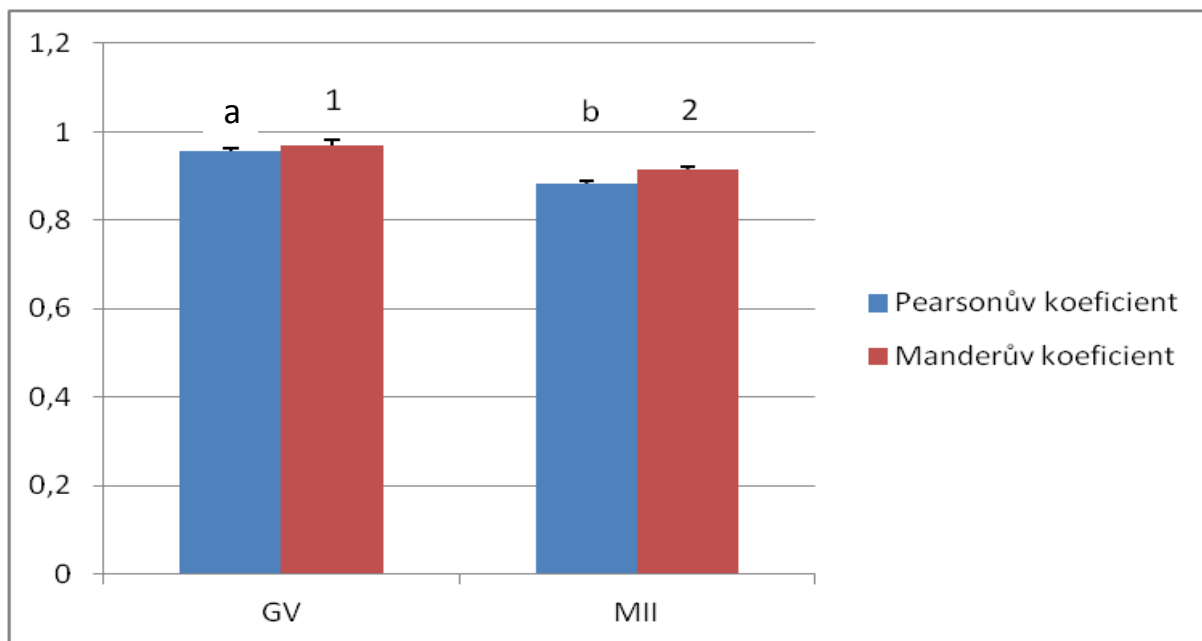
5.5 Přítomnost CTH v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym CTH vyskytuje v endoplasmatickém retikulu prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozralé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 9).

Z výsledků je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu CTH statisticky významně liší. V oocytech dochází ke snižování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu CTH a endoplasmatických retikul (hodnota GV: $0,96 \pm \text{SEM}: 0,01$ versus hodnota MII: $0,88 \pm \text{SEM}: 0,01$). Podobný trend vykazuje také Manderův koeficient, kdy během zrání oocytů dochází k jeho snižování o hodnotu $0,06 \pm \text{SEM}: 0$. Hodnoty Pearsonova koeficientu a Manderova koeficientu pro enzym CTH kolokalizovaný s MitoTracker Red v GV a MII oocytech jsou shrnuty v obrázku 10.



Obrázek 9: Imunocytochemická lokalizace enzymů CTH v endoplasmatickém retikulu a analýza obrazu oocytu ve stádiu GV a MII. ER - lokalizované endoplasmatické retikulum pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+CTH+ER.



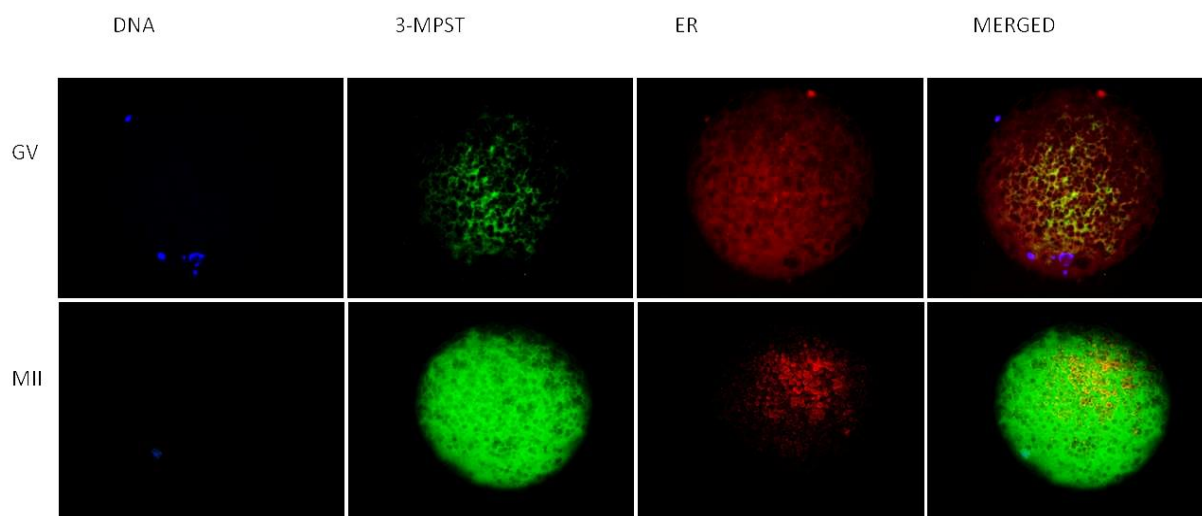
Obrázek 10: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu CTH v endoplasmatickém retikulu GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

5.6 Přítomnost 3- MPST v endoplasmatickém retikulu prasečích GV oocytů a oocytů dozrálých *in vitro*

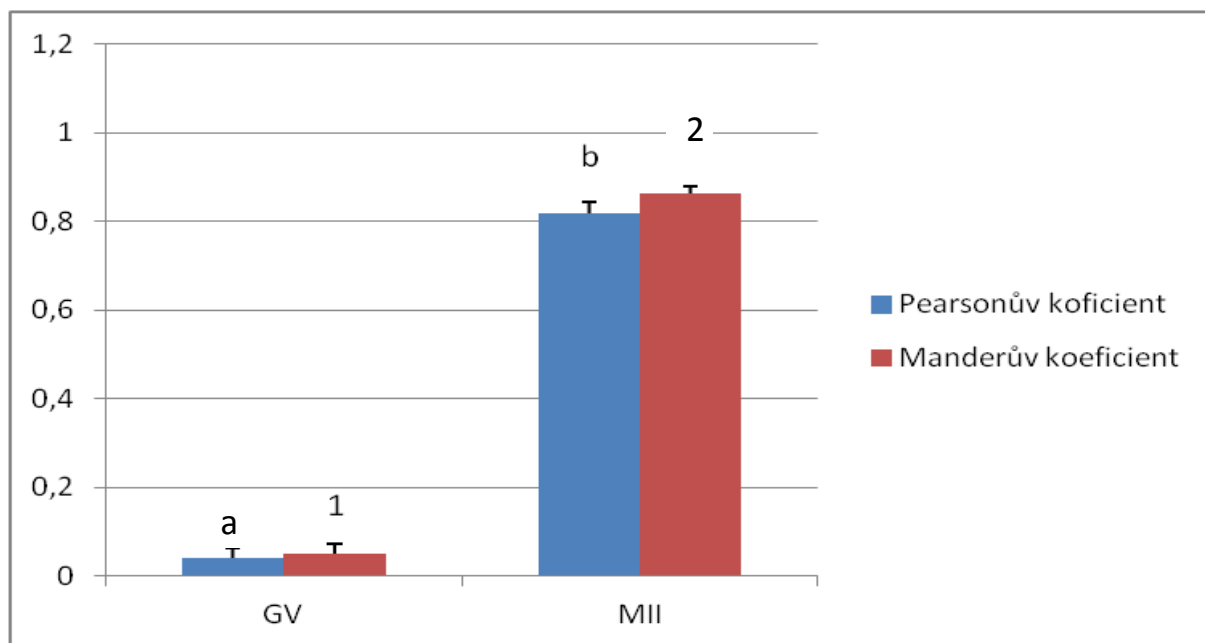
Cílem experimentu bylo zjistit, zda se enzym 3-MPST vyskytuje v endoplasmatickém retikulu prasečích oocytů. Pro tento účel byly použity nezralé oocyty ve stádiu GV a oocyty dozrálé v podmínkách *in vitro* do stádia MII. Přítomnost enzymu byla zjišťována imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a následnou analýzou obrazu pomocí modulu kolokalizace - Pearsonova koeficientu vyjadřující korelaci mezi fluorescenčními kanály FITC a MitoTracker Red a Manderova koeficientu vyjadřujícího překryv obou barevných kanálů (obrázek 11).

Z výsledků získaných a zanesených do obrázku 12 je patrné, že v průběhu meiotického zrání se distribuce enzymu 3-MPST statisticky významně liší. V oocytech dochází ke zvyšování Pearsonova kolokalizačního koeficientu signálu 3-MPST a endoplasmatického retikula (hodnota GV: $0,04 \pm \text{SEM}: 0,02$ versus hodnota MII: $0,82 \pm \text{SEM}: 0,02$). Podobný

trend vykazuje také Manderův koeficient, u nějž dochází během zrání oocytů k nárůstu o hodnotu $0,81 \pm \text{SEM}: 0,01$.



Obrázek 11: Imunocytochemická lokalizace enzymů 3-MPST v endoplazmatickém retikulu a analýza obrazu oocytu ve stádiu GV a MII. ER - lokalizované endoplasmatické retikulum pomocí MitoTracker Red. MERGED: DNA+3-MPST+ER.



Obrázek 12: Hodnoty Pearsonova a Manderova koeficientu pro korelaci signálu 3-MPST v endoplazmatickém retikulu GV a MII oocytů. Osa x znázorňuje intenzitu signálu distribuce enzymu, osa Y znázorňuje jednotlivá stádia oocytů, sloupce odpovídají průměru a standardní chybě průměru (S.E.M.). Modré sloupce znázorňují hodnoty Pearsonova koeficientu, červeným sloupcům odpovídají hodnoty Manderova koeficientu. ^{ab/1,2}Statisticky významné rozdíly intenzity signálu jsou označeny různými superskripty, které označují statisticky signifikantní rozdíly mezi GV a MII ($p < 0,05$).

6 Diskuze

Pro zvýšení účinnosti biotechnologických metod je důležité podrobně znát mechanismy regulující reprodukční procesy. Je dlouhodobě známo, že regulační mechanismy jsou ovlivňovány zejména hormony a enzymy. V poslední době se ukazuje, že i mnohem menší plynné molekuly - gasotransmitery mají vliv na reprodukční procesy (Šmelcová and Tichovská, 2011). Mezi doposud známé gasotransmitery patří NO, CO a H₂S (Furchgott and Zawadski, 1980). Tyto tři molekuly fyziologicky účinkují v nízkých koncentracích a při vysokých koncentracích jsou pro organismus toxické (Wang, 2002). Gasotransmitery jsou malé plynné molekuly snadno prostupující biologickými membránami, jsou endogenně a enzymaticky generované a regulované. Ve fyziologických koncentracích mají definované specifické funkce a specifické buněčné cíle (Linden *et al.*, 2010).

Experimenty studující vliv gasotransmiterů na oocyt byly prováděny zejména v souvislosti s gasotransmiterem oxidem dusnatým (NO). Enzym uvolňující oxid dusnatý (syntáza NO, NOS) byl stejně jako enzymy uvolňující sulfan nalezen v oocytech prasat a mnoha dalších druhů zvířat (Tao *et al.*, 2004, Chmelíková *et al.*, 2009). Bylo zjištěno, že přítomnost oxidu dusnatého je nezbytná pro růst a meiotické zrání oocytu (Jablonka *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 2004). Bylo prokázáno, že oxid dusnatý v malých koncentracích může působit stimulačně, naopak vyšší koncentrace mohou mít inhibiční efekt na meiotické zrání (Sengoku *et al.*, 2001). Předpokládá se, že oxid dusnatý ovlivňuje meiotické zrání regulací MAPK stejně jako sulfan (Sela-Abramovich *et al.*, 2008).

Předchozí experimenty zabývající se syntézou a funkcí sulfanu v oocytech prokázaly, že sulfan přispívá k urychlení zrání oocytů během kultivace *in vitro*. Zrání bylo urychleno díky dřívější aktivaci a navýšení hladin MPF a MAPK, jenž regulují meiotické zrání (Kubelka *et al.*, 2000; Nevorál *et al.*, 2015). Jakým způsobem ale sulfan MPF a MAPK řídí, není doposud jasné. V úvahu přichází možnost, že sulfan tyto dva faktory reguluje přímo pomocí Sulhydratace (Mustafa *et al.*, 2009) nebo je reguluje nepřímo pomocí sulhydratace jiných proteinů (iontových kanálů apod.) (Tang *et al.*, 2009). Bylo také zjištěno, že sulfan má vliv na hladinu kyseliny hyaluronové a kumulární expanzi buněk. Nevorál *et al.* (2015) prokázali, že inhibicí enzymů uvolňujících sulfan dochází k oddálení znovuzahájení meiózy (GVBD) a zpomalení následujících meiotických fází. Sulfan je podle Krejčové *et al.* (2014) zapojen do

procesu stárnutí oocytů a tyto oocyty vykazují sníženou produkci sulfanu. Publikovaná i vlastní pozorování podporují domněnku, že sulfan je v oocytech savců přítomný a nezbytný pro procesy, které oocyt přirozeně postihují, tj. meiotické zrání, popř. oplození a následný embryonální vývoj.

Cílem této diplomové práce bylo prokázat distribuci enzymů uvolňujících sulfan, CBS, CTH, a 3-MPST, v oocytech v průběhu meiotického zrání a zda se jejich přítomnost v buněčných organelách mění v závislosti na stádiu meiotického zrání oocyty. Studie Liang *et al.* (2006) neprokázala přítomnost enzymu CBS v oocytech, ale pouze v somatických buňkách ovária. V rámci řešení této práce došlo k zjištění přítomnosti všech tří enzymů v oocytech v průběhu meiotického zrání, které potvrzuje již publikované výsledky laboratoře (Nevoral *et al.*, 2015).

V rámci řešení diplomové práce došlo k prokázání přítomnosti všech tří sulfan-uvolňujících enzymů v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu oocyty v různých stádiích zrání oocyty (nezralé GV oocyty a *in vitro* dozralé MII oocyty). Podle našich dostupných informací je tato diplomová práce první studií popisující distribuci sulfan-uvolňujících enzymů během meiotického zrání v buněčných organelách oocyty prasete. Objevení distribuce enzymů uvolňujících sulfan v mitochondriích oocyty je v souladu se studií Wang (2012), která tvrdí, že v závislosti na typu buňky a specifických stresových podmínkách, endogenní syntéza sulfanu může probíhat v cytosolu a/nebo v mitochondriích.

Mitochondrie jsou nejhojnějšími organelami v cytoplazmě oocyty (Motta *et al.*, 2000), které poskytují oocytům hlavní zdroj ATP potřebný zejména pro zrání oocyty (Wilding *et al.*, 2001). Kromě toho, mitochondrie hrají důležitou roli v různých fyziologických funkcích včetně motility, udržování buněčné homeostázy (Duchen, 2000) nebo v regulaci životaschopnosti buněk (Dumollard *et al.*, 2007). Během meiotického zrání dochází k přeorganizování mitochondrií v oocytech. Narušené přeorganizování mitochondrií narušuje meiotické zrání a vývojovou kompetenci oocyty (Krisher *et al.*, 2007). Konkrétně se prokázalo, že tvorba velkých shluků mitochondrií je spojena se zvýšenou produkcí ATP (Yu *et al.*, 2010). K seskupování mitochondrií kolem jádra dohází v době GVBD, poté se při vydělení prvního pólového tělíska dočasně rozptýlí a následně se opět seskupí v druhé metafázi (MII) (Van Blerkom and Bell, 1986). Mitochondriální disfunkce vedou k apoptóze buněk, sulfan podle studií (Hu *et al.*, 2009) potlačuje apoptózu zachováním mitochondriálních funkcí v nervových buňkách. Tuto protektivní funkci zastává sulfan i v oocytech. Inhibice

endogenní produkce sulfanu vede k apoptóze, naopak exogenní dodání donoru sulfanu vede k inhibici apoptózy potlačením proapoptotických kaskád oocyty (Krejčová *et al.* 2014).

Od ovulace až po fázi moruly je oocyt či embryo odkázáno pouze na mitochondriální zdroj ATP (Dumollard *et al.*, 2006). V prasečích oocytech byl popsán výrazný nárůst obsahu ATP během zrání oocyty, toto navýšení koreluje s vyšší úspěšností dozrání oocyty a vývojem embrya (Brevini *et al.*, 2005). Tyto poznatky naznačují, že činnost mitochondrií v oocyty je určujícím faktorem kvality oocytů. Jelikož byla prokázána produkce v sulfanu v této organelle, je pravděpodobné, že sulfan je pro zachování funkcí mitochondrií nepostradatelným.

Další organelou, kde byla pozorována přítomnost enzymů uvolňujících sulfan, je endoplazmatické retikulum (ER). Během zrání oocytů dochází k jeho reorganizaci a zvýšení schopnosti oocyty uvolňovat Ca^{2+} ze zásob endoplazmatického retikula (Mann *et al.*, 2010). Vápník také patří mezi faktory významně ovlivňující meiotické zrání oocyty. Vápenaté ionty ovlivňují znovuzahájené meiózy (Wassarmann, 1988) nebo také hrají roli v modifikaci cyklinů, které jsou nezbytně nutné pro buněčný cyklus (Homa, 1995). Funkčnost endoplazmatického retikula je nezbytná pro životaschopnost buněk. Narušení funkce endoplazmatického retikula vede k akumulaci vadně sbalených proteinů, což vede k vyvolání stresu endoplazmatického retikula, který může následně indukovat apoptózu buňky (Oyadomari *et al.*, 2002). Ying (2016) ve své studii tvrdí, že sulfan chrání buňky kardiovaskulární soustavy proti stresu endoplazmatického retikula. Jelikož byly enzymy uvolňující sulfan objeveny v endoplazmatickém retikulu oocyty, lze předpokládat, že sulfan bude mít obdobné protektivní funkce i v oocytech. 3-MPST může být zabudován na membráně endoplazmatického retikula a sulfhydratovat tak proteiny, které jsou v endoplazmatickém retikulu tvořeny. Může se jednat o proteiny spojené s oplozením a časný embryonálním vývojem, protože se vysoké hodnoty kolokalizačních koeficientů vyskytují v oocyty až v MII fázi meiotického zrání oocyty.

Imunocytochemickou metodou lokalizace proteinů a analýzou obrazu bylo prokázáno, že během meiotického zrání v mitochondriích docházelo ke statisticky významným změnám distribuce enzymu 3-MPST a CBS. Hodnoty kolokalizačních koeficientů enzymu 3-MPST v mitochondriích během zrání vzrostly, u enzymu CBS klesly. Naopak u enzymu CTH nedocházelo během meiotického zrání v mitochondriích k statisticky významným změnám v distribuci. Při analýze hladin enzymů v endoplazmatickém retikulu během meiotického zrání se zjistilo, že dochází k statisticky významným změnám distribuce všech tří enzymů

uvolňující sulfan. Hodnoty kolokalizačních koeficientů enzymů CBS a 3-MPST v endoplazmatickém retikulu během meiotického zrání vzrostly a naopak hodnoty pro CTH klesly.

Přítomnost sulfan-uvolňujících enzymů v oocytu a jeho organelách naznačuje, že sulfan hraje důležitou roli v meiotickém zrání. Rozdíl hodnot intenzity signálů enzymu 3-MPST mezi GV a MII fází byl vysoký, je tedy pravděpodobné, že enzym 3-MPST hraje důležitou roli v meiotické kompetenci oocytů. Stejně tak je pravděpodobné, že jednotlivé enzymy uvolňující sulfan se navzájem zastupují ve své funkci a dokáží tak vykompenzovat sníženou aktivitu jednoho či dvou z nich. Toto tvrzení bylo podloženo studií Nevorala *et al.* (2015), kde byly testovány různé kombinace inhibitorů enzymů uvolňující sulfan v oocytech. Pouze kombinace inhibitorů všech tří enzymů uvolňujících sulfan současně měla efekt na množství produkovaného sulfanu, na průběh meiotického zrání a kumulární expanzi buněk oocytu.

7 Závěr

V rámci řešení předkládané diplomové práce byla potvrzena hypotéza, že enzymy odpovědné za endogenní produkci gasotransmiteru sulfanu, CBS, CTH, 3-MPST, jsou přítomné v prasečích oocytech. Současně bylo potvrzeno, že jejich přítomnost v buněčných organelách se mění v závislosti na stádiu meiotického zrání. V mitochondriích docházelo k statisticky významným změnám distribuce enzymů 3-MPST a CBS. Hodnoty kolokalizačních koeficientů enzymu 3-MPST vzrůstaly, naopak tyto hodnoty u enzymu CBS klesaly. V endoplazmatickém retikulu docházelo k statisticky významným změnám distribuce všech tří sulfan-uvolňujících enzymů. Hodnoty kolokalizačních koeficientů enzymů CBS a 3-MPST vzrostly, naopak hodnoty těchto koeficientů enzymu CTH klesly. Tyto poznatky jsou důležité pro objasnění role gasotransmiteru sulfanu v reprodukčních procesech. Nicméně pro dokonalou znalost funkcí a mechanismů zapojení sulfanu do regulačních procesů vzniku oplození schopných oocytů je potřeba dalších výzkumů.

Podrobná znalost významu sulfanu a dalších gasotransmiterů v regulaci reprodukčních procesů by mohla vést ke zvýšení úspěšnosti biotechnologických metod v reprodukci zvířat i v asistované reprodukci lidí. Zejména pro meiotické zrání v podmínkách *in vitro* nabízí další studium gasotransmiterů a jejich mechanismu účinku důležitý nástroj pro přesnější simulaci podmínek *in vivo*. V dalších studiích by bylo vhodné věnovat se molekulárním mechanismům účinku sulfanu a objasnění jeho vlivu na časný embryonální vývoj.

8 Seznam literatury

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero. Ústí nad Labem. str. 630. ISBN 80-902906-2-0.

Amleh, A., Dean, J. 2002. Mouse genitics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. *Human Reproduction*. 8. 395–403.

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.

Belardinelli, M. C., Chabli, A., Chadeaux-Vekemans, B., Kamoun, P. 2001. Urinary sulfur compounds in Down syndrome. *Clinical Chemistry*. 47. 1500–1501.

Bornslaeger, E. A., Schultz, R. M. 1985. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biology of Reproduction*. 33. 698–704.

Brevini, T. A., Vassena, R., Francisci, C., Gandolfi, F. 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 72. 1218–1223.

Burnett, W. W., King, E. G., Grace, M., Hall, W. E. 1977. Hydrogen sulfide poisoning: review of 5 years' experience. *Canadian Medical Association Journal*. 117. 1277-1180.

Cortvrindt, R., Smitz, J., VanSteirteghem, A. C. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reproduction*. 12. 759–768.

Crews, C. M., Erikson, R. L. 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/ threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 89. 8205–8209.

- Dedieu, T., Gall, L., Crozet, N., Sevellec, C., Ruffini, S. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction Development*. 45. 351–358.
- Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., Beers, W. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*. 86. 356–362.
- Doeller, J. E., Isbell, T. S., Benavides, G., Koenitzer, J., Patel, H., Patel, R. P., Lancaster, J. R. Jr. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical Biochemistry*. 341. 40–51.
- Doležal, R. 2003. Vybrané kapitoly z veterinární gynekologie a porodnictví pro výuku porodnictví. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice. str. 117.
- Duckworth, B. C., Weaver, J. S., Ruderman, J. V. 2002. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of science*. 99. 16794–16799.
- Duchen, M. 2000. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *Journal of Physiology*. 529. 57–68.
- Dumollard, R., Duchen, M., Sardet, C. 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 17. 314–323.
- Dumollard, R., Duchen, M., Carroll, J. 2007. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*. 77. 21–49.
- Eppig, J. J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 281. 483–484.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproductions*. 122 (6). 829-38.

- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F. L. 2001. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (5). 2890–2894.
- Fan, H. Y., Li, M. Y., Tong, Ch., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schaten, 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. 480–487.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of reproduction*. 70. 535–547.
- Fortune, J. E., Eppig, J. J. 1979. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. *Endocrinology*. 105. 760–768.
- Furchgott, R. F., Zawadski, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 228. 373–376.
- 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. 255–259.
- Gebauer, F., Richter, J. D. 1996. Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *BioEssays*. 19. 23–28.
- Geer, J. J., Reiffenstein, R., Almeida, A. F., Carter, J. E. 1995. Sulfide-induced perturbations of the neuronal mechanisms controlling breathing in rats. *Journal of Applied Physiology*. 78 (2). 433–40.
- Gerhart, J., Wu, M., Kirschner, M. 1984. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *Journal of Cell Biology*. 98. 1247-1255.

- Guzman, M. A., Navarro, M. A., Carnicer, R., Sarría, A. J., Acín, 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. 3168–3176.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., Pines, J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology*. 9. 680-689.
- Handel, M. A., Eppig, J. J. 1997. Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis. In Handel, M. A. (ed.). *Meiosis and Gametogenesis*. Academic Press. s. Orlando. p. 333–358. ISBN: 978-0-12-153137-9
- Harrouk, W., Clarke, H. J. 1995. Mitogen-activated protein (*MAP*) kinase during the acquisition of meiotic competence by growing oocytes of the mouse. *Molecular Reproduction and Development*. 41. 29-36.
- 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. 2557–2560.
- Homa S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 40. 122-34.
- Hu, L. F., Lu, M., Wu, Z. Y., Wong, P. T., Bian, J. S. 2009. Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. *Molecular Pharmacology*. 75. 27–34.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*. (5). 122-130.
- Hurk, R., Zhao, J. 2004, Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005 (63). 1717–1751.

- Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 34. 87–93.
- Chen, X., Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine- synthase *via* the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*. 279. 52082–52086.
- 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 physiology- heart and circulatory physiology*. 287. 2316–2323.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Kott, T., Lanská, V., Tůmová, L., Tichovská, H., Ješet, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science*. 54. 137–149.
- Cho, W. K., Stern, S., Bigger, J. D. 1974. Inhibitory effects of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 187. 383–386.
- Christmann, L., Jung, T., Moor, R. M. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 38. 85-90.
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995 Activation of mitogenactivated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265–271.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460–468.
- Jeřeta, M., Čtvrtlíková Knitlová, D., Hanzalová, K., Hulinská, P., Hanuláková, S., Milakovic, I., Němcová, L., Kanka, J., Machátková, M. 2014. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (3). 469-75.

- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122. 303–315.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 10 (1). 1-5.
- Josefsberg, L. B., Galiani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 68. 1282–1290.
- Kabil, O., Banerjee, R. 2010. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *Journal of Biological Chemistry*. 285. 21903–21907,
- Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furukawa, T., Daen, F. P., Naito, K., Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 105. 325–330.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Kaneko, H., Tojo, H. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Clon Stem Cell*. 4. 211–222.
- Kim, N. H., Menino, A. R. 1995. Effects of stimulators of protein kinase A and C and modulators of phosphorylation of plasminogen activator activity in porcine oocyte–cumulus cell complexes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction Development*. 40. 364–370.
- Kishimoto, T. 1988. Regulation of Metaphase by a Maturation- Promoting Factor. *Development, Growth & Differentiation*. 30 (2). 105-115.

Kočárek, E., Pánek, M., Novotná, D. 2010. Klinická cytogenetika I, úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. Karolinum. Praha. str. 134. ISBN 978-80-246-1880-7.

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

Krejčová, T., Šmelcová, M., Petr., Bodart, J. F., Sedmíková, M., Nevorál, J., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Kučerová-Chrpová, V., Chmelíková, E., Tůmová, L., Jilek, F. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLOS ONE*.10(1).

Krisher, R. L., Brad, A. M., Herrick, J. R., Sparman, M. L., Swain, J. E. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproducton Science*. 98. 72–96.

Kubelka, M., Motlik, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*. 62. 292–302.

Kudláč, E., Elečko, J., Anon., 1987. Veterinární porodnictví a gynekologie. SZN. Praha. str. 576.

Lavu, M., Bhushan, S., Lefer, D. J. 2011. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*. 120. 219–229.

Li, L., Hsu, A., Moore, P. K. 2009. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation a tale of three gases! *Pharmacology and Therapeutics*. 123. 386–400.

Li, C. S., Guo, Z., Guo, B. R., Xie, Y. J., 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, R., Yu, W., Du, J., Yang, L., Shang, M., Guo, J. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119. 1877–1883.
- 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. 89–96.
- Linden, D. R.; Levitt, M. D.; Farrugia, G.; Szurszewski, J. H. 2010. Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract: still in search of a physiologic function. *Antioxidants and redox signaling*. 12. 1135-1146.
- Lowicka, E., Betowski, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*. 59. 4-14.
- Lu, Q., Smith, G. D., Chen, D. Y., Yang, Z., Han, Z. M., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2001. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 64. 1444–1450.
- Mann, J. S., Lowther, K. M., Mehlmann, L. M. 2010. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanisms during meiotic maturation of human oocytes. *Biology of reproduction*. 83. 578–583.
- Maron, B. A., Loscalzo, J. 2009. The treatment of hyperhomocysteinemia. *Annual Review of Medicine*. 60. 39–54.
- Mehlmann, L. M., Jones, T. L., Jaffe, L. A. 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*. 297.1343–1345.

- Mehlmann, L. M., Saeki, Y., Tanaka, S., Brennan, T. J., Evsikov, A. V., Pendola, F. L., Knowles, B. B., Eppig, J. J., Jaffe, L. A. 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*. 306. 1947–1950.
- Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Society for Reproduction*. 130 (6). 791-9.
- Milakovic, I., Jeseta, M., Hanulakova, S., Knitlova, D., Hanzalova, K., Hulinska, P., Machal, L., Kempisty, B., Antosik, P., Machatkova, M. 2015. Energy status characteristics of porcine oocytes during *in vitro* maturation is influenced by their meiotic competence. *Reproduction in Domestic Animals*. 50 (5). 812-9.
- Motlik, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 198. 155-162.
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., Heyn, R. 2000. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human Reproduction*. 15. 129–47.
- Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339. 275-280.
- Murray, A. W., Solomon, M. J., Kirschner, M. W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*. 339. 280-286.
- 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. 1–8.
- Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J. F., Kučerová-Chrpová, V., Sedmíková, M., Křivohlávková, L., Žalmanová, T., Jílek, F. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS ONE*. 9 (7).

Nevoral, J., Žalmanová, T., Zámostná, K., Kott, T., Kučerová-Chrpová, V., Bodart, J.- F., Gelaude, A., Procházka, R., Orsák, M., Šulc, M., Klein, P., Dvořáková, M., Weingartová, I., Víghová, A., Hošková, K., Krejčová, T., Jílek, F., Petr, J. 2015. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*. 51. 24-35

Olson, K. R. 2011. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *American Journal of Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 301. 297–312.

Oyadomari, S., Araki, E., Mori, M. 2002 *Apoptosis*. 7. 335–345.

Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulfide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7. 1–9.

Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., XU, B., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) Kinase pathways: regulation and physiological functions. *The Endocrine Society Endocrine Reviews*. 22(2). 153–183.

Peng, X. R., Hsueh, A. J., LaPolt, P. S., Bjersing, L., Ny, T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 1991. 129. 3200–7.

Petrova, I., Sedmikova, M., Chmelikova, E., Svestkova, D., Rajmon, R. 2004. In vitro ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49. 93–98.

Picard, A., Labbe, J. C., Peaucellier, G., LeBouffant, F., LePeuch, C., Doree, M. 1987. Changes in the activity of the maturation-promoting factor are correlated with those of a major cyclic AMP and calciumindependent protein kinase during the first mitotic cell cycles in the early starfish embryo. *Development, Growth & Differentiation*. 29. 93-103.

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogensulphide. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. 13. 109-134.

Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F. 1988. *Obecná biologie 2*. SPN. Praha. str. 695.

Sela-Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*. 78(6). 1111-1118.

Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 262 – 268.

Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasa-Wara, Y., Togaqa, 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.

Schultz, R. M., Montgomery, R. R., Belanoff, J. R. 1983. Regulation of mouse oocyte maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*. 97. 264–273.

Schultz, R. M., Wassarman, P. M. 1977. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Journal of Cell Science*. 24. 167-194.

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 Nutritional*. 106. 1272–1278.

Sorensen, R. A., Wassarman, P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50. 531-536.

- Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. FIGa, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 127. 4645–4654.
- 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, G. P., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6. 1875–1884.
- Starka, L. 2009. Hydrogen sulfide – another gaseous hormone? *Chemické Listy*. 103. 28–31.
- Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335–342.
- 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.
- Sun, Q. Y., Breitbart, H., Schatten, H. 1999a. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 11. 443–450.
- Sun, Q. Y., Lu, Q., Breitbart, H., Chen, D. Y. 1999b. cAMP inhibits MAP kinase activation and reinitiation of meiosis, but exerts no effects after germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reproduction, Fertility & Development*. 11. 81–86.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (5). 347–359.
- Šmelcová, M., Tichovská, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: A REVIEW. *Scientia agriculturae bohémica*. 42 (4). 188–198.

- Tachibana, K., Yanagishima, N., Kishimoto, T. 1987. Preliminary characterization of maturationpromoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*. 88. 273-281.
- Tang, G., Wu, L., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37. 753–763.
- Tornell, J., Brannstorm, M., Hillensjo, T. 1984. Different effects of cyclic-nucleotide derivates upon the rat oocyte–cumulus complex *in vitro*. *Acta Physiologica Scandinavica* 122. 507–513.
- Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J., Xie, H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222. 93–103.
- Tunjung, W. A., Yokoo, M., Hoshino, Y., Miyake, Y., Kadowaki, A., Sato, E. 2009. Effect of hyaluronan to inhibit caspase activation in porcine granulosa, *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 382. 160-164.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development*. 17. 683– 710.
- Vacík, J., Barthová, J., Pacák, J., Strauch, B., Svobodová, M., Zemánek, F. 1999. Přehled středoškolské chemie. SPN. Pedagogické nakladatelství. Praha. str. 368. ISBN 80-7235-108-7
- Van Blerkom, J., Bell, H. 1986. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. 93. 213-38.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.

- Verlhac, M. H., Pennart, H. D., Maro, B., Cobb, M. H., Clarke, H. J. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. 158. 330–340.
- Wallace, J. L., Dickey, M., McKnight, W., Martin, G. R. 2007. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *the FASEB journal*. 21. 4070–4076.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. 16. 1792-1798.
- Warencia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D., and Dieken, F. P. 1989. Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology*. 38. 973–981.
- Wassarman P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil E., Neil J. *The physiology of reproduction*. New York. Raven Press. p. 69 –102.
- Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*. 143. 162-172.
- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and pre-implantation embryos. *Human Reproduction*. 16. 909–17.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization., In Knobil, E., Neil, J., Chalis j. R. G., Kretser, D. M., Pfaff, D. W., Richards, J. S., Plant, T. M, Wassarman, P. M. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. 1988. Raven Pres. New York. p. 135 – 185.
- Yang, G. D., Wang, R. 2007. H₂S and cellular proliferation and apoptosis. *Sheng Li Xue Bao*. 59 (2). 133–140.

Yang, G., Sun, X., Wang, R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *the FASEB Journal*. 18 (2). 1782– 1784.

Yi, Y. J., Sutovsky, M., Song, W. H., Sutovsky, P. 2014. Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyospermy defense and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*. 10.

Ying, R., Wang, X. Q., Yang, Y., Gu, Z. J., Qiu, Q., Chen, Y. X., Wang, J. F. 2016. Hydrogen sulfide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced endothelial-to-mesenchymal transition through Src pathway. *Life Sciences*. 144. 208-217.

Yokko, M., Shimizu, T., Kimura, N., Tunjung, W. A., Matsumoto, H., Abe, H., Sasada, H., Rodriguez-Martinez, H., Sato, E. 2007. Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *Journal of. Reproduction and Development*. 53. 263-70.

Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F. A. Swann, K. 2010. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of. Cell. Physiology*. 224. 672–680.

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