

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH
ZDROJŮ

Katedra veterinárních disciplín

*Vliv sulfanu na průběh meiotického zrání a partenogenetickou aktivaci
prasečích oocytů v podmínkách kultivace in vitro*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Autor práce: Václav Růčka

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že diplomovou práci s názvem „Vliv sulfanu na průběh meiotického zrání a partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů v podmínkách kultivace in vitro“ jsem vypracoval samostatně a použil pouze pramenů, které cituji v příložené bibliografii.

V Praze dne 11. 4. 2012

Václav Růčka

Poděkování

Děkuji prof. Markétě Sedmíkové a Honzovi Nevoralovi za profesionální přístup a přátelské jednání při zpracování a realizaci diplomové práce.

Souhrn

Reprodukční biotechnologie v současné době zažívají rychlý rozvoj. Pro biotechnologické účely je limitující dostatečný počet kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách do metafáze 2. meiotického dělení.

Proces meiotického zrání oocytu reguluje řada faktorů, z nichž je funkce některých dobře prostudována, například *M-phase/maturation promoting factor* (MPF). V nedávné době bylo zjištěno, že možnou úlohu v regulaci meiotického zrání a časného embryonálního vývoje zastávají některé plynné molekuly, tzv. gasotransmitery. Vedle oxidu dusnatého (NO) a oxidu uhelnatého (CO) je v současné době intenzivně studován sulfan (H_2S). Na základě studia H_2S v somatických buňkách lze předpokládat důležitou regulační úlohu také v procesu meiotického zrání oocytů a časné embryogenezi.

Cílem práce bylo lokalizovat enzymy uvolňující H_2S , cystathionin β -syntázu (CBS), cystathionin γ -lyázu (CSE) a 3-mercaptopyruvát-sulfotransferázu (MPST), v prasečích oocytech během *in vitro* zrání a objasnit vliv donoru sulfanu Na_2S na průběh prodloužené kultivace a vývojovou kompetenci oocytů prasat.

Oocyty byly kultivovány v *in vitro* podmínkách 24 a 48 hod. V oocytech ve stádiu zárodečného vajíčku a ve zrajících oocytech byla měřena intenzita signálu enzymů CBS, CSE a MPST. Oocyty po dosažení metafáze 2. meiotického dělení byly dále kultivovány 24 hod. s donorem sulfanu Na_2S a následně partenogeneticky aktivovány kalcium-ionoforem a 6-dimethylaimopurinem. Byl hodnocen podíl aktivovaných oocytů a časný embryonální vývoj.

Byla prokázána přítomnost CBS, CSE a MPST v oocytu GV a po 24 a 48 hod. kultivace *in vitro*. Distribuce enzymů CSE a MPST v oocytu se během meiotického zrání měnila, zejména v korové oblasti oocytu. Intenzita signálu CBS byla během zrání neměnná.

Po prodloužené kultivaci oocytů s donorem sulfanu Na_2S nebyl prokázán pozitivní vliv H_2S na poměr partenogeneticky aktivovaných prasečích oocytů. Donor H_2S zlepšoval vývojovou kompetenci a podíl partenogenetických embryí, které dosáhly stádia blastocysty.

Pro úplné pochopení signální dráhy H_2S v oocytech bude zapotřebí dalšího studia enzymů endogenně uvolňujících H_2S .

Summary

Currently, reproductive biotechnologies are rapidly developing disciplines. A rich source of high-quality oocytes matured *in vitro* to metaphase 2 is essential for biotechniques.

During *in vitro* meiotic maturation, the oocytes resume meiosis under regulation of some factors, as M-phase/maturation promoting factor (MPF). Potential roles in cell signaling of maturing oocytes and developmental embryos hold molecules of gasotransmitters. The gasotransmitters are small gaseous molecules produced in cell metabolism. The gasotransmitters include nitric oxide (NO), carbon monoxide (CO) and extensively researched hydrogen sulphide (H₂S). Based on study of H₂S in somatic cells, we can assume its important regulatory role in meiotic maturation and early embryogenesis.

The aim of this study was to localize H₂S-releasing enzymes (cystathionin β-synthase CBS, cystathionin γ-lyase CSE and 3-mercaptopyruvate-sulfotransferase MPST) in porcine oocytes during *in vitro* meiotic maturation by analysis of images. The next aim was to determine the influence of H₂S-donor Na₂S on developmental competence of porcine oocytes.

The oocytes were cultured for 24 and 48 hours under *in vitro* conditions. There was measured intensity of CBS/CSE/MPST-signal in GV-oocytes and oocytes matured 24 or 48 hours. The oocytes matured to metaphase 2 were prolonged cultivated 24 hours with H₂S-donor Na₂S. Subsequently, the oocytes were activated by calcium-ionophore and 6-dimethyl aminopurine. There was evaluated a part of activated oocyte. Together, stages of early embryonic development were detected.

There was demonstrated a presence of CBS/CSE/MPST-signal in porcine GV-oocytes, 24 and 48 matured oocytes. Distribution of enzymes-signal in oocytes was varied by phase of maturation. The highest difference of CSE and MPST during *in vitro* maturation were detected in range of cortex and cytoplasmic membrane of oocytes. There were no differences of intensity of CBS-signal during meiotic maturation.

After prolonged cultivation and activation of oocytes, there was not shown a positive effect of H₂S-donor Na₂S on partenogenetic activation ability. Nevertheless, H₂S-donor increased the part of blastocysts after partenogenetic activation of porcine oocytes after 7 days culture.

For understanding the role of H₂S-signaling in porcine oocytes is necessary to investigate H₂S-releasing enzymes too. Presumably, an interaction of H₂S and other gasotransmitters can improve quality of oocytes used for biotechnologies.

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární rešerše	9
2.1 Oogeneze	9
2.1.1 Vývoj embryonálních vaječníků a primordiálních zárodečných buněk	9
2.1.2 Fáze množení	9
2.1.3 Fáze růstu	10
Fáze růstu - folikulogeneze	12
2.1.4 Fáze zrání	14
2.2 Prodloužená kultivace a stárnutí oocytů	23
2.3 Gasotransmitery	25
2.3.1 Oxid dusnatý	26
2.3.2 Oxid uhelnatý	27
2.3.3 Sulfan	27
3. Materiál a metodika	33
3.1 Materiál	33
3.2 Metodika	35
3.3 Schéma experimentu	39
4. Hypotézy a cíle práce	40
5. Výsledky	41
5.1 Distribuce enzymů CBS, CSE a MPST během meiotického zrání prasečích oocytů.....	41
5.2 Vliv donoru H ₂ S na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů	48
5. Diskuze	52
6. Závěr	55
7. Použitá literatura	56

1. Úvod

V současné době dochází k rozmachu reprodukčních biotechnologií u hospodářských zvířat. Reprodukční biotechnologie našly uplatnění ve zvyšování zemědělské produkce, managementu reprodukce hospodářských zvířat a veterinární medicíně. Získané poznatky tak nachází uplatnění také v humánní medicíně a tzv. asistované reprodukci člověka.

Pro studium buněčného cyklu, meiotického zrání a vývoje biotechnologických postupů se často využívají oocyty hospodářských zvířat. Mezi nimi zastupuje významnou úlohu prase. Pro řadu podobností s lidským organizmem lze poznatky z výzkumu prasečích oocytů aplikovat s vysokou úspěšností také v biomedicíně, studiu příčiny a léčby rakoviny či dokonce možnosti xenotransplantací. Výzkum na prasečích oocytech přináší řadu výhod, které lze přičíst velikosti oocytů, možnosti *in vitro* zrání i snadnosti získání. I přesto se současné reprodukční biotechnologie prasat potýkají s nedostatečným množstvím kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách, které by byly použitelné pro další biotechnologické postupy.

Prasečí oocyty se získávají z vaječníků poražených prasniček. Oocyty posléze musí podstoupit *in vitro* zrání do stádia metafáze 2. meiotického dělení. Na regulaci meiotického zrání se podílí gonadotropiny a následně celá řada faktorů, jako například cAMP, MAPK nebo MPF. V současné době se předpokládá také regulační úloha některých plyných molekul, tzv. gasotransmiterů. Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S).

Sulfan je obecně znám jako škodlivý plyn, způsobující ve větších koncentracích smrtelné otravy organismu. V poslední době se nashromáždilo mnoho důkazů o H₂S jako mediátoru fyziologických a patofyziologických dějů v různých živočišných tkáních. Úloha H₂S byla dříve prokázána především v kardiovaskulárním systému, centrální nervové a dýchací soustavě. K účinkům H₂S patří také schopnost potlačovat apoptózu buněk a zánětlivé procesy tkání. Mechanismus regulace těchto dějů ještě není zcela objasněn. Řada prací popisuje účinek H₂S jako přímého aktivátora K_{ATP} kanálů. Dále je schopný regulovat aktivitu PKC a tím ovlivňovat intracelulární Ca²⁺ a regulovat mnoho dalších signálních drah, včetně ostatních gasotransmiterů. Právě H₂S je, na základě poznatků zjištěných na somatických buňkách, přisuzována důležitá role v regulaci meiotického zrání a protektivním účinku na časný embryonální vývoj aktivovaných oocytů.

Jako v případě NO a CO, je také uvolňování endogenního H₂S řízeno enzymaticky. V uvolňování fyziologických koncentrací v buňkách se tak uplatňuje cystathionin β-syntáza

(CBS), cystathionin γ -lyáza (CSE) a 3-mercaptopyruvát-sulfotransferáza (MPST), jejichž substrátem pro tvorbu jsou aminokyseliny L-cystein, homocystein a cystathion. Studium účinku H_2S v meioticky zrajících prasečích oocytech proto spočívá také v detekci, lokalizaci a distribuci jmenovaných enzymů během *in vitro* zrání oocytů. Pro objasnění ochranného účinku H_2S na časnou embryogenezi pak lze využít donorů H_2S , jako je Na_2S nebo NaHS.

Poznatky o vlivu H_2S na meiotické zrání a využití jeho donorů ve zlepšování kvality *in vitro* dozrálých oocytů jsou velmi omezené. Pro úplné objasnění regulační úlohy H_2S a možného využití v reprodukčních biotechnologiích bude zapotřebí rozsáhlých experimentů.

2. Literární rešerše

2.1 Oogeneze

2.1.1 Vývoj embryonálních vaječníků a primordiálních zárodečných buněk

Pohlavní žlázy (*gonades*) mají základ v mezotelu (*epithelium coelomicum*), vystylajícího zadní stěnu břišní dutiny, v mezenchymu (*mesenchyma*), druhé vrstvě břišní stěny, a v primordiálních zárodečných buňkách (*cellulae germinales primordiales*), endodermových elementech stěny žloutkového váčku (Sládeček, 1986). Vývoj vaječníků je komplexní proces, který začíná v průběhu embryogeneze, pokračuje vývojem a růstem po dosažení puberty. Vaječnky se postupně stávají orgánem zodpovědným za tvorbu steroidních hormonů, vývoj a ovulaci oocytů. Tyto funkce přetrvávají po celou dobu reprodukčního života až do klimakteria (Vanderhyden, 2002).

Vytvoření embryonálního vaječniku a pohlavních buněk v prenatalním období je výsledkem tří po sobě následujících procesů: 1) specifikací primordiálních zárodečných buněk (PGCs – *primordial germ cells*); 2) migrací a množením PGCs; a 3) kolonizací urogenitálních lišt PGCs a vznikem primordiálních folikulů (Vanderhyden, 2002; Wassarman, 1988).

2.1.2 Fáze množení

Oocyty pocházejí z malého počtu kmenových buněk, PGCs, které mají mimogonadální původ. Tyto zárodečné buňky migrují nejprve pasivním pohybem do endodermálního epitelu kaudálního prvostřeva, posléze améboidním pohybem podél dorzálního mezenteria genitálních lišt. Pohyb se děje patrně na základě chemotaxe (Yanagimachi, 1988).

Po kolonizaci genitálních lišt PGCs se tyto buňky dále mitoticky dělí. Tyto buňky již označujeme jako oogonie. Výsledkem kontinuální mitotické aktivity je zvýšení počtu zárodečných buněk. U myši z asi 5 000 ve 12-ti denním embryu na více než 20 000 ve 14-ti denním embryu (Wassarman, 1988); u prasat se počet zvyšuje z 5 000 ve 20 dnech embryogeneze na více než 1 milion v 50-ti dnech embryonálního vývoje, kdy je dosaženo konečného počtu. Dále mitotická aktivita ustává a značná část těchto buněk podléhá zániku, ustávající až 7 dní po porodu (Hunter, 2000).

V minulosti přetrvávalo dogma o neměnném počtu mitoticky vzniklých oogonií, resp. o jeho kontinuálním snižování počínající již v prenatalní fázi ontogeneze samice (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1988). V nedávné době došlo ke zjištění, že v ováriích nedospělých i dospělých myší jsou přítomny mitoticky aktivní zárodečné kmenové buňky, které následně nahrazují chybějící folikuly, v případě jejich ztráty ovulací nebo atrezií (Johnson *et al.*, 2004).

Mitoticky se dělicí oogonie se současně začínají obklopotovat somatickými buňkami. Somatické buňky tvoří základ granulózy budoucího folikulu a stávají se tak pro oogonie nezbytnými v procesu následujícího meiotického dělení (Wassarman, 1988; Hunter, 2000; Vanderhyden, 2002).

Ještě za prenatalního života samice mitoticky vzniklé oogonie zahajují meiotické dělení a vstupují do profáze I, čímž se stávají oocyty I. řádu (Wassarman, 1988). U prasat dochází k meióze oogonií již 40. den embryonálního vývoje (Hunter, 2000). Přeměna oogonií v oocyty I. řádu je u prasat ukončena až 35. den po narození. Meiotické dělení je ve stádiu diplotene profáze I zastaveno a pokračuje až po dosažení puberty (Wassarman, 1988). Stádium se označuje jako diplotenní, též diktyotenní, blok (Hunter, 2000). Počet těchto oocytů činí více než 200 000 (Prather *et al.*, 1998).

2.1.3 Fáze růstu

Fázi růstu podléhají oocyty I. řádu, jež započaly 1. meiotické dělení, které bylo zastaveno v diplotene profáze I. Během této fáze oogeneze jsou oocyty metabolicky vysoce aktivní a dochází v nich k významným kvantitativním a kvalitativním změnám. Zvětšuje se objem cytoplazmy, zvyšuje se počet organel a oocyt získává tzv. meiotickou kompetenci, díky které je schopen znovuzahájit a dokončit meiotické dělení, resp. úspěšně prodělat fázi zrání (Wassarman, 1988).

Během reprodukčního života obsahují savčí vaječníky směs nerostoucích a rostoucích oocytů, zablokovaných v diktyotenním stádiu profáze I. Meiózu jsou schopny dokončit jen oocyty s ukončeným růstem a plně meioticky kompetentní. Zrání oocytů s ukončeným růstem indukuje v podmínkách *in vivo* hypofýza prostřednictvím gonadotropních hormonů (Wassarman, 1988).

Přestože nedochází během růstové fáze oocytu k meiotickému dělení, dochází také ke změnám chromatinu. Během růstu se zvětšuje jádro, které nabývá podoby tzv. zárodečného váčku (GV - *germinal vesicle*); (Wassarman, 1988; Eppig, 1993). Během zvětšování jádra

zůstává chromatin rozptýlený a je transkripčně aktivní. Jádro rostoucího oocyty zahrnuje i jadérko, které se během této fáze také zvětšuje; s rostoucím jadérkem vzrůstá také množství syntetizované rRNA (Wassarman, 1988).

Pro proteosyntézu je nezbytná syntéza a akumulace RNA v době růstu oocyty. Z celkového počtu je přibližně 10 – 15 % mRNA, 20 – 25 % tRNA a 60 – 65 % rRNA. Část vzniklé mRNA je použita jako matrice při translaci do proteinů potřebných pro zrání oocyty, část je přeložena do proteinu teprve po oplození dny až týdny po její syntéze (Wassarman, 1988).

Mezi proteiny intenzivně syntetizované během růstu patří proteiny *zony pellucidy* (až 10 % v myších oocytech), tubulin (1,5 - 2 %), aktin (1 %), kalmodulin (0,3 %), dále enzymy laktátdehydrogenáza (2 - 5 %), kreatinkináza (1,4 %) a glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (Wassarman, 1988). S enormním nárůstem proteinů se v oocyty hromadí a skladuje mnoho rozptýlených membránových vezikul, glykogenových granul, lipoproteinových a multivezikulárních kapének (Hurk *et* Zhao, 2005). Syntéza některých molekul patrně probíhá v jiných buňkách, než je oocyt, který je přijímá prostřednictvím endocytózy a mezibuněčných spojů (Wassarman, 1988).

Pro proteosyntézu jsou nezbytné ribozomy. V důsledku rostoucí aktivity jádra a jadérka narůstá množství ribozómů v polyzómech i polyzómů samotných. Během růstové fáze oocyty se absolutní množství ribozómů zvyšuje, v důsledku rostoucího objemu cytoplazmy oocyty ale jejich koncentrace klesá. Na konci růstu oocyty mírně klesá také množství absolutní. Změny v populaci ribozómů během fáze růstu korespondují se změnami intenzity zmíněné proteosyntézy (Wassarman, 1988).

Mitochondrie během růstu oocyty výrazně zvyšují svůj počet a procházejí změnami tvaru, velikosti a ultrastruktury. Malé nebo nerostoucí oocyty obsahují prodloužené mitochondrie, naopak u plně dorostlých oocytů dochází ke hromadění mitochondrií kulatých a oválných (Wassarman, 1988).

Změnám podléhá rovněž Golgiho aparát (GA). Jeho membrána se stává v druhé polovině fáze růstu vysoce aktivní. GA vytváří kortikální granula a řídí syntézu a vylučování glykoproteinů *zony pellucidy*. Ke konci růstu se aktivita GA snižuje (Yanagimachi, 1988).

Kortikální granula jsou malé kulovité orgány, které se nacházejí pod cytoplazmatickou membránou oocyty. Jejich počet během růstu oocyty roste. Pro svůj enzymatický obsah se podobají lysozómům. Kortikální granula mají původ v GA, také

v endoplazmatickém retikulu a multivezikulárních těliscích. Populace kortikálních granul je heterogenní v původu enzymatického obsahu. To vypovídá o různém stupni zralosti anebo různých funkčních vlastnostech (Wassarman, 1988). Kortikální granula hrají důležitou úlohu během procesu oplození a po něm. Po uvolnění enzymatického obsahu granulí do perivitelinního prostoru dochází k proteinovým změnám *zony pellucidy* a prevenci polyspermie (Wassarman 1988; Wang *et al.*, 2007).

Zona pellucida je glykoproteinový obal obklopující oocyty savců. *Zona pellucida* se skládá ze tří typů glykoproteinů: ZP1, ZP2 a ZP3, k jejichž syntéze dochází až během fáze růstu. V průběhu růstu se *zona* stává silnější, její síťovina vzájemně propojených filament obklopuje oocyt, a tak ho značnou měrou odděluje od okolních folikulárních buněk. Na povrchu *zony pellucidy* se vyskytují receptory pro vazbu spermií, které sehrávají důležitou úlohu v akrozomální reakci. *Zona* se dále se podílí na sekundární blokaci polyspermie. (Wassarman, 1988; Hurk *et Zhao*, 2004).

Rychlost růstu oocyty přímo souvisí s počtem granulózních buněk v jeho okolí. Tyto granulózní buňky totiž zvětšují jeho povrch, a tak je umožněn efektivní a rychlý prostup, výše uvedených, molekul do oocyty, čímž je umožněn jeho růst a vývoj (Hunter, 2000). Granulózní buňky procházející skrz *zonu pellucidu* k cytoplazmatické membráně oocyty tvoří spojení typu *gap junction* (Hurk *et Zhao*, 2005). Spoje *gap junction* jsou tvořeny několika izoformami konexinů, jejichž zastoupení se u různých živočišných druhů liší (Albertiny *et Anderson*, 1974; Fair, 2003).

Interakce granulóza-oocyt pomocí spojení *gap junction* tak vytváří obousměrný tok molekul, který je nezbytný pro metabolismus oocyty (Eppig, 2001). Buněčné spoje *gap junction* jsou rovněž nezbytné pro mezibuněčnou signalizaci hormony, růstovými faktory a protein-kinázami (Hunter, 2000; Hurk *et Zhao*, 2005).

Fáze růstu - folikulogeneze

Proces oogeneze a především růst oocyty je zasazen do procesu tvorby a růstu folikulu, tzv. folikulogeneze. Folikulogeneze začíná stejně jako oogeneze již během prenatálního života samice (Hurk, 2005).

Oogonie vzniklé mitotickým dělením vstupují do 1. meiotického dělení, kde jsou označovány jako oocyty I. řádu. Oocyt I. řádu je obklopen jednou vrstvou 4 – 8 pregranulózních buněk a intaktní *laminou basalis*. Celý útvar je pak označován jako

primordiální folikul, který v tomto klidovém stavu setrvává až do pohlavní dospělosti samice (Wassarman, 1988).

Po dosažení pohlavní dospělosti samice vstupují pravidelně skupiny primordiálních folikulů do růstové fáze. Tím se jeho pregranulózní buňky začínají měnit na kubické granulózní, resp. folikulární, buňky a začínají se intenzivně mitoticky dělit. Takový folikul je označován jako primární folikul a podstupuje intenzivní fázi růstu (Wassarman, 1988).

Jakmile je oocyt obklopen dvěma a více vrstvami folikulárních buněk, hovoříme o tzv. sekundárním, též preantrálním, folikulu. V této fázi folikulogeneze podstupují oocyty nejrozsáhlejší růstové změny. V prostoru mezi oocytem a folikulárními buňkami se tvoří *zona pellucida* (Wassarman, 1988).

Granulózní buňky se nadále množí a kolem nich se rozvíjí vrstva *theky* z intersticiálních buněk stromatu (Eppig, 2001; Fair, 2003; Hurk *et* Zhao, 2005; Wassarman, 1988). Až do této fáze se zdá být vývoj folikulu nezávislý na gonadotropinech (Eppig, 2001; Hafez *et* Hafez, 2000). Později se v sekundárním folikulu začíná objevovat dutina (*antrum*), která se plní folikulární tekutinou. Signální dráhy, které iniciují tvorbu *antra*, nejsou plně objasněny.

Ve fázi raného antrálního folikulu je folikulogeneze již zcela závislá na gonadotropinech (Eppig, 2001; Hafez *et* Hafez, 2000). Na gonadotropinech závisí další buněčná proliferace tím schopnost dostatečné produkce estrogenů těmito buňkami. Dostačující produkce hormonů folikulem předurčuje přítomnost LH-receptorů nutných pro ovulaci a luteinizaci folikulu (Hafez *et* Hafez, 2000).

Antrální folikuly jsou označovány též jako terciální folikuly. V důsledku formování *antra* folikulu lze rozeznat dva typy granulózních buněk: kumulární buňky, které obklopují oocyt v místě tzv. vejconosného hrbolku *cumulus oophorus*, dále buňky murální granulózy, která je blíže stěny a *theky* folikulu. Dobře rozvinuté antrální folikuly jsou též označovány jako Graafovy folikuly (Eppig, 2001). Do fáze Graafova folikulu je v podmínkách *in vivo* zasazena konečná fáze růstu oocyty a znovuzahájení meiózy a následně fáze zrání oocyty. Zrání oocyty pokračuje až po prasknutí folikulu a ovulaci oocyty (Yanagimachi, 1988).

V růstové fázi se prasečí oocyty zvětší průměrně z 30 μm na 120 μm a růst oocyty je téměř dokončen (115 μm), když dosahuje folikul velikosti 1,8 mm (Motlík *et* Fulka, 1986). Z tohoto pohledu zahrnuje růst savčích oocytů dvě různé fáze. V první probíhá růst oocyty současně s folikulem, ve druhé fázi již zůstává velikost oocyty konstantní, ale folikul v růstu pokračuje (Hunter, 2000).

2.1.4 Fáze zrání

Fáze zrání oocyty začíná vstupem oogonie do meiotického dělení a přeměnou v oocyt I. řádu, který je zablokovan v profázi I. Oocyt v tomto stádiu vstupuje do fáze růstu a tak se tato fáze časově prolíná s fází zrání.

Většina oocytů I. řádu podléhá atrezii během reprodukčního života samice a jen malá část znovuzahajuje meiotické dělení. Oocyty I. řádu pokračují v meióze až těsně před ovulací pohlavně dospělých samic (Hunter, 2000; Wassarman, 1988). Uvolnění bloku a pokračování v meióze je podmíněno hormonálním stimulem. Prasečí oocyty *in vivo* dokončují 1. meiotické dělení asi 36 – 40 hodin po vzrůstu hladiny gonadotropinů v krevní plazmě (Wassarman, 1988; Hunter, 2000). Celkem trvá jaderné zrání u prasat 44 – 48 hod. hodin, u krávy a ovce cca 24 hodin a u koní 36 hodin (Hurk *et* Zhao, 2005).

Zrání oocytů spočívá ve změnách chromatinu, jaderném zrání, a změnách cytoplazmy, cytoplazmatickém zrání. Dostatečná kvalita jaderného i cytoplazmatického zrání předurčuje meiotickou kompetenci oocyty (Fulka *et al.*, 1998).

Fáze zrání - jaderné zrání

Meióza je proces, při kterém diploidní prekurzory gamet (spermií či vajíček) sníží svůj počet chromozomů na polovinu. Sestává ze dvou následných dělení. V prvním meiotickém dělení (meióza I, heterotypické dělení) se od sebe oddělují dvojice chromozomů. Bezprostředně po meióze I, tedy bez syntézy DNA (S fáze), nastává druhé meiotické dělení (meióza II, homeotypické dělení). Sledem meiózy I a II vznikají haploidní gamety (Eppig, 1993; Kishimoto, 2003; Mehlmann, 2005; Whitaker, 1996).

Profáze 1. meiotického dělení se člení na několik stádií: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Každá fáze je charakteristická různým uspořádáním chromozomů (Fair, 2003).

Všechny procesy, které jsou charakteristické pro meiózu, se objevují v průběhu meiózy I:

1. Během profáze I se na chromozomech objevují synapse (bivalenty) a chiazmata. Synapse je proces, kdy se k sobě podélně přikládají homologické chromozomy a vytváří tetrády. Díky této sestavě může probíhat tzv. crossing – over. Ten umožňuje genetickou rekombinaci, při které může být část maternální chromatidy zaměněna odpovídajícím fragmentem homologní paternální chromatidy. Chiazmata jsou místa, kde došlo ke crossing – overu.
2. V metafázi I se formuje metafázní destička, kde se řadí homologické páry.

3. V anafázi I se sesterské chromatidy neoddělují, ale zůstávají spojené a směřují ke stejnému buněčnému pólu. K jejich rozdělení dochází v meióze II, která se velmi podobá klasické mitóze (Campbell *et al.*, 2008; Alberts *et al.*, 2004).

Sun *et al.* (2004) klasifikovali na základě kondenzace chromatinu a změn na jaderné membráně GV prasečích oocytů do 5 tříd (GV0 – GV4). GV0 se vyznačuje zcela viditelným jádrem s jadernou membránou. Ve stádiu GV1 se kolem neporušeného jádra s membránou začíná formovat kondenzovaný chromatin do tvaru kruhu nebo podkovy. V GV2 stádiu se formuje chromatin do několika skupin také kolem jaderné membrány. V GV3 se chromatin kondenzuje do četných skupin a vláken po celé nukleoplazmě a ve stádiu GV4 již jádro a jaderná membrána nejsou patrné, zůstávají pouze skupiny a vlákna kondenzovaného chromatinu (Sun *et al.*, 2004).

Cytoplazmatické zrání

Kumulární buňky podporují zrání oocyta do metafáze II a výrazně posilují cytoplazmatické zrání, které je zodpovědné za schopnost podstoupit normální oplodnění a následný embryonální vývoj.

Gap junction komunikace mezi kumulárními buňkami a oocytem je důležitá pro regulaci cytoplazmatických faktorů, vedoucí k cytoplazmatickému zrání (Sun *et al.*, 2003). Kim *et al.* (1996) uvádí, že nedostatečné cytoplazmatické zrání narušuje funkci organel cytoplazmy oocyta řídící vznik prvojader a pólových tělísek oocyta, a tak může docházet k abnormálním vývojovým mechanismům a nižšímu výskytu embryonálního vývoje. Jednou z vlastností cytoplazmatického zrání u prasečích oocytů, je schopnost aktivovat některé regulační molekuly (Fan *et al.*, 2002).

Proces zrání oocyta je komplexní děj a vyvrcholením řady přípravných procesů, které vyústí vytvořením zralého oocyta v metafázi 2. meiotického dělení schopného oplození a časného embryonálního vývoje (Fulka *et al.*, 1998; Hyttel *et al.*, 1997).

Molekuly regulující meiotické zrání

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP)

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) vzniká z lineární molekuly ATP a v buňkách plní úlohu tzv. druhého posla. Přeměnu katalyzuje enzym adenylát-cykláza. Opačný efekt má fosfodiesteráza štěpící vazbu cAMP za vzniku AMP (Lodish et al., 2004).

Extracelulární signály působí na receptory spojené s G – proteiny, ty ovlivní aktivitu adenylát-cyklázy, která následně způsobí dramatický a náhlý vzrůst koncentrace cAMP. Naopak enzym cAMP – fosfodiesteráza rychle štěpí cAMP na normální AMP. Cyklický AMP je rozpustný ve vodě, může tak přenášet signál k proteinům cytosolu, jádru nebo k membráně. Účinkem cAMP je obvykle aktivace enzymu cAMP–dependentní proteinkinázy (PKA). PKA poté fosforyluje množství dalších proteinů (Campbell et Reece, 2008; Alberts et al., 1998).

Úroveň cAMP hraje zásadní roli v meiotickém zrání. Vysoká koncentrace cAMP v savčích oocytech zapříčiňuje blok meiózy, pravděpodobně prostřednictvím aktivní PKA. Zmizení mezibuněčných spojů po LH vlně aktivuje meiotické dělení tím, že již není do oocytu importován cAMP z granulózních buněk. Snížená koncentrace cAMP v oocytu tak pravděpodobně vede také k inaktivaci drah PKA. Tento model však nemusí úplně platit, protože inhibiční účinek cAMP můžou zajišťovat i jiné faktory a podpořit tak obnovení meiozy. U žab *Xenopus laevis* prostřednictvím progesteronu dochází ke snížení cAMP/PKA (Hurk et Zhao, 2005).

cAMP tvořící se v granulózních buňkách je udržován ve vysoké koncentraci v oocytu díky spojům *gap junction*, které zprostředkovávají jeho přenos. Tím je zajištěn meiotický blok oocytů v profázi I, který brání znovuzahájení meiózy (Heikinheimo et Gibbons, 1998).

M–phase/Maturation Promoting Factor (MPF)

Univerzální regulátor buněčného cyklu, mitózy i meiózy, u všech eukaryotických organismů je *M–phase/Maturation Promoting Factor* (MPF); (Kim et al., 1996; Madgwick et Jones, 2007; Stojkovic et al., 1999; Ye et al., 2003).

Důležitost MPF během meiotického zrání oocytů spočívá v jeho roli při kondenzaci chromozomů, GVBD, formaci dělicích vřetének, metafázích destiček a reorganizaci cytoskeletu, tj. uspořádání mikrofilament a reorganizaci sítě mediálních filament (Holzenspies et al., 2009; Hurk et Zhao, 2005; Stojkovic et al., 1999).

MPF je heterodimer, složený ze dvou podjednotek: z cyklinu B; regulační podjednotky a Cdc1 (p34^{Cdc2}), někdy označované jako Cdc2; katalytické podjednotky (Jones, 2004), který má klíčový význam při meiotickém zrání (Stojkovic *et al.*, 1999). V meioticky nekompetentních myších a prasečích oocytech je p34^{Cdc2} přítomna na velmi nízké úrovni, její koncentrace se zvýší náhle na konci růstu. Získání meiotické kompetence je spojeno se zvýšením koncentrace p34 na konci růstu oocyty, ale nezbytná je rovněž účinná aktivace této kinázy (Motlik *et al.*, 1997).

Cykliny nemají žádnou enzymovou aktivitu, ale jejich navázání na kinázy buněčného cyklu je nezbytné k enzymové aktivitě těchto kináz. Kinázy systému regulace buněčného cyklu se proto nazývají cyklin – dependentní proteinkinázy, neboli Cdc. Koncentrace cyklinů se v průběhu buněčného cyklu cyklicky mění, na rozdíl od Cdc, jejichž koncentrace zůstává konstantní (Alberts *et al.*, 1998).

Existují tři typy cyklinu B (B1, B2 a B3), u savců je pravděpodobně primárně zodpovědný za činnost MPF cyklin B1. Zapnutí MPF ve všech buňkách podléhá dalším regulačním činnostem. Kinázy Wee1/Myt1 způsobují inhibiční fosforylaci Cdk1 na Thr14 a Tyr15 (vzniká neaktivní MPF, tzv. pre-MPF). Aby z pre-MPF vznikla aktivní MPF,

je nutná aktivační defosforylace na stejných místech Cdc1 pomocí fosfatázy Cdc25 (Jones, 2004; Liang *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2003) a fosforylace Thr161 proteinkinázou označovanou jako kináza aktivující cdc (Cdc – activating - kinase); (Stojkovic *et al.*, 1999; Whitaker, 1996). Proto může být aktivace MPF způsobena přímou aktivací Cdc2, udržováním rovnováhy mezi cdc25c a Myt1, nebo obojím. Většina Cdc2 v oocyty je monomerní, pouze asi 10 % Cdc2 je spojeno s cyklinem B v pre-MPF. Dalším mechanismem aktivace MPF může být syntéza cyklinu B *de novo*. Ten po navázání aktivuje Cdc2, která je již fosforylovaná na Thr161, a tak může generovat prahovou úroveň aktivity Cdc2, schopnou vyvolat autoamplifikaci MPF. Je také známo, že polo-like kináza1 (Plk1) je schopna fosforylovat a tím aktivovat cdc25c, což vede k defosforylaci Cdc2 a aktivaci MPF (Liang *et al.*, 2007). Myt1 má největší inhibiční účinek a nachází se v membránách Golgiho aparátu (GA) a endoplazmatickém retikulu (ER); (Moitra *et Sahu*, 2010).

Zrání oocyty je charakteristické dvojí kulminací koncentrace aktivní MPF. Vzestup nastává v době obnovení meiotického dělení, GVBD a prudce stoupá do MI, kdy postupně klesá během přechodu anafáze/telofáze I. Druhý vrchol nastává během meiotického bloku v metafázi II. Navzdory deaktivace během intervalu mezi dvěma vrcholy zůstává aktivita MPF udržována na poměrně vysoké úrovni. Tato trvalá aktivita MPF je pravděpodobně důležitá pro inhibici replikace DNA, čímž je umožněno redukční dělení pohlavní buňky

(Heikinheimo *et* Gibbons, 1998; Shimada *et al.*, 2002; Sun *et* Nagai, 2003). Aktivita MPF je udržována pomocí CSF, který sestává z Mos, MAPK a p90^{Rsk} (Alberio, 2001).

Jakmile je MPF jednou aktivovaná, může aktivovat další dosud neaktivní pre-MPF. Tato pozitivní zpětná vazba je vlastní příčinou náhlého prudkého nárůstu aktivity MPF, která rychle řídí vstup buňky do M – fáze (Alberts *et al.*, 1998).

Schmitt *et* Nebrada (2002) uvádí, že důležitou vlastností meiotického zrání je rozsáhlý systém zpětnovazebné signalizace, která je zodpovědná za vznik reakce „všechno nebo nic“, což má zajistit dokončení meiotického dělení. Právě tyto zpětné vazby způsobují, že je obtížné určit pořadí událostí v signálních kaskádách, protože i malé úrovně aktivní MPF stačí k aktivaci většiny zúčastněných drah při meiotickém zrání oocytů. Malé množství aktivního MPF může vyvolat aktivaci cdc25c a deaktivaci Myt1, čímž se vytváří pozitivní zpětná vazba (Liang *et al.*, 2007).

Pro uvolnění druhého meiotického bloku z metafáze II je nutná degradace cyklinu B, čímž dochází k deaktivaci MPF. Této degradaci se účastní proteinový komplex *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), který ubikvitinuje cyklin B, který je následně degradován v proteasomu 26S (Fan *et al.*, 2002; Jones, 2005).

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

MAPK je všudypřítomná serin/treonin protein-kináza regulující buněčnou proliferaci. V savcích oocytech jsou známy dvě izoformy této proteinkinázy, ERK1 (p44) a ERK2 (p42); (Fan *et al.*, 2002; Pelech, 2006).

Aktivace a funkce MAPK zahrnuje komplex kaskád, během nichž dochází k řadě fosforylací proteinů (Liang *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2002). Regulátorem MAPK je MAPK kináza (MAPKK, někdy označovaná MEK), to spočívá ve fosforylaci reziduí (zbytků) serinu a threoninu (Liang *et al.*, 2007). Samotná MEK (MAPKK) je aktivována fosforylací kinázou Mos (MAPKK kináza - MAPKKK), která je produktem protoonkogenu c – mos (Garrington *et* Johnson, 1999; Choi *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2007). Za regulátory Mos (MAPKKK) jsou považovány specifické kinázy a nízkomolekulární GTP – vázající proteiny (G – proteiny); (tj. Ras, Rac a Cdc42). V rámci oocytů je doba fungování Mos odlišná u žab *Xenopus laevis* a u savců, kdy je syntetizována až po GVBD (viz níže); (Fan *et al.*, 2002; Garrington *et* Johnson, 1999; Liang *et al.*, 2007). Důležitou funkcí Mos je potlačení S fáze po meioze I (Gross *et al.*, 2000).

Aktivace signální kaskády MAPKKK – MAPKK - MAPK je zprostředkována růstovými faktory, hormony a cytokiny. Dalším spouštěcím systémem této kaskády může být

buněčný stres, včetně ozáření, tepelný šok, osmotická nerovnováha, poškození DNA a bakteriální metabolity V reakci na tyto podněty řídí MAPK expresi genů, metabolismus, funkce cytoskeletu a má i další regulační činnosti (Garrington *et Johnson*, 1999).

Narozdíl od MPF, je doba aktivace MAPK během meiotického zrání druhově specifická, například v oocytech velkých domácích zvířat se MAPK aktivuje současně nebo těsně po GVBD, u myších oocytů až po GVBD (Hurk *et Zhao*, 2005). To může znamenat, že činnost MAPK není u savců nutná pro aktivaci MPF a GVBD (Fan *et al.*, 2002). Spontánní obnovení meiozy není závislé na MAPK (Motola *et al.*, 2008). Naopak u žab rodu *Xenopus* byla MAPK aktivovaná již před GVBD, tedy pro obnovení meiozy je pravděpodobně nezbytná. Na úplné aktivaci MAPK kolem GVBD se podílí MPF (Fan *et al.*, 2002).

MAPK má četné molekulární cíle, které jsou umístěny v jádře i cytoplasmě, včetně proteinů tvořící cytoskelet (Hurk *et al.*, 2005). Jednou z funkcí MAPK je zabránit inhibiční fosforylaci Cdc2 (Fan *et al.*, 2002; Whitaker, 1996). Dále u všech živočišných druhů MAPK vykonává pozitivní zpětnou vazbu na translaci cyklinu B, což je jeden z mechanismů, kterým pomáhá při aktivaci MPF v oocytech. Navíc když se nakumuluje Mos nad prahovou úroveň, která aktivuje MAPK, vede to též k aktivaci MPF. K tomu dochází patrně prostřednictvím aktivace p90^{Rsk} (*ribosomal protein S6 kinase*), jedním ze substrátů MAPK. Aktivací p90^{Rsk} dochází k inaktivaci Myt1, negativního regulátora MPF. Tímto mechanismem MAPK podporuje aktivaci MPF a pokračování v meióze I. MAPK je aktivována kolem přechodu G2/M fáze meiozy (Fan *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2007). MAPK hraje, podobně jako MPF, stěžejní roli v meiotickém zrání oocytů (Fan *et al.*, 2002).

Obnovení meiotického zrání oocytů je spojeno s reorganizací z interfázních mikrotubulů na metafázní konfiguraci. MAPK fosforyluje struktury MTOC (mikrotubuly organizující centra) a tím zvyšuje potenciál při organizaci dělicího vřeténka (Fan *et al.*, 2002; Hurk *et Zhao*, 2005; Whitaker, 1996). Fan *et al.* (2002) uvádí, že utváření dělicího vřeténka funguje jako kontrolní bod buněčného cyklu. Pokud je totiž dělicí vřeténko špatně utvářené, dokáže udržovat aktivitu MPF. V důsledku toho buňka nemůže vstoupit do anafáze. Ač je MAPK hlavní organizátor dělicího vřeténka, není ještě přesně doloženo, zda dělicí vřeténko takto reguluje aktivaci MAPK ve zpětnovazebné reakci.

MAPK se podílí na organizaci a udržování metafázního dělicího vřeténka v oocytech, kondenzaci chromozomů, a to i když je inhibována aktivita MPF. Dále se podílí na emisi pólového tělíska, kdy je lokalizovaná na cytokinetickém prstenci (Fan *et al.*, 2002; Hurk *et Zhao*, 2005).

Během zrání oocytů je velice důležitá činnost Mos/MAPK/ p90^{rsk} při udržování 2. bloku meiózy v MII, jedná se o tzv. cytotatický faktor (CSF), který udržuje aktivitu MPF (Alberio, 2001; Fan et al., 2002; Fan *et al.*, 2002; Hurk *et Zhao*, 2005; Choi *et al.*, 1996).

Ionty Ca²⁺ a K⁺

Vápníkové ionty Ca²⁺ funguje v buňkách jako druhý posel a signální molekula. Buňka udržuje v cytosolu nízkou koncentraci Ca²⁺ iontů aktivním odčerpáváním do extracelulárního prostoru nebo translokací do organel, jako je endoplazmatické retikulum (ER) nebo mitochondrie (Alberts *et al.*, 2002). Zvýšená a pulzující koncentrace Ca²⁺ iontů v cytosolu reguluje v somatických buňkách mnoho fyziologických procesů, včetně buněčného dělení (Lodish *et al.*, 2004). Znovuzahájení meiózy I a její pokračování je závislé na regulaci Ca²⁺ ionty. Exocytóza kortikálních granulí (CG) a emise pólového tělíska je rovněž závislá na signalizaci Ca²⁺ ionty (Fan *et al.*, 2003).

Pro fyziologickou funkci Ca²⁺ je nutný protein kalmodulin. Kalmodulin po jejich navázání Ca²⁺ změní konformaci a naváže se na další proteiny (nejčastěji proteinkinázy a fosfatázy), které aktivuje nebo deaktivuje. Důležitou cílovou kinázou kalmodulinu je kalmodulin-dependentní kináza II, CaMKII (Campbell *et Reece*, 2008; Alberts *et al.*, 1998).

Do signalizace Ca²⁺ ionty jsou zapojeny také další druzí poslové, jako inositol-trisfosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Za uvolňování těchto signálních molekul je odpovědná fosfolipáza C (PLC), která je štěpí membránové fosfolipidy (Lodish *et al.*, 2004). DAG setrvává v plazmatické membráně, kde napomáhá aktivaci proteinkinázy C (PKC), IP3 se váže na receptory ER a přímo otevírá Ca²⁺-kanály spojené s IP3-receptory (Alberts *et al.*, 2002). Dalšími receptory spojenými s Ca²⁺-kanály jsou ryanodinové receptory (RyR) otevírané Ca²⁺ uvolněným po signalizaci IP3 a uvolňující velké množství Ca²⁺-iontů (Marks, 1996; Louvet *et Collin*, 2005). Dalším typem Ca²⁺-kanálů jsou kanály otevírané změnou elektrického napětí. Tyto kanály jsou přítomné v somatických buňkách i oocytech (Yoshida, 1997; Cantí *et al.*, 2000). V regulaci těchto kanálů se uplatňují samotné ionty Ca²⁺, podjednotky G-proteinu a PKC (Hamid *et al.*, 1999; Kamatchi *et al.*, 2003).

Na přítomnosti Ca²⁺ iontů uvolněných Ca²⁺-kanály je závislá aktivita mnoha kináz, např. některých izoforem zmíněné PKC (Fan *et al.*, 2002; Zhang *et O'Neil*, 2001; Hurk *et Zhao*, 2005).

Vedle Ca²⁺ iontů nesou regulační potenciál také K⁺ ionty. Změna jejich koncentrace v cytosolu a extracelulárním prostoru je odpovědná za změny membránového potenciálu, který

se uplatňuje v řadě fyziologických pochodů. K^+ ionty (Lodish *et al.*, 2004). Za zvýšení koncentrace K^+ -iontů v cytoplasmě jsou odpovědné draselné kanály. Tyto kanály jsou selektivní a umožňují prostup pouze K^+ iontů. (Albert *et al.*, 2002).

Kanály sestávají z proteinů Kir6, tvořících pór, a receptorových proteinů sulfonylurey, která má vysokou afinitu k molekulám ATP (Komersová *et Sechser*, 2002; Nicholson *et Calvert*, 2010; Calvert *et al.*, 2010). Otevření draselných kanálů (K_{ATP} -kanálů) je tak možné pouze po navázání molekuly ATP. Na otevírání kanálů se podílí mnohé signální molekuly, které mohou být v buňce produkovány endogenně. Regulační molekuly mohou být také exogenního původu a na K_{ATP} -kanály uvnitř buňky působí prostřednictvím receptorů na cytoplazmatické membráně buňky. Mezi možné signální molekuly K_{ATP} -kanálů fungující jako druzí poslové v cytosolu buňky patří také některé plynné molekuly (Zhao *et al.*, 2001).

K_{ATP} -kanály se vyskytují v různých typech somatických buněk, v sarkolemě svalových buněk, mitochondriální a jaderné membráně B-buněk pankreatu, neuronů, srdečních myocytů nebo hepatocytů (Nicholson *et Calvert*, 2010; Calvert *et al.*, 2010). K_{ATP} -kanály se nachází také v oocytech a folikulárních buňkách různých živočišných druhů (Wilbrand *et al.*, 1992; Honoré *et Lazdunski*, 1993; Guillemare *et al.*, 1995; Saldana *et Vázquez-Cuevas*, 2004; Tammaro *et Ashcroft*, 2009; Du *et al.*, 2010).

K_{ATP} -kanály ve folikulárních buňkách oocytů žab rodu *Xenopus* významně regulují proces meiotického zrání. Otevření K_{ATP} -kanálů následně reguluje vnímavost oocytu k progesteronu (Wilbrand *et al.*, 1992; Honoré *et Lazdunski*, 1993; Guillemare *et al.*, 1995; Saldana *et Vázquez-Cuevas*, 2004; Tammaro *et Ashcroft*, 2009).

V oocytech savců byla rovněž prokázána exprese proteinů K_{ATP} -kanálů. V prasečích oocytech stádia GV byla detekována mRNA pro dílčí proteiny K_{ATP} -kanálů (Du *et al.*, 2010).

Meiotická kompetence

Pouze plně dorostlé oocyty mohou vystoupit z diplotenního stádia meiózy I procesem GVBD a pokračovat v meióze, tj. v meiotickém zrání. Schopnost pokračovat v meiotickém zrání a dosáhnout MII se nazývá meiotická kompetence, kterou musí oocyt získat před vstupem do fáze zrání, tj. během růstu.

Plně vzrostlý oocyt u prasat dosahuje velikosti 120 μm (Motlik *et al.*, 1984). U plně vzrostlého prasečího oocytu pozorujeme plně vyvinuté jádro, které se označuje jako zárodečný váček (GV – *germinal vesicle*). V průběhu obnovení meiózy dochází k charakteristickému rozpadu GV (GVBD- *germinal vesicle breakdown*), někdy také označovaný jako rozpad jaderné membrány (NEB - *nuclear envelope breakdown*). Druhý blok

meiózy nastává při dosáhnutí metafáze II. Úplné dokončení meiózy nastává po oplození či partenogenetické aktivaci oocyty (Fan *et al.*, 2002; Fan *et Sun*, 2004; Moitra *et Sahu*, 2010).

Motlik *et al.* (1984) prováděli studii, ve které sledovali schopnost pokračovat v meiotickém zrání (tj. GVBD), resp. dokončení MII fáze, u prasečích oocytů, ve vztahu k jejich velikosti a velikosti antrálních folikulů. Oocyty byly rozděleny do 4 tříd podle velikosti antrálních folikulů, ze kterých byly získány: skupina A (0,3 – 0,7 mm) zůstala po 24 h kultivaci ve více než v 80 % případů ve stádiu GV. Skupina B (0,8 – 1,6 mm) podstoupila GVBD z 66 %, skupina C (1,7 – 2,2 mm) z 94,4 % a skupina D (3 – 5 mm) podstoupila GVBD ze 100 %. Po 48 h kultivaci dosáhla skupina A (do 0,7 mm) pouze 4 % do fáze MI. Po této době dosáhla skupina B (do 1,6 mm) MI v 23 % a MII v 17, 3 % případů, skupina C (do 2,2 mm) a D (nad 3 mm) dosáhla vydělení 1. pólového tělíska z 50 a 76 % (Motlik *et al.*, 1984).

Fulka *et al* (1998) uvádí, že než oocyty získají úplnou meiotickou kompetenci na konci růstové fáze, procházejí oocyty přechodnou fází, která se označuje jako částečná meiotická kompetence, kdy po kultivaci *in vitro* dosahují oocyty pouze do stádia metafáze I (MI).

GVBD je *in vivo* zahájeno buď preovulační vlnou gonadotropinů, anebo degenerací folikulu (Eppig, 1993). Ačkoliv vyjmutí oocytů z antrálních folikulů k spontánní GVBD vede, vyjmutí oocytů z preantrálních folikulů nikoliv (Eppig, 1993). V reakci na preovulační vlnu LH a signály z intrafolikulárního prostředí oocyty dochází k obnovení meiózy u savčích oocytů. Kromě GVBD to souvisí s mnoha různými ultrastrukturálními změnami jako je kondenzace chromozomů, vydělení 1. pólového tělíska a 2. blok meiózy v MII. Aby však mohl plně dorostlý oocyt pokračovat za M I, musí dojít k přerušení spojů *gap junction*, a tedy omezení vlivu inhibičního účinku cAMP a dalších molekul. To se děje v procesu tzv. „expanze kumulu“, kdy v důsledku preovulační vlny gonadotropinů začnou kumulární buňky produkovat kyselinu hyaluronovou. Expanze či též mucifikace kumulu je důležitá nejen pro znovuzahájení meiózy, ale jelikož hraje důležitou úlohu při ovulaci a při oplození, je expanze kumulu nezbytná v podmínkách *in vivo* pro úplné dokončení meiozy. Na regulaci meiotického zrání se podílejí molekuly, které byly nasyntetizovány již v době růstu oocyty. Jedná se o kaskádu signálních molekul jako je MPF, CSF a další, které účinkují na základě fosforylace/defosforylace a které přímo či nepřímo řídí meiotické zrání (popsané v kapitole „Hlavní molekuly regulující meiotické zrání“); (Eppig, 1993; Fan *et al.*, 2002; Fan *et Sun*,

2003; Kishimoto, 2003; Motlik *et al.*, 1986; Stojkovic *et al.*, 1999; Tanghe *et al.*, 2002; Wassermann, 1988; Whitaker, 1996).

Na meiotickou kompetenci oocytů navazuje kompetence vývojová, která umožňuje vývoj zygoty až do stádia blastocysty. Tuto schopnost získávají oocyty již během růstové fáze a dále během cytoplazmatického zrání. Během konečného zrání oocytu dochází mj. k nárůstu lipidových granulí, které představují energetickou složku až do stádia blastocysty. Pouze zralé oocyty mají po aktivaci schopnost zahájit embryonální vývoj (Hyttel *et al.*, 1997).

2.2 Prodloužená kultivace a stárnutí oocytů

Meiotické zrání oocytů je zastaveno v metafázi 2. meiotického dělení, kterou označujeme za 2. meiotický blok. Takový oocyt je předurčen k oplození spermií (Wassarman, 1988).

Pokud nedojde k oplození a oocyty jsou dále vystaveny tzv. prodloužené kultivaci, podléhají biochemickým a morfologickým změnám souhrnně označované jako stárnutí (Kikuchi *et al.*, 2000). Stárnoucí oocyty mohou prolomit 2. meiotický blok a podlehnout spontánní partenogenetické aktivaci. Ostatní oocyty podléhají programované buněčné smrti, popř. lýze. Část oocytů zůstává intaktní ve stádiu metafáze II (Petrová *et al.*, 2004; 2005; 2009).

Stárnoucí oocyty podléhají spontánní partenogenezi až v 45 % případů (Petrová *et al.*, 2004). Po oplození *in vivo*, popř. v *in vitro* podmínkách, způsobuje aktivaci oocytu spermie. Aktivaci lze také vyvolat některými chemickými látkami nebo fyzikálními stimuly. Aktivace oocytu spermií, spontánní partenogenezi či umělou aktivací má za následek vzestup koncentrace Ca^{2+} v cytosolu oocytu (Jolliff *et Prather*, 1997; Ozil, 1990; Petr *et al.*, 2007; Procházka *et al.*, 1992).

Spontánní partenogenetická aktivace

V důsledku většího množství faktorů důležitých pro mitotické dělení a embryonální vývoj může dojít ke spontánní partenogenetické aktivaci oocytu bez penetrace spermie (Tatemoto *et al.*, 2000; Miao *et al.*, 2009).

U oocytů, které podstoupily partenogenetickou aktivaci, je možné pozorovat různé uspořádání prvojadra a pólových tělísek. Lze tak rozlišit partenogeneticky aktivované oocyty a vzniklé zygoty na diploidní a haploidní. Za diploidní považujeme takové zygoty, které vydělilo pouze 1. pólové tělísko a vytvořilo dvě prvojádra. Za haploidní zygotu

označujeme takové, které vydělilo dvě pólové tělíska a utvořilo jedno prvojádro. Zastoupení diploidních zygot je nepatrně četnější než zygote haploidních (47 versus 38 %); (Petrová et al., 2004).

Mimo zmíněných uspořádání prvojader a pólových tělísek jsou pozorovány další formy, které jsou zastoupeny s nižší četností. Jedná se o oocyty s jediným pólovým tělískem a jedním prvojádrom, které představující diploidní formu vzniklou syngamií prvojader či důsledkem přímé dekondenzace chromozomů v metafázní destičce s nefunkčním meiotickým vřeténkem. Další pozorovanou konfigurací jsou oocyty s více než dvěma prvojádry, která mohou vznikat přerušením meiotického vřeténka a následným rozptýlením chromozomů (Petrová et al., 2004).

Spontánně partenogeneticky vzniklá embrya v podmínkách *in vitro* následně podléhají mitotickému dělení a vzniku morul. Partenogenetická embrya se začínají dělit s nejvyšší intenzitou 3. den kultivace, kdy obvykle dosahují 2–buněčného stádia. Méně oocytů dosáhne za stejnou dobu 4–buněčného stádia a jen výjimečně 8–buněčné moruly (Petrová et al., 2004).

Prasečí embrya vzniklá partenogenetickou aktivací jsou schopná dosáhnout stádia blastocysty (Abeydeera, 2002). Savčí embrya však nejsou schopná pokračovat v dalším embryonálním vývoji. Za nepřítomnosti samčího prvojadra dochází k nedostatečnému vývoji trofoblastu, naopak samičí prvojádro je nezbytné pro plnohodnotný vývoj embryoblastu (Hall, 1990).

Aktivace spermií

Při oplození přináší do oocytu aktivační stimul spermie (Yanagimachi, 1988). Po fúzi spermie a oocytu dochází k přechodnému dramatickému nárůstu intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontu. Následné pulzy Ca^{2+} -koncentrace se vyskytují v celé cytoplazmě oocytu a oscilují v pravidelných intervalech po dobu nejméně 4 hod po oplození (Miyazaki, 2006; Ozil, 1990). Zvýšení Ca^{2+} iontů je klíčový signál pro děje následující po aktivaci oocytu vedoucí k potlačení účinku MPF a MAPK, faktorů udržujících 2. meiotický blok. To je podmínkou pro mitotické dělení vzniklé zygoty (Abbott et al., 1998).

Při aktivaci oocytu spermií hraje nezbytnou úlohu kalmodulin-dependentní kináza II (CaMKII); (Tatone et al., 2002). CaMKII je serin/threonin protein-kinázou, která je aktivována Ca^{2+} a kalmodulinem. CaMKII je regulátor meiotického buněčného cyklu a formace dělicího vřeténka již během zrání oocytu. Její účinek spočívá v regulaci činnosti MPF, MAPK a $p90^{tsk}$ během meiotického zrání (Fan et al., 2003). Zvýšení hladiny Ca^{2+}

a aktivace CaMKII v cytosolu oocyty po oplození způsobující inaktivaci CSF a umožňuje dokončit meiózu u oocytů ve stádiu MII. Oscilace vápníku po penetraci spermií do oocyty je schopna vyvolat degradaci cyklinu B aktivací APC/C (Jones, 2005; Santella *et al.*, 2004).

V důsledku aktivace oocyty a vzestupu intracelulární koncentrace Ca^{2+} dále dochází k exocytóze kortikálních granul, změněm *zony pellucidy*, znovuzahájení meiózy, vydělení 2. pólového tělíska, následně k dekonenzaci chromozomů, formování prvojader, syntéze DNA a rýhování vzniklé zygoty (Abbott *et al.*, 1998; Jolliff *et Prather*, 1997; Vincent *et al.*, 1992).

Umělá aktivace

Různé postupy umělé aktivace oocytů jsou založené na principu zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytosolu, i bez průniku spermie do oocyty. Mezi aktivační látky tak patří donory Ca^{2+} iontů kalcium-ionofory (Wang *et al.*, 1998), etanol (Yi *et Park*, 2005) nebo stroncium (Krivokharchenko *et al.*, 2003). U prasečích oocytů může být silným aktivačním stimulem inhibice některých protein-kináz, kdy nedochází k zvýšení hladiny vápníku v oocyty. K tomu může být použit 6-dimethyl aminopurin (Jílek *et al.*, 2001). Další způsob nabízí kombinace metod umělé aktivace, kdy dochází k inhibici protein-kináz i ke zvýšení hladiny vápníku v oocyty (Jílek *et al.*, 2001). Partenogenetickou aktivaci lze rovněž vyvolat donory NO. V takovém případě ale nedochází k exocytóze CG a nedostatečné je také následné dělení embryí (Petr *et al.*, 2005). Zvolený způsob aktivace se tak odráží nejen v úspěšnosti aktivace oocytů, ale také v úspěšnosti následného embryonálního vývoje.

2.3 Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou plynné molekuly, které jsou uvolňovány endogenně ve fyziologických koncentracích a plní úlohu přenašečů buněčného signálu (Pae *et al.*, 2009). Exogenní původ těchto plynů má v běžných koncentracích účinek patologický (Beauchamp *et al.*, 1984; Olson, 2011). V současné době byl studován v různých živočišných tkáních vliv řady plynných molekul. Mezi tyto gasotrasmitery patří NO, CO a H_2S (Wang, 2002). Lze předpokládat, že tyto gasotransmitery disponují silným regulačním potenciálem také v meiotickém zrání oocytů savců.

Protože jsou malé molekuly gasotransmiterů schopny prostupovat cytoplazmatickou membránou, nevyžaduje jejich signalizace membránové receptory (Zhao *et al.*, 2001; Wang, 2002; Pae *et al.*, 2009). Gasotransmitery mají specifické buněčné a molekulární cíle.

Ve svém účinku často vzájemně spolupracují na různých úrovních. Jejich úloha byla potvrzena například v regulaci vaskulární homeostázi, ve funkci v centrální nervové soustavě a při zánětu. Mají významnou úlohu např. v kontrole napětí hladké svaloviny cévní stěny, regulaci zánětlivých procesů, ovlivňují nervový přenos a množství dalších pochodů v organismu (Pae *et al.*, 2009).

Proto se v současné době rozvíjí úsilí využít těchto mechanismů ve farmacii pro výrobu nových léků, které by napodobovaly jeho účinky nebo naopak blokovaly jeho biosyntézu (Li *et Moore*, 2008; Olson *et al.*, 2011).

Gasotransmitery jsou endogenně uvolňovány podle potřeby organismu. Za uvolnění gasotrasmiterů jsou zodpovědné enzymy, uvolňující tyto plynné molekuly z aminokyselin bílkovin. Specifické enzymy nabývají řady izoform a jsou exprimovány v různých tkáních podle potřeby organismu (Wang, 2002).

Po uvolnění jsou gasotrasmitery rychle degradovány v řádech minut nebo dokonce vteřin (Wang, 2002).

2.3.1 Oxid dusnatý

Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO). Účinek NO byl objasněn na tkáni kardiovaskulárního systému. NO je enzymaticky uvolňován z aminokyseliny L-argininu (Furchgott *et al.*, 1992).

NO v organismu působí jako signální molekula pro signální dráhy cévní, svalové a reprodukční soustavy (Rosselli *et al.*, 1998).

Účinek NO v oocytech spočívá v regulaci meiotického zrání. V oocytech hlodavců je NO důležitý pro rozpad zárodečného váčku (GVBD) a v přechodu z anafáze do telofáze 1. meiotického dělení (Huo *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 2002).

Uvolňování NO katalyzují enzymy NO-syntázy, označované jako NOS. Tyto enzymy nabývají v živočišných tkáních tří izoform pojmenovaných podle místa jejich prvního objevu. Tyto izoformy NOS pocházejí ze tří různých genů. Rozlišujeme tak neuronovou nNOS exprimovanou v centrální a periferní nervové soustavě, endotelovou eNOS a indukovatelnou iNOS (Jablonka-Shariff *et Olson*, 1998; Nakamura *et al.*, 2002). Všechny izoformy NOS přeměňují aminokyselinu L - arginin na oxid dusnatý (NO) a L - citrulin.

eNOS se uplatňuje zejména v endotelových buňkách. Fyziologický účinek eNOS spočívá v uvolnění NO z L-argininu v endotelu cév. Vzniklý NO poté aktivuje solubilní guanylát-cyklázu (sGC) v cílových tkáních, jako je hladká svalovina (Palmer *et al.*, 1992). Aktivace sGC vede k syntéze cyklického 3', 5' – guanosinmonofosfátu (cGMP), který reguluje vasodilataci a přenos nervového vzruchu (Palmer *et al.*, 1992; Krumenacker *et al.*, 2004).

iNOS je přítomná ve většině tkání organismu. Exprese této izoformy převažuje v makrofázích při zánětlivých procesech (Gadalla *et Snyder*, 2010).

nNOS a eNOS jsou enzymy aktivované vápníkem a kalmodulinem (Bredt *et Snyder*, 1989 in Gadalla *et Snyder*, 2010). Naproti tomu iNOS uplatňovaná při zánětu není Ca²⁺-dependentní (Cho *et al.* 1992; Lowenstein *et al.* 1992, 1993 in Gadalla *et Snyder*, 2010). Uplatnění nachází izoformy NOS také v prasečích oocytech během meiotického zrání v *in vitro* podmínkách (Chmelíková *et al.*, 2010).

2.3.2 Oxid uhelnatý

Úloha CO spočívá v podobných fyziologických účincích jako NO. Bylo prokázáno, že CO inhibuje agregaci krevních destiček, aktivuje sGC a sehrává úlohu při přenosu nervových vzruchů. CO je významný pro kontrolu cévního tonusu. CO v savčích tkáních vzniká degradací hemu na CO a biliverdin (Sammur *et al.*, 2009). Tuto reakci katalyzují dvě izoformy hem oxygenázy (HO), HO-1 a HO-2. Obě izoformy HO pocházejí z odlišných genů (Maines, 1988). HO-1 je inducibilní enzym, který je obsažen v játrech, ledvinách a slezině, v orgánech zajišťujících degradaci červených krvinek a katabolismus hemu (Poss *et Tonegawa*, 1997). HO-2 je lokalizovaná v neuronech a endoteliální vrstvě cév. Tento enzym je aktivován vápenatými kationty a kalmodulinem, stejně jako nNOS a eNOS (Verma *et al.*, 1993; Zakhary *et al.*, 1996; Boehning *et al.*, 2004 in Gadalla *et Snyder*, 2010). Nové práce rozeznávají další izoformu hem oxygenázy, HO-3. Ta je ale méně efektivní než HO-1 a HO-2 (Calvert *et al.*, 2010).

2.3.3 Sulfan

H₂S je bezbarvý plyn štiplavého zápachu. Obecně je známý jako prudce jedovatý plyn, který ve větších dávkách způsobuje smrtelné otravy. Toxické účinky H₂S se projevují

nejvýrazněji v centrální nervové soustavě a selháním dýchací soustavy (Beauchamp *et al.*, 1984; Stárka, 2010).

Ve fyziologických koncentracích je H₂S uvolňován z aminokyseliny L-cysteinu. K endogenní produkci H₂S dochází téměř ve všech orgánech živočichů (Gadalla *et Snyder*, 2010). H₂S byl tak detekován v mozku, neuronech, cévách, kardiomyocytech a pankreatických β-buňkách. H₂S se v těchto buňkách nachází zejména v mitochondriích (Calvert *et al.*, 2010). H₂S lze nalézt také u mnoha bezobratlých a bakterií (Li *et Moore*, 2008).

H₂S v organismu je rychle oxidován na elementární síru, oxid siřičitý (SO₂) a sulfáty, jako je kyselina sírová (H₂SO₄), nebo může být hydrolyzován na hydrogensulfid (HS⁻) a siřičité ionty (S²⁻) (Mancardi *et al.*, 2009). Také sulfan produkovaný těmito enzymy (stejně jako NO a CO) není v organismu přítomen v podobě plynu. H₂S se dobře rozpouští ve vodě a asi třetina ho zůstává ve vodném roztoku nedisociovaná, dvě třetiny jsou disociovány na HS⁻ a S²⁻ a proton (Stárka, 2010). Jeho rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech je přibližně pětikrát větší než ve vodě (Lim *et al.*, 2008; Wang, 2002). Proto může rychle a snadno difundovat přes buněčné membrány a podílet se tak na řadě fyziologických funkcí.

Mezi hlavní intracelulární cíle pro H₂S patří K_{ATP} kanály, cytochrom *c* oxidáza a množství intracelulárních signálních molekul, zejména NF-κB a p38 MAPK (Li *et Moore*, 2008; Calvert *et al.*, 2010). Od cílových molekul se odvíjí účinek H₂S. Vasorelaxační efekt H₂S spočívá v přímé aktivaci K_{ATP} kanálů v buňkách hladké svaloviny cév (Wang, 2003; Tang *et al.*, 2005). Částečně dochází k vasorelaxaci přímo v endoteliálních buňkách prostřednictvím prostupu K⁺ iontů do buňky (Zhao *et al.*, 2001).

Byl objasněn kardioprotektivní účinek H₂S, který je zprostředkován fosforylací MAPK1/2. Fosforylace MAPK následně vede k aktivaci PKC a K_{ATP}-kanálů v buňkách myokardu (Hu *et al.*, 2008).

Lze předpokládat, že H₂S reguluje aktivaci i dalších faktorů, jako PI3-kinázu (Hu *et al.*, 2008).

H₂S, díky svým chemickým vlastnostem, prostupuje volně přes biomembrány a své cílové molekuly ovlivňuje přímo, bez nutnosti membránových receptorů nebo druhých posílů (Zhao *et al.*, 2001; Calvert *et al.*, 2010).

Enzymy uvolňující sulfan

Tvorba H_2S z cysteinu je katalyzována pomocí tří enzymů: cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin γ -lyázy (CSE) a 3-mercaptopyruvát sulfotransferázy (3MPST); (Kamoun, 2004). Towicka *et Bettowski* (2007) uvádí, že H_2S je uvolňován pomocí CSE a CBS za přítomnosti pyridoxal-5'-fosfát (vitamin B6) jako kofaktoru. Shibuya *et al.* (2009) uvádí, že 3MPST produkuje H_2S z cysteinu v kombinaci s cystein-aminotransferázou (CAT). Donorem H_2S může být samotný CSE, protože tento enzym obsahuje 12 cysteinových zbytků (Zhao *et al.*, 2001).

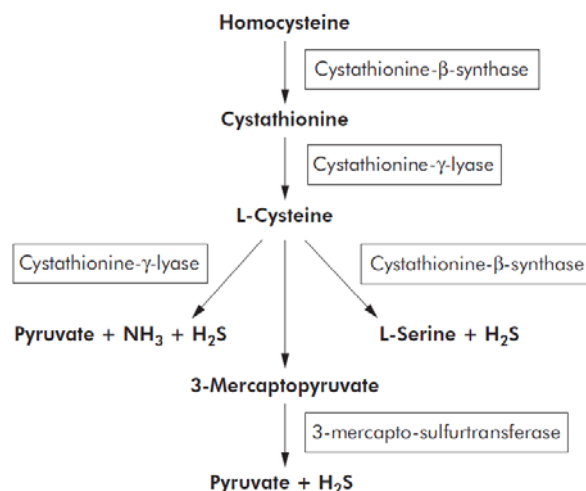
Ezymy uvolňující endogenní sulfan mohou být zapojeny do signálních drah ostatních gasotransmiterů. NO ovlivňuje expresi CSE a tím produkci H_2S v cévním systému (Zhao *et al.*, 2001). Naopak sulfan může ovlivňovat aktivitu hem-oxygenázy, enzymu odpovědného za uvolňování CO (Zhang *et al.*, 2004).

Wang (2002) zjistil, že v některých tkáních, jako jsou játra a ledviny, je k uvolnění H_2S zapotřebí obou hlavních enzymů CBS a CSE současně. V jiných tkáních postačuje pouze jeden z enzymů, jako CBS v mozku nebo CSE v kardiovaskulárním systému (Lim *et al.*, 2008).

Lze předpokládat, že se jednotlivé enzymy zastupují, pokud je exprese jednoho z nich potlačena. U hladkosvalových buněk arterií potkana je ovšem k uvolňování H_2S zapotřebí CSE a alterace jiným enzymem byla vyloučena (Zhao *et al.*, 2001).

H_2S , jako konečný produkt cysteinového metabolismu, působí účinkem negativní zpětné vazby na činnost zmíněných enzymů (Wang, 2002).

Obrázek 1: Metabolismus H_2S (dle Ebrahimkhani *et al.*, 2005)



Signální dráhy H₂S

Bylo zjištěno, že sulfan ovlivňuje lokalizaci a distribuci izoforem PKC v kardiomyocytech (Pan *et al.*, 2008). Sulfan je schopen regulovat také aktivitu izoforem PKC v somatických buňkách (Yong *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). Mechanismus regulace není dosud objasněn. Přesto je zřejmé, že prostřednictvím PKC sulfan ovlivňuje také intracelulární distribuci Ca²⁺ iontů (Pan *et al.*, 2008).

Jak bylo zjištěno u buněk cévního systému, sulfan vyvolává otevření K_{ATP}-kanálů na povrchu hladkosvalových buněk a na membráně jejich mitochondrií. Sulfan tak reguluje membránový potenciál buňky a je tak prvním a prozatím jediným gasotransmitterem, u kterého byla tato schopnost identifikována (Zhao *et al.*, 2001; Calvert *et al.*, 2010). Sulfan reguluje K_{ATP}-kanály přímo bez potřeby receptorů nebo druhých posílů (Zhao *et al.*, 2001). Otevření K_{ATP}-kanálů může být také zprostředkováno aktivací PKC, na které se sulfan podílí (Hu *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2008; Yong *et al.*, 2008).

Sulfan se prostřednictvím PKC také uplatňuje na regulaci toku dalších iontů, jako je Ca²⁺ a Na⁺ iontů, čímž mimo jiné ovlivňuje hodnoty membránového potenciálu buněk (Pan *et al.*, 2008).

U somatických buněk bylo rovněž zjištěno, že endogenní sulfan se podílí na regulaci stresových kináz z rodiny MAPK. Fosforylace MAPK následně vede k aktivaci PKC a K_{ATP}-kanálů v buňkách myokardu (Hu *et al.*, 2008).

Sulfan sehrává roli v uvolňování dalších gasotransmitterů. Bylo zjištěno, že sulfan je schopen aktivovat eNOS v myocytech (Yong *et al.*, 2008). Rovněž uvolňování CO je sulfanem regulováno, protože sulfan je zprostředkovane schopen ovlivňovat expresi hemo-oxygenasy 1 (Calvert *et al.*, 2010), faktoru potlačujícího buněčný stres (Tanito *et al.*, 2007).

Sulfan se podílí na expresi proteinu hsp70 a řady anti-apoptotických faktorů, čímž se také tímto způsobem podílí na apoptóze buněk (Calvert *et al.*, 2010). U myších kardiomyocytů sulfan potlačuje apoptózu, fragmentaci DNA a aktivitu kaspáz. Rovněž byl prokázán ochranný účinek na mitochondrie, jejich funkci a integritu (Elrod *et al.*, 2007). Sulfan rovněž ovlivňuje aktivitu cytochrom c oxidázy (Hu *et al.*, 2008). Lze tedy předpokládat, že sulfan ovlivňuje procesy spojené také s apoptózou oocytů a kumulárních buněk.

Účinek H₂S v živočišných tkáních

Účinek H₂S byl studován v oběhové soustavě. Bylo prokázáno, že H₂S snižuje krevní tlak, chrání srdce před ischemií a reperfuzním poškozením (Elrod *et al.*, 2007; Tang *et al.*,

2010). V dřívějších studiích byla zkoumána exprese enzymů zodpovědných za uvolňování H₂S v živočišných tkáních. Wang (2002) prokázal, že CBS v kardiovaskulárním systému při vytváření H₂S nemá žádnou roli. Naopak, CSE se zapojuje do produkce H₂S v hladkosvalových buňkách cév, jako aorta, mezenterické tepny, plicní tepny a portální žíly (Wang, 2002; Zhao *et al.*, 2001). Expresse enzymů zodpovědných za uvolňování H₂S nebyla prokázána v endoteliálních buňkách cév (Zhao *et al.*, 2001). Vasorelaxační efekt H₂S je spojen s NO a CO; sulfan však nevyvolává vasorelaxaci prostřednictvím aktivace cGMP (Calvert *et al.*, 2010). Zatímco NO a CO aktivují právě cGMP, sulfan působí otevřením K_{ATP}-kanálů hladkosvalových buněk arterií. Produkce H₂S je stimulována NO prostřednictvím zvýšené exprese CSE a lze předpokládat, že vasorelaxace je regulována právě interakcí těchto dvou gasotransmiterů (Zhao *et al.*, 2001).

V srdečních buňkách má endogenní produkce H₂S protektivní účinek, který spočívá v ochraně mitochondriální funkce a integrity mitochondriální membrány. Sulfan tak potlačuje programovanou buněčnou smrt kardiomyocytů myši, fragmentaci DNA a aktivitu kaspázy-3 v těchto buňkách (Elrod *et al.*, 2007). Sulfan také potlačuje aktivitu cytochrom c oxidázy (Blackstone *et al.*, 2005).

Sulfan se funkčně podílí na indukci dlouhodobé potenciace hippocampu a vývoji mozku. Tento efekt závisí na aktivaci NMDA receptorů (receptorů N-methyl D- aspartátové kyseliny); (Wang, 2002; Kimura *et al.*, 2005). Fyziologické koncentrace H₂S v mozkové tkáni byly zjištěny v rozmezí 50 – 160 μm (Wang, 2002).

Wang (2002) prokázal v nervové tkáni potkanů transkripci pouze CBS, naopak nebyla zjištěna transkripce CSE. Zdá se být hlavním enzymem produkující sulfan v nervové soustavě CBS.

Účinek H₂S v nervové tkáni je vysvětlován dvojím způsobem: nervové buňky mají receptory pro sulfan, které vedou k produkci cAMP; jiným vysvětlením je přítomnost adenylát-cyklázy v těchto buňkách, která je aktivována sulfanem (Kimura, 2000).

H₂S endogenního i exogenního původu ovlivňuje sekreci inzulínu. Zatímco exprese CBS je v buňkách ostrůvků slinivky břišní konstantní, exprese CSE reaguje na koncentraci glukózy v krvi (Taniguchi *et Niki*, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

CBS a CSE jsou exprimovány také v tukové tkáni potkanů. H₂S v tukové tkáni reguluje lokální citlivost k inzulínu. Snížená koncentrace H₂S je spojena s obezitou a diabetem II. typu (Zhu *et al.*, 2011).

Tang *et al.* (2010) uvádí, že H₂S inhibuje sekreci inzulínu v pankreatu β-buněk a působí protizánětlivě, analgeticky a má antiapoptotické účinky. Nejnovější studii o vlivu H₂S během

zánětu poskytli Baskar *et al.* (2011). Autoři připomínají některé studie, které hovoří o H₂S jako protizánětlivém agens. Zároveň upozorňují, že mechanismy těchto účinků nejsou ještě zcela objasněny. Rovněž autoři Gadalla *et al.* (2010) uvádějí, že endogenní H₂S je protizánětlivý.

Sulfan a reprodukční soustava

V samčím pohlavním ústrojí má endogenní sulfan potenciální vliv při podpoře erekce pyje. Bylo zjištěno, že CSE je lokalizována v trabekulární svalové tkáni, hladkosvalových buňkách cév a periferních nervech reprodukčních orgánů, zatímco CBS je lokalizována hlavně v trabekulární svalové tkáni (Zhu *et al.*, 2011).

Sugiura *et al.* (2005) se zabýval enzymy tvořící sulfan ve varlatech potkanů vystavených stresu. CBS byla zaznamenána především v Leydigových buňkách, Sertoliho buňkách a u zárodečných buněk. CSE byla patrná v Sertoliho buňkách a nezralých zárodečných buňkách.

CBS a CSE byly rovněž zjištěny v buňkách dělohy, vagíny, placenty a plodových obalů, kde sehrávají dosud neobjasněnou úlohu (Zhu *et al.*, 2011).

Skupina vědců zkoumající H₂S v různých tkáních u myši s vyblokováním genu pro CSE zjistili, že se snížila hladina H₂S v mnoha tkáních. I přesto byly myši plodné a porody měly fyziologický průběh (Yang *et al.*, 2008).

Naopak jiné práce (Wantabe *et al.*, 1995 *in* Zhu *et al.*, 2011) prezentují výsledky, kdy samičí potomci po myších s knock-outovaným genem pro CBS mají sníženou plodnost, zatímco samsamčí potomstvo je plodné. To dokazuje, že CBS je důležitý pro reprodukční funkce samic.

Enzym CBS byl lokalizován ve vaječníku myši a současně byla prokázána intenzivní exprese ve folikulárních buňkách myších ovárií (Liang *et al.*, 2006).

Sulfan v oocytech

Přítomnost enzymu CBS byla studována v oocytech myši, kde její přítomnost nebyla prokázána. Enzym CBS je však exprimován v kumulárních buňkách. Předpokládá se role H₂S jako mediátoru mezi kumulárními buňkami a oocytem v průběhu zrání oocyty. Inhibice CBS a absence H₂S v kumulárních buňkách způsobuje zpomalení procesu zrání oocyty v podmínkách *in vitro*. Je zřejmé, že funkce CBS v procesu zrání oocyty spočívá v indukci GVBD (Liang *et al.*, 2007).

Možná úloha CBS v oocytech spočívá ve skutečnosti, že substrátem tohoto enzymu je homocystein, který je ve vyšších koncentracích toxický. CBS svojí funkcí potlačuje nežádoucí akumulaci homocysteinu (Liang *et al.*, 2007).

Existuje předpoklad, že úloha H₂S je během meiotického zrání oocytů uplatňována prostřednictvím regulace koncentrace cAMP. U oocytů žab *Xenopus laevis* bylo zjištěno, že fyziologická koncentrace H₂S zvyšuje koncentraci cAMP a tím ovlivňuje také aktivitu PKA (Kimura, 2000).

Sulfan reguluje tok iontů přes cytoplazmatickou membránu oocytů *Xenopus laevis*. S otevřením iontových kanálů, tokem iontů a změnou membránového potenciálu je spojen N-metyl-D-aspartátový receptor, NMDA receptor (Kelso *et al.*, 1992). Produkce endogenního H₂S dokáže ovlivňovat přítomnost tohoto receptoru v cytoplazmatické membráně oocytu *Xenopus laevis*. Bylo zjištěno, že donor sulfanu NaHS zvyšuje senzitivitu NMDA receptorů k ligandům. Existuje předpoklad, že regulace NMDA receptorů prostřednictvím H₂S probíhá prostřednictvím koncentrace cAMP (Kimura, 2000) a PKC (Kelso *et al.*, 1992).

Efekt H₂S jako signální molekuly studovaný na somatických buňkách lze očekávat také v oocytech savců. Tím lze zčásti vysvětlit účinek H₂S na meiotické zrání prasečích oocytů.

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

K experimentu byly použity prasečí oocyty. Byly získány na jatkách z ovárií prepubertálních prasnic neznámého věku. Vaječníky byly do laboratoře dovezeny do 2 hod. po odběru ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) při teplotě 39° C.

Kultivace oocytů

Oocyty byly získány aspirací ovariálních folikulů pomocí jehly a injekční stříkačky. Pro aspiraci byly vybírány folikuly o průměru 2 až 5 mm. Následně byly pod binolupou ze získané folikulární tekutiny selektovány oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

Komplexy oocytů a kumulárních buněk byly kultivovány do metafáze 2. meiotického dělení (MII) 48 hod. Pro kultivaci bylo použito modifikované kultivační médium M199.

Kultivace probíhala ve sterilních 4-důlkových miskách v podmínkách řízené atmosféry s 5 % CO₂ při teplotě 39 °C.

Tabulka 3.1. Složení kultivačního média

10x koncentrované médium M199¹	8 ml
Roztok NaHCO₃	3,9 ml
Laktát vápenatý	60,0 g
Pyruvát sodný	25,0 mg
HEPES	150,0 mg
Gentamicin	2,5 mg

¹Life Technologies, Skotsko

Médium bylo rozpuštěno v 50 – 100 ml destilované vody a přefiltrováno do 100 ml skleněné baňky. Na 20 ml připraveného kultivačního média se přidalo 200 mg růstových proteinů. Médium bylo před použitím vytemperováno a vysyceno CO₂ minimálně po dobu 30 minut v termoboxu se stabilními podmínkami (39° C se směsí 5 % CO₂ a vzduchu).

Do 1 ml kultivačního média bylo krátce před použitím přidáno 0,03 ml gonadotropních hormonů PG600.

Fixace a barvení oocytů

Po 48 hod. kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk opakovaným protahováním tenkostěnnou pipetou. Oocyty byly fixovány v roztoku ethanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu min. 24 hodin. Následovalo barvení chromatinu orceinem.

Tabulka 3.2. Příprava roztoku orceinu pro barvení oocytů.

Orcein²	2,0 g
Citrát sodný	1,0 g
Kyselina octová 50 %	100 ml

²Sigma Aldrich, USA

Hodnocení fáze zrání probíhalo pomocí světelného mikroskopu (Nikon) s fázovým kontrastem při zvětšení 400x.

Meiotické zrání oocytů bylo kontrolováno a do výsledků byly zahrnuty pouze experimenty,

u kterých dosáhla kontrolní skupina v minimálně 85 % případů fáze MII.

Prodloužená kultivace, kultivace embryí

Pro stanovení vlivu donoru H₂S na míru aktivace prasečích oocytů byly použity zralé oocyty ve fázi MII zbavené kumulárních buněk. Oocyty byly vystaveny podmínkám prodloužené kultivace 24 hod. za stejných podmínek jako *in vitro* zrání. Do kultivačního média byl přidán donor sulfanu Na₂S (0,5 a 1 mM). Oocyty kontrolní skupiny byly kultivovány v médiu bez donoru sulfanu Na₂S. Oocyty byly následně aktivovány 25 μM kalcium-ionoforem A23187 a 2 mM 6-dimethyl aminopurinem (Jílek et al., 2001). Po aktivaci byly oocyty kultivovány v médiu NCSU23 (Sigma-Aldrich, USA) 24 hod. Oocyty byly následně fixovány roztokem ethanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu min. 24 hodin a barveny orceinem. Byl hodnocen podíl aktivovaných oocytů dle přítomnosti prvojader.

Pro hodnocení vlivu donoru H₂S na časný embryonální vývoj byly prasečí oocyty aktivovány 25 μM kalcium-ionoforem A23187 a 2 mM 6-dimethyl aminopurinem (Jílek et al., 2001). Následně byly oocyty kultivovány v médiu NCSU23 (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 7 dní. Po 2 dnech kultivace byl vizuálně pod binolupou hodnocen podíl oocytů po aktivaci, které se začaly rýhovat. Po 7 dnech kultivace byly partenogenetická embrya fixována roztokem ethanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu min. 24 hodin a barveny orceinem. Bylo hodnoceno stádium časného embryonálního vývoje; byla rozlišována 3 stádia raného embryonálního vývoje: rýhování, morula, blastocysta.

3.2 Metodika

Intracelulární lokalizace CBS, CTH, MPST

Pro intracelulární lokalizaci enzymů uvolňujících endogenně H₂S cystathionin β-syntázy (CBS), cystathionin γ-lyázy (CSE) a 3-mercaptopyruvát sulfotransferázy (MPST) byly použity prasečí oocyty oocyty ve stádiu GV a prasečí oocyty kultivované 24 a 48 hod. v podmínkách *in vitro*.

U oocytů byla odstraněna *zona pellucida* v kultivačním médiu s přídavkem 0,2 % pronázy po době působení cca 10 min. Po odstranění *zony pellucidy* byly oocyty oplachovány v kapce roztoku PBS + BSA po dobu cca 2 min. při laboratorní teplotě. Opláchnuté oocyty byly fixovány 2,5 % paraformaldehydem v PBS po dobu 60 min. při laboratorní teplotě.

Po fixaci následovala permeabilizace membrány oocytů v roztoku PBS + Triton X-100 + BSA. Permeabilizace trvala po dobu min. 2 hod. při laboratorní teplotě. Roztok byl vyměněn celkem 2x: po 5 min. a po 1 hod. Krátký oplach oocytů po dobu cca 1 min. byl 3x opakován v roztoku PBS + Tweenu 20.

Oocyty byly následně inkubovány s primární protilátkou v PBS + Tween20 + BSA (ředění protilátky 1:100) přes noc při teplotě 4 °C ve vlhkém prostředí. Pro lokalizaci CBS/CTH/MPST bylo použito příslušných primárních protilátek králičí anti-CBS/anti-CTH/anti-MPST (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:100. Po inkubaci byly oocyty proplachovány v roztoku PBS + Tween20 celkem 3x po 10 min. při laboratorní teplotě.

Po oplachu následovala inkubace v 500 µl sekundární protilátky konjugované s fluorescein-isothiokyanátem (FITC) po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě. Jako sekundární protilátky byla použity anti-rabbit IgG-FITC (Santa-Cruz Biotech., USA) nebo anti-mouse IgG-FITC (Santa-Cruz Biotech., USA) v ředění 1:100. Oocyty byly poté oplachovány v roztoku PBS + Tween20 celkem 3x po 10 min. při laboratorní teplotě. Oocyty byly znovu opláchnuty v PBS + BSA po dobu 10 min. při laboratorní teplotě.

U oocytů byl barven chromatin Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, USA). Roztok byl připraven z 1 ml PBS + BSA a 10 µl Hoechst (5 mg Hoechst/1 ml vody). Barveno 10 min. při laboratorní teplotě.

Následovalo opláchnutí ve 3 kapkách ekvilibračního pufru po dobu cca 1 min. Obarvené a opláchnuté oocyty byly následně montovány na podložní sklíčko do montovacího média s glycerolem (Antifade kit; Life Technologies, Skotsko). Do hodnocení byly montované oocyty uchovávány při teplotě 4 °C.

Oocyty byly hodnoceny konfokálním mikroskopem Leica TCS SPE (FITC při 520 nm; Hoechst při 410 nm). V oocytech byla intenzita signálu a distribuce enzymů měřena pomocí analýzy obrazu NIS Elements 3.0.

Tabulka 3.3. Příprava použitých roztoků.

PBS + BSA	1 ml PBS + 20 μ l 5 % BSA
PBS + BSA + Triton X-100	1 ml PBS + 20 μ l 5 % BSA + 50 μ l 10 % Triton X-100
PBS + Tween 20	1ml PBS + 10 μ l 10 % Tween 20
PBS + Tween 20 + BSA	1ml PBS + 10 μ l 10 % Tween 20+ 20 μ l 15 % BSA

PBS – phosphate buffered saline

BSA – bovine serum albumin

Tabulka 3.4. Zásobní roztok 2,5% paraformaldehydu v PBS.

Paraformaldehyd	0,5 g
H₂O redestilovaná	10 ml

Za stálého míchání přikápnuty 3 kapky 1M NaOH;
získaný 5% roztok paraformaldehydu po ochlazení smícháme s PBS 1 : 1.

Tabulka 3.5. Zásobní roztok 5% roztoku BSA.

BSA	1 g
H₂O redestilovaná	20 ml

BSA – bovine serum albumin

Tabulka 3.6. Zásobní roztok PBS + BSA.

PBS	1 ml
5 % BSA	20 μ l

Tabulka 3.7. Zásobní roztok PBS + BSA + Triton X-100.

PBS	1 ml
5 % BSA	20 μ l
10 % Triton X-100	50 μ l

PBS – phosphate buffered saline

BSA – bovine serum albumin

Tabulka 3.8. Zásobní roztok PBS + Tween 20.

PBS	1 ml
10 % Tween 20	10 μ l

PBS – phosphate buffered saline

Tabulka 3.9. Zásobní roztok PBS + Tween 20 + BSA.

PBS	1 ml
10 % Tween 20	10 μ l
5 % BSA	20 μ l

PBS – phosphate buffered saline

Aktivace oocytů a hodnocení vývojové kompetence

Oocyty zbavené kumulárních buněk byly aktivovány pomocí kalcia ionoforu A23187 (25 μ M) po dobu 5 min. a 6-dimethyl aminopurinu (2 mM) po dobu 2 hod. (Jílek et al., 2001). Poté byly oocyty dále kultivovány v médiu NCSU23 (Sigma-Aldrich, USA) 24 hod. a 7 dní.

Pro hodnocení aktivace oocytů po 24 hod. a embryonálního vývoje partenogenetických embryí po 7 dnech kultivace byly fixovány roztokem ethanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu min. 24 hodin a barveny orceinem. Hodnocen byl podíl aktivovaných oocytů podle přítomnosti prvojadér a množství buněk v partenogenetických embryích pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon).

Stanovení intenzity signálu a zpracování výsledků

V oocytech byla měřena absolutní intenzita signálu CBS/CTH/MPST v oocytech, v oblasti jádra, korové oblasti a cytoplazmy. Intenzita signálu v oocytech byla vyjádřena jako průměrná intenzita signálu v oblasti jádra, korové oblasti a cytoplazmy. Jako oblast jádra byla v oocytech ve stádiu GV proměřena oblast zárodečného váčku (GV), v oocytech po 24 a 48 hod. byla měřena intenzita signálu v oblasti dělicího vřeténka. Korová oblast zahrnovala bezprostřední okolí intracelulární strany cytoplazmatické membrány oocytu. Intenzita signálu CBS/CTH/MPST po 24 a 48 hod. kultivace byla vyjádřena relativně poměrem absolutních hodnot signálu v těchto oocytech a absolutní intenzity signálu v oocytech ve stádiu GV.

Pro statistické zpracování rozdílů v intenzitě signálu CBS/CTH/MPST v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace bylo použito programu Microsoft Excel. Rozdíly v měření byly statisticky testovány dvouvýběrovým t-testem pro soubory s $\delta^2_1 > \delta^2_2$ na hladině významnosti $\alpha < 0,05$ a $\alpha < 0,01$.

Statistické zpracování rozdílů aktivovaných oocytů po ošetření donorem H₂S bylo provedeno v programu SAS 9.0. Rozdíly byly testovány neparametrickým F-testem na hladině významnosti $\alpha < 0,05$ a $\alpha < 0,01$.

3.3 Schéma experimentu

Distribuce CBS/CTH/MPST v prasečích oocytech během meiotického zrání *in vitro*

Část aspirovaných prasečích oocytů byla ihned zbavena *zony pellucidy* a podrobena metodě intracelulární lokalizace CBS/CTH/MPST. Zbylé oocyty byly kultivovány 24 a 48 hod.

Po uplynulé době kultivace byly oocyty zbaveny *zony pellucidy* a podrobeny metodě intracelulární lokalizace CBS/CTH/MPST. V každé experimentální skupině bylo vždy 10 oocytů.

Vliv donoru H₂S na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů

Oocyty dozralé v podmínkách *in vitro* byly vystaveny prodloužené kultivaci 24 hod. za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S v koncentraci 0,5 a 1 mM a následně partenogeneticky aktivovány pomocí kalcia-ionoforu a 6-dimethyl aminopurinu. Kontrolní skupinou byly oocyty po 24 hod. kultivované bez donoru H₂S a partenogeneticky aktivované. Druhou kontrolní skupinou byly oocyty aktivované ihned po dosažení MII. V každé experimentální skupině bylo vždy 10 oocytů. Experiment byl zopakován 3x. Byl hodnocen podíl aktivovaných oocytů v jednotlivých experimentálních skupinách.

Další oocyty vystavené prodloužené kultivaci 24 hod. za přítomnosti donoru sulfanu 0,5 mM Na₂S byly partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem a 6-dimethyl aminopurinem a dále kultivovány 7 dní. Kontrolní skupinou byly oocyty po 24 hod. kultivované bez donoru H₂S a partenogeneticky aktivované. Druhou kontrolní skupinou byly oocyty aktivované ihned po dosažení MII. V každé experimentální skupině bylo vždy 10 oocytů. Experiment byl zopakován 3x. Byl hodnocen podíl rýhujících se oocytů po 2 dnech kultivace a podíl dvoubuněčných embryí, stádia moruly a blastocysty po 7 dnech kultivace prasečích embryí.

4. Hypotézy a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že enzymy uvolňující sulfan, cystathionin β -syntáza (CBS), cystathionin γ -lyáza (CSE) a 3-mercaptopyruvát-sulfotransferáza (MPST), jsou přítomné v prasečích oocytech během meiotického zrání *in vitro* a že sulfan příznivě ovlivňuje průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů, čímž zlepšuje poměr partenogeneticky aktivovaných oocytů a vývojovou kompetenci těchto oocytů.

Cílem bylo lokalizovat enzymy CBS, CSE a MPST v prasečích oocytech ve stádiu GV, po 24 a 48 hod. kultivace a analyzovat změny distribuce těchto enzymů v oocytech během meiotického zrání *in vitro*.

Dalším cílem bylo zhodnotit poměr partenogeneticky aktivovaných oocytů a vývojovou kompetenci těchto oocytů vystavených prodloužené kultivaci v přítomnosti donoru H_2S ve srovnání s oocyty kultivovanými bez donoru H_2S .

5. Výsledky

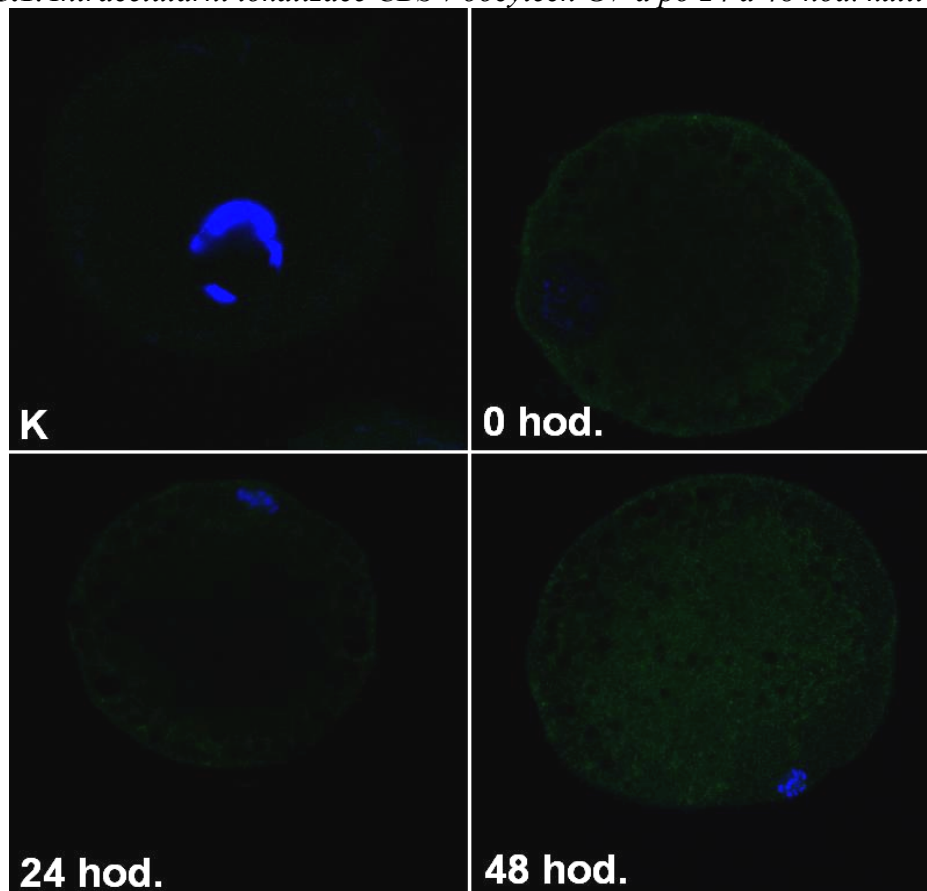
5.1 Distribuce enzymů CBS, CSE a MPST během meiotického zrání prasečích oocytů

Byla provedena intracelulární lokalizace enzymů endogenně uvolňujících sulfan, cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin γ -lyázy (CSE) a 3-mercaptopyruvát sulfotransferázy (MPST), v prasečích oocytech GV a oocytech kultivovaných 24 a 48 hod. v podmínkách *in vitro*. Na základě absolutní a relativní intenzity signálu byla hodnocena aktivita těchto enzymů v průběhu meiotického zrání *in vitro*.

Cystathionin β -syntáza (CBS)

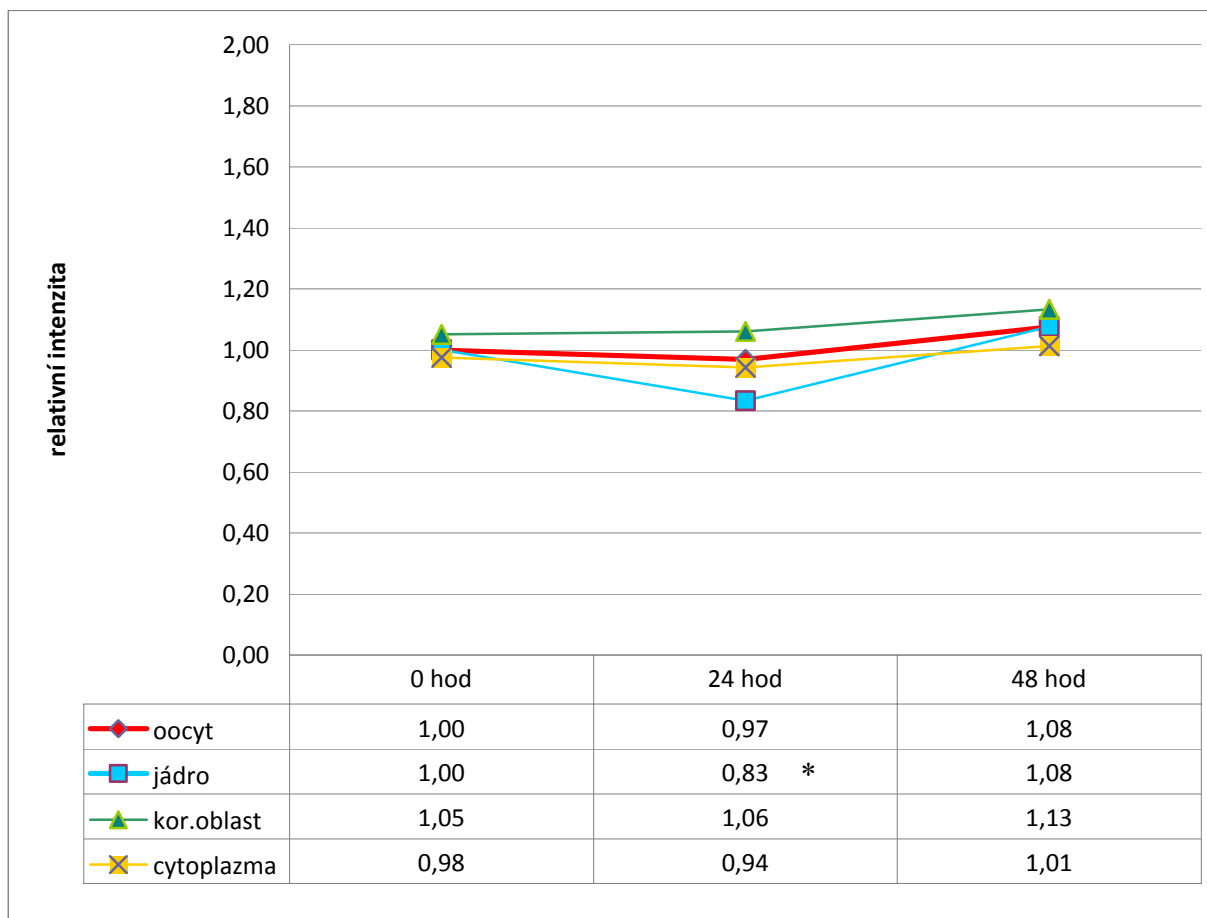
V případě CBS byla intracelulární distribuce v prasečích oocytech v průběhu zrání téměř neměnná. Nejnižší intenzita CBS během zrání byla sledována v oblasti chromatinu po 24 hod. kultivace *in vitro* (Obrázek 5.1, Graf 5.2).

Obrázek 5.1. Intracelulární lokalizace CBS v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



K – kontrolní oocyt, který nebyl kultivován *in vitro*, inkubovaný pouze se sekundární protilátkou anti-rabbit; 0 hod. – oocyt GV, který nebyl kultivován *in vitro*; 24 hod. – oocyt po 24 hod. kultivace *in vitro*; 48 hod. – oocyt po 48 hod. kultivace *in vitro*. Oocyty byly inkubovány s králičí anti-CBS a anti-králičí protilátkou konjugovanou s FITC (zelená). Chromatin byl vizualizován Hoechst 33258 (modrá). Zvětšení 400x.

Graf 5.1. Relativní intenzita aktivity enzymu CBS v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



Relativní intenzita signálu je vyjádřena podílem intenzity signálu v oocytu GV.

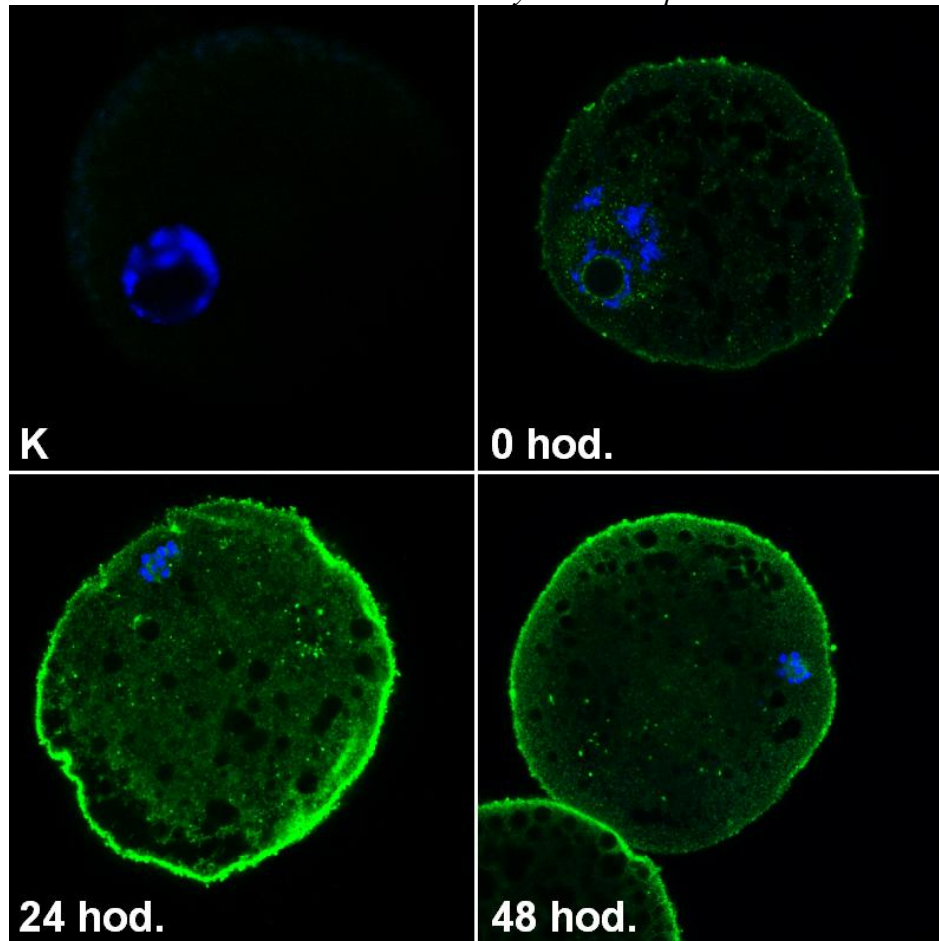
0 hod - stádium GV oocytu; 24 hod - stádium MI oocytu; 48 hod - stádium MII oocytu. Oocyt – průměr signálů jádra, korové oblasti a cytoplazmy.

* - statisticky významný rozdíl vztážený k intenzitě signálu v oocytu ve stádiu GV, $\alpha < 0,05$ %.

Cystathionin γ -lyáza (CSE)

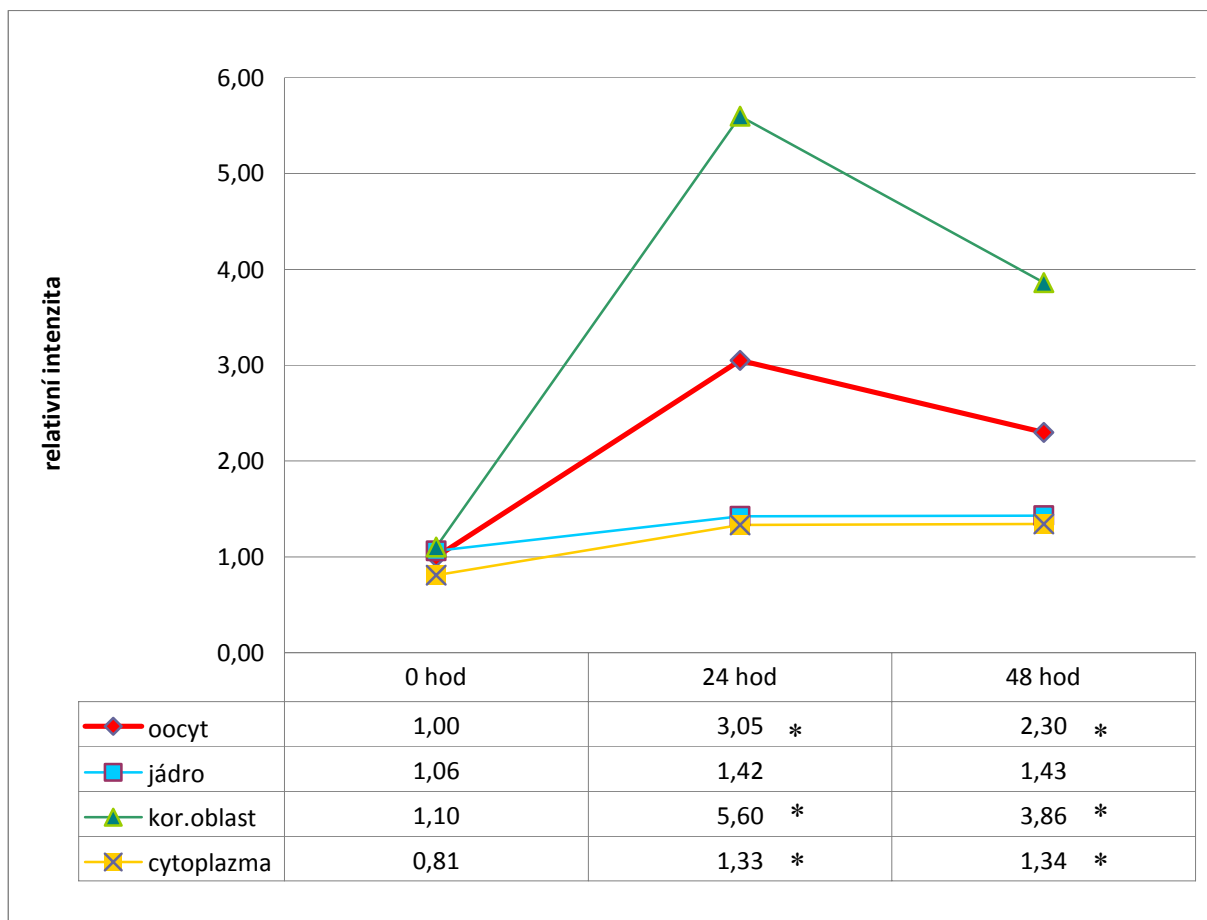
U enzymu CSE byla nejvyšší intenzita signálu v korové oblasti oocytu (Obrázek 5.2). Intenzita v korové oblasti prudce stoupala po 24 hod. kultivace, následně mírně klesala (Graf 5.2). Rozdíly byly na hladině významnosti $\alpha < 0,05$ statisticky významné.

Obrázek 5.2. Intracelulární lokalizace CSE v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



K – kontrolní oocyt, který nebyl kultivován *in vitro*, inkubovaný pouze se sekundární protilátkou anti-rabbit; 0 hod. – oocyt GV, který nebyl kultivován *in vitro*; 24 hod. – oocyt po 24 hod. kultivace *in vitro*; 48 hod. – oocyt po 48 hod. kultivace *in vitro*. Oocyty byly inkubovány s králičí anti-CTH a anti-myší protilátkou konjugovanou s FITC (zelená). Chromatin byl vizualizován Hoechst 33258 (modrá). Zvětšení 400x.

Graf 5.2. Relativní intenzita aktivity enzymu CSE v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



Relativní intenzita signálu je vyjádřena podílem intenzity signálu v oocytu GV.

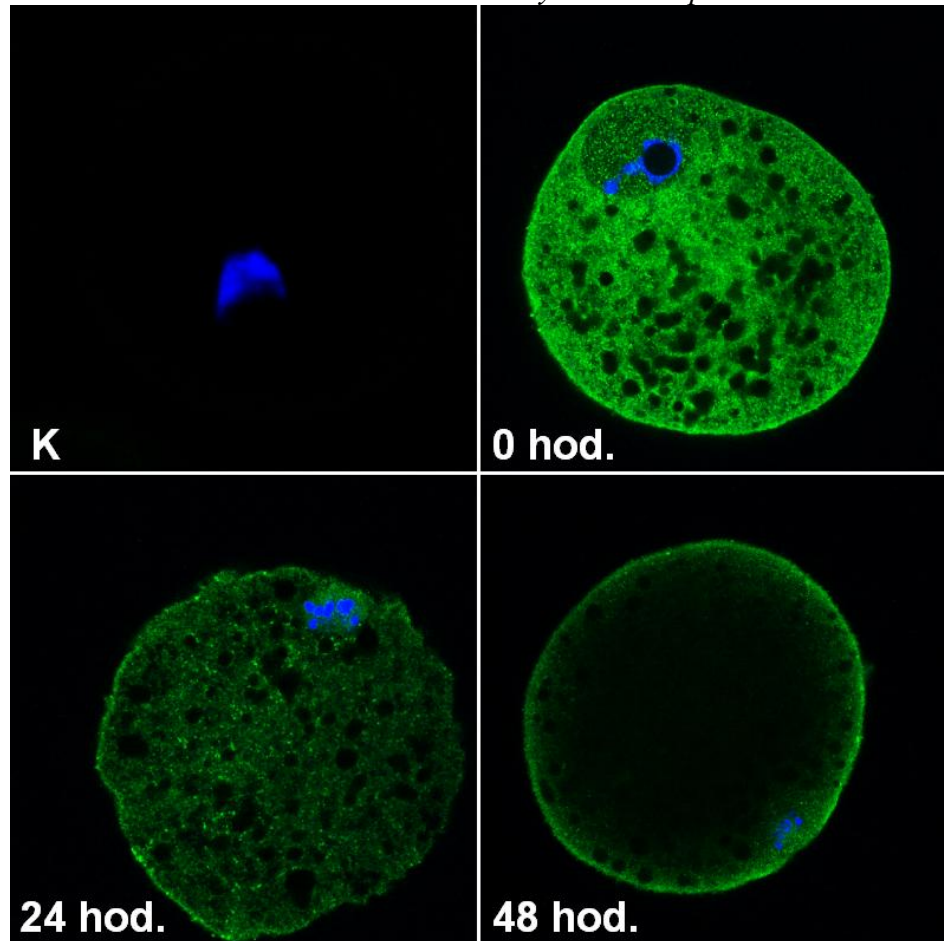
0 hod - stádium GV oocytu; 24 hod - stádium MI oocytu; 48 hod - stádium MII oocytu. Oocyt – průměr signálů jádra, korové oblasti a cytoplazmy.

* - statisticky významný rozdíl vztážený k intenzitě signálu v oocytu ve stádiu GV, $\alpha < 0,05$ %.

3-mercaptopyruvát sulfotransferáza (MPST)

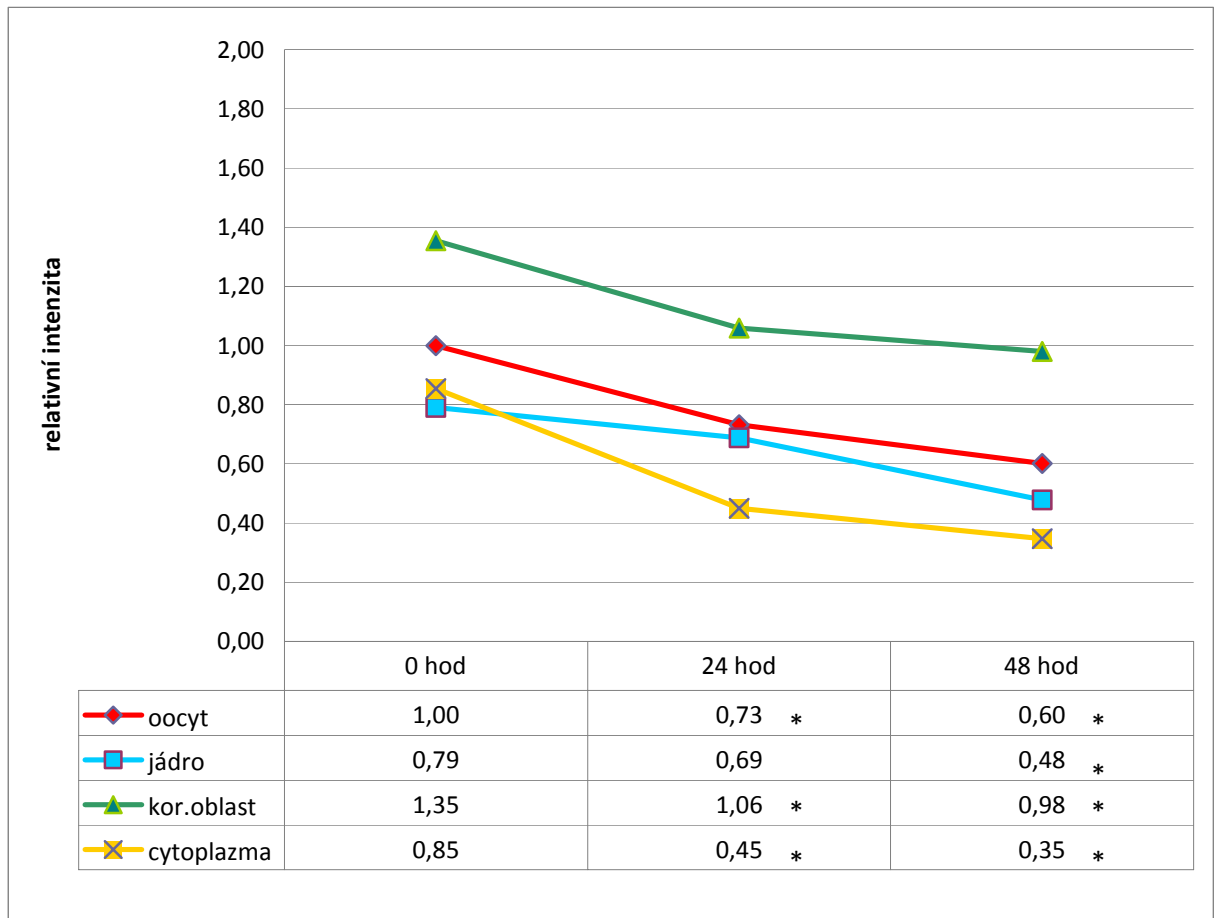
Enzym MPST vykazoval v oocytu i v jednotlivých strukturách oocytu sestupnou tendenci v intenzitě signálu. Nejvyšší hodnota signálu byla v korové oblasti oocytu, naopak nejnižší intenzita signálu byla v oblasti jádra oocytu (Obrázek 5.3, Graf 5.3). Rozdíly v intenzitě signálu MPST v korové oblasti byly na hladině významnosti $\alpha < 0,05$ statisticky průkazné.

Obrázek 5.3. Intracelulární lokalizace MPST v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



K – kontrolní oocyt, který nebyl kultivován *in vitro*, inkubovaný pouze se sekundární protilátkou anti-rabbit; 0 hod. – oocyt GV, který nebyl kultivován *in vitro*; 24 hod. – oocyt po 24 hod. kultivace *in vitro*; 48 hod. – oocyt po 48 hod. kultivace *in vitro*. Oocyty byly inkubovány s králičí anti-MPST a anti-králičí protilátkou konjugovanou s FITC (zelená). Chromatin byl vizualizován Hoechst 33258 (modrá). Zvětšení 400x.

Graf 5.3. Relativní intenzita aktivity enzymu MPST v oocytech GV a po 24 a 48 hod. kultivace



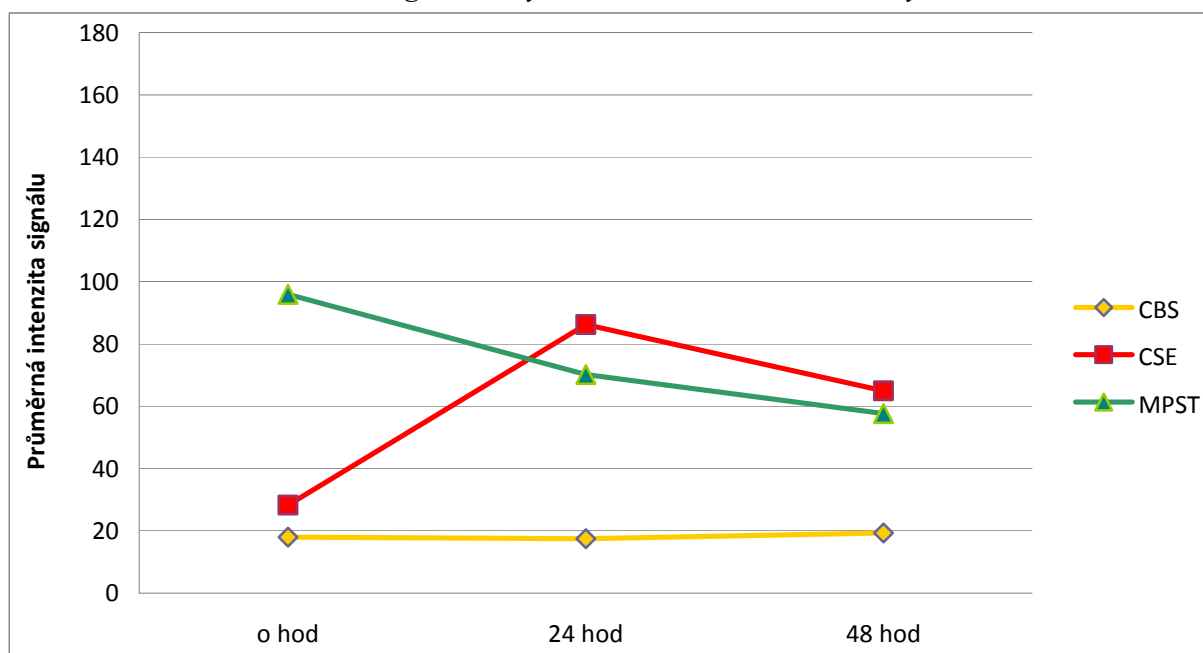
Relativní intenzita signálu je vyjádřena podílem intenzity signálu v oocytu GV.

0 hod - stádium GV oocytu; 24 hod - stádium MI oocytu; 48 hod - stádium MII oocytu. Oocyt – průměr signálů jádra, korové oblasti a cytoplazmy.

* - statisticky významný rozdíl vztážený k intenzitě signálu v oocytu ve stádiu GV, $\alpha < 0,05$ %.

Pro ilustraci byla porovnána průměrná intenzita signálu enzymů CBS, CSE a MPST. Průměrná intenzita signálu CBS v oocytech byla oproti CSE a MPST na nejnižší úrovni a v průběhu meiotického zrání se statisticky významně nelišila. Intenzita signálu enzymu CSE byla ve stádiu GV na nízké úrovni a po 24 hod. kultivace dosáhl statisticky významně nejvyšší intenzity v porovnání s CBS a MPST. V oocytech GV byl nejméně intenzivní signál enzymu MPST, rozdíl je statisticky průkazný. Intenzita signálu MPST statisticky významně poklesla po 24 hod. kultivace. V oocytech po 24 a 48 hod. kultivace byla průměrná intenzita signálu CSE a MPST v oocytu na podobné úrovni (Graf.5.4., Tab. 5.1. a 5.2.). Nejvyšší intenzitu vykazovaly sledované enzymy shodně v korové oblasti, v oblasti dělicího vřeténka a cytoplazmy nedocházelo k výrazným změnám v intenzitě signálu sledovaných enzymů během zrání oocytů.

Graf 5.4. Průměrná intenzita signálu enzymů CBS, CSE a MPST v oocytu



Průměrná intenzita signálu je vyjádřena v absolutních hodnotách.

0 hod - stádium GV oocytu; 24 hod. – oocyty kultivované 24 hod.; 48 hod. – oocyty kultivované 48 hod.

* - statisticky významný rozdíl vztážený k intenzitě signálu v oocytu ve stádiu GV, $\alpha < 0,05$ %.

Tabulka 5.1. Statisticky významné rozdíly mezi intenzitou signálu CBS, CTH a MPST během kultivace prasečích oocytů in vitro

	0 hod.		24 hod.		48 hod.	
	CSE	MPST	CSE	MPST	CSE	MPST
CBS	**	**	**	**	**	**
CSE	-	**	-	0	-	0

* - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,05$ %; ** - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,01$ %.

Tabulka 5.2. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými fázemi kultivace prasečích oocytů in vitro pro CBS, CSE a MPST

	CBS		CSE		MPST	
	24 hod.	48 hod.	24 hod.	48 hod.	24 hod.	48 hod.
0 hod.	0	0	**	**	*	**
24 hod.	-	0	-	**	-	0

* - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,05$ %; ** - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,01$ %.

5.2 Vliv donoru H₂S na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů

Vliv Na₂S na schopnost partenogenetické aktivace

Byla sledována schopnost aktivace prasečích oocytů po ošetření calcium-ionoforem A23187 a 6-dimethyl aminopurinem po 24 hod. prodloužené kultivace s donorem sulfanu Na₂S v koncentraci 0,5 a 1 mM. Prodloužená kultivace prasečích oocytů 24 hod. statisticky významně snižovala podíl oocytů schopných aktivace v porovnání s oocyty aktivovanými ihned po dosažení stádia MII. Přítomnost donoru H₂S v koncentraci 0,5 mM na schopnost oocytů aktivovat měla v porovnání s oocyty kultivovaných bez donoru vliv, ten ale nebyl statisticky významný. Oocyty kultivované s 1 mM Na₂S měly statisticky významně nižší schopnost partenogeneticky aktivovat (Tabulka 5.3 a 5.4, Graf 5.5).

Tabulka. 5.3. Vliv donoru Na₂S na relativní podíl aktivovaných oocytů (průměr ± SD)

	podíl aktivovaných oocytů (%) ± SD
MI	94,17 ± 5,20
24 hod. bez Na₂S	79,17 ± 3,82
24 hod. 0,5 mM Na₂S	68,33 ± 3,82
24 hod. 1 mM Na₂S	42,50 ± 5,00

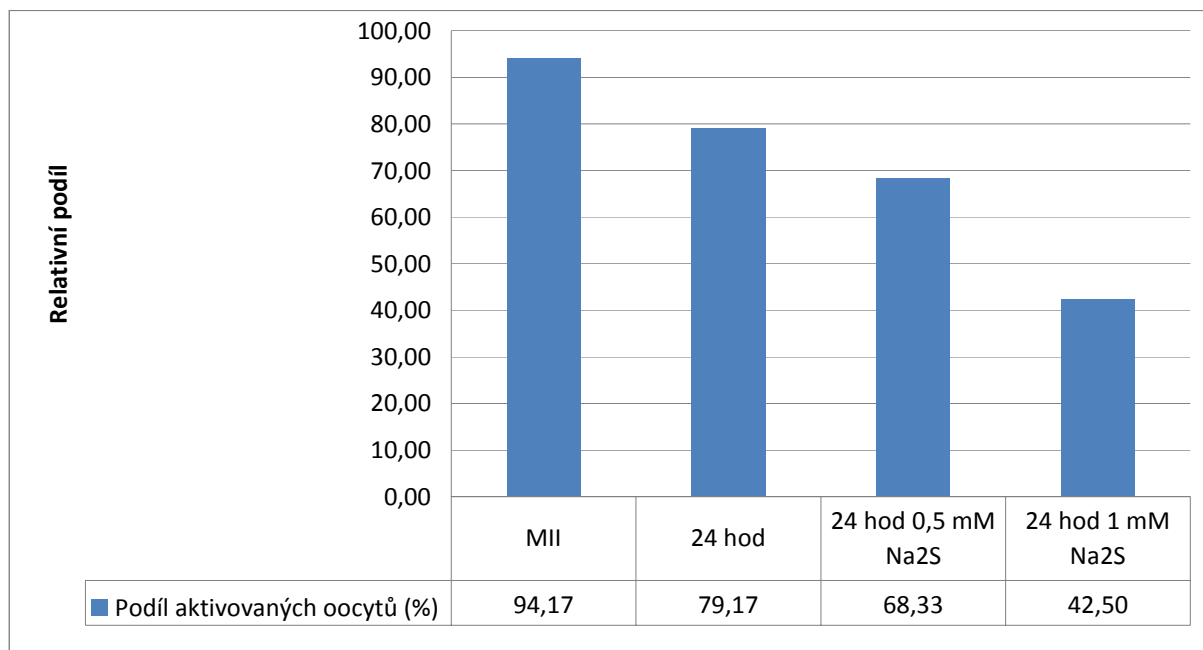
MI – oocyty uměle aktivované bez prodloužené kultivace 24 hod.; 24 hod – oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci bez donoru sulfanu; 24 hod 0,5 mM Na₂S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S v koncentraci 0,5 mM; 24 hod. 1 mM Na₂S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S v koncentraci 1 mM. SD – směrodatná odchylka.

Tab. 5.4. Statistické rozdíly v podílu aktivovaných oocytů mezi experimentálními skupinami oocytů

	24 hod bez Na ₂ S	24 hod 0,5 mM Na ₂ S	24 hod 1 mM Na ₂ S
MI	**	**	**
24 hod bez Na₂S	-	0	**

* - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,05$ %; ** - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,01$ %.

Graf 5.5. Vliv donoru Na_2S na relativní podíl aktivovaných oocytů



MII – oocyty uměle aktivované bez prodloužené kultivace 24 hod.; 24 hod. – oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci bez donoru sulfanu; 24 hod 0,5 mM Na_2S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na_2S v koncentraci 0,5 mM; 24 hod. 1 mM Na_2S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na_2S v koncentraci 1 mM.

Vliv Na_2S na časný vývoj prasečích embryí

Byl sledován vliv donoru sulfanu Na_2S na časný embryonální vývoj po partenogenetické aktivaci prasečích oocytů. Oocyty, které byly podrobeny prodloužené kultivaci 24 hod. s 0,5 mM Na_2S , dosáhly signifikantně vyššího podílu dvoubuněčných embryí 2 dny po aktivaci, morul i blastocyst 7 dní po aktivaci, oproti skupině oocytů vystavené 24 hod. prodloužené kultivace bez donoru sulfanu. Prodloužená kultivace s donorem sulfanu i bez donoru signifikantně snižovala podíl dvoubuněčných embryí, stádia moruly i blastocysty (Tabulka 5.5 a 5.6, Graf 5.6 a 5.7).

Tabulka 5.5. Vliv donoru Na_2S na relativní podíl vývojových stádií časného embryonálního vývoje po aktivaci prasečích oocytů (průměr \pm SD)

	Dělení po 2 dnech (%)	Morula (%)	Blastocysta (%)
MII	76,67 \pm 3,82	26,67 \pm 2,89	24,17 \pm 1,44
24 hod bez Na_2S	41,67 \pm 2,89	8,33 \pm 1,44	1,67 \pm 1,44
24 hod 0,5 mM Na_2S	54,17 \pm 3,82	20,83 \pm 3,82	15,83 \pm 2,89

MII – oocyty uměle aktivované bez prodloužené kultivace 24 hod.; 24 hod – oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci bez donoru sulfanu; 24 hod 0,5 mM Na_2S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na_2S v koncentraci 0,5 mM.

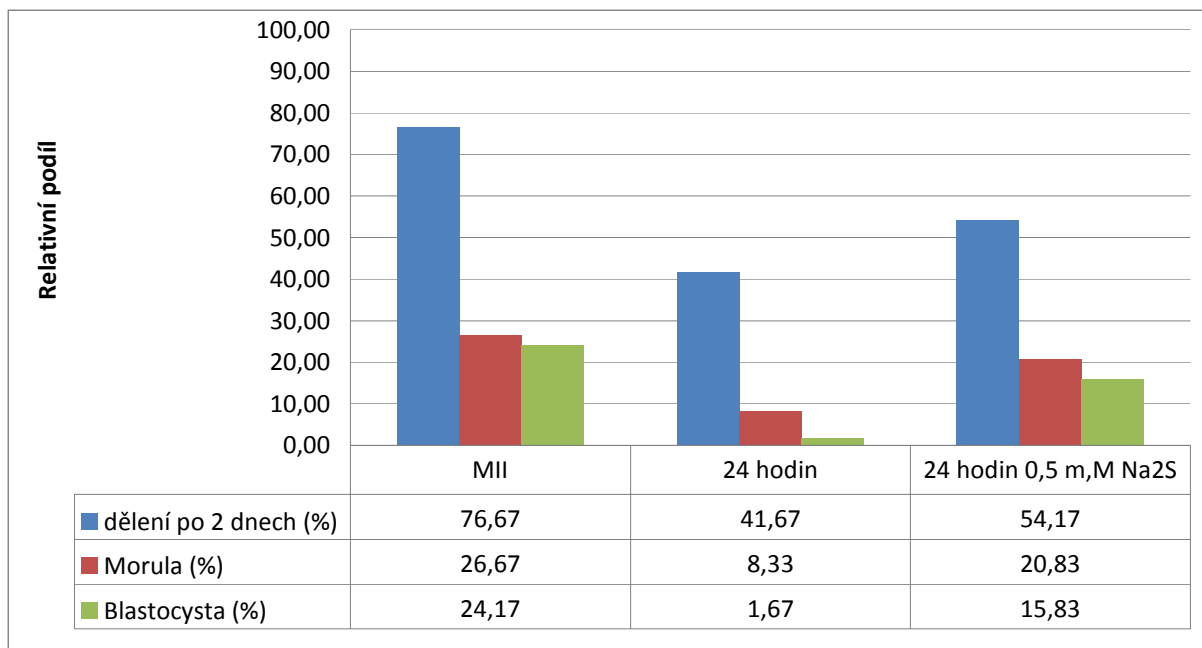
Dělení po 2 dnech (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia dvoubuněčného embrya 2 dny po aktivaci; Morula (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia moruly 7 dní po aktivaci; Blastocysta (%) – podíl oocytů, které dosáhly stádia blastocysty 7 dní po aktivaci.

Tab. 5.6. Statistické rozdíly v četnosti časného embryonálního vývoje po umělé aktivaci mezi skupinami

	24 hod bez Na ₂ S	24 hod 0,5 mM Na ₂ S
MII	**	0
24 hod bez Na ₂ S	-	**

* - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,05$ %; ** - statisticky významný rozdíl, $\alpha < 0,01$ %.

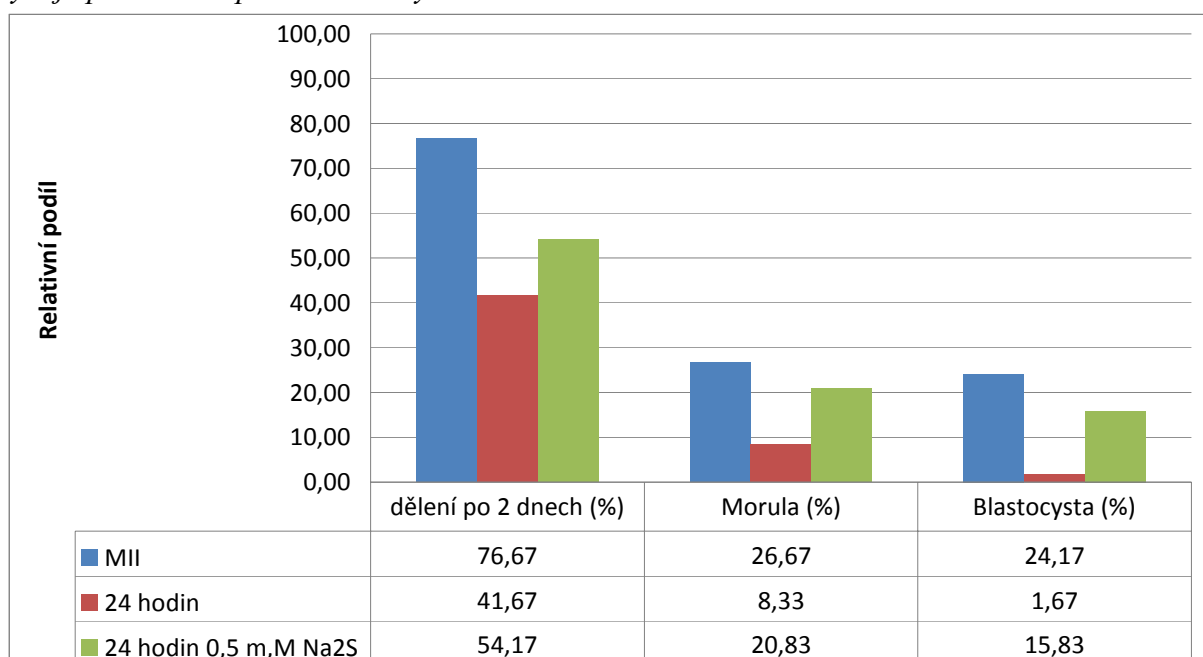
Graf 5.6. Vliv donoru Na₂S na relativní podíl vývojových stádií časného embryonálního vývoje po aktivaci prasečích oocytů



MII – oocyty uměle aktivované bez prodloužené kultivace 24 hod.; 24 hod. – oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci bez donoru sulfanu; 24 hod 0,5 mM Na₂S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na₂S v koncentraci 0,5 mM.

Dělení po 2 dnech (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia dvoubuněčného embrya 2 dny po aktivaci; Morula (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia moruly 7 dní po aktivaci; Blastocysta (%) – podíl oocytů, které dosáhly stádia blastocysty 7 dní po aktivaci.

Graf 5.7. Vliv donoru Na_2S na relativní podíl vývojových stádií časného embryonálního vývoje po aktivaci prasečích oocytů



MII – oocyty uměle aktivované bez prodloužené kultivace 24 hod.; 24 hod – oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci bez donoru sulfanu; 24 hod. 0,5 mM Na_2S - oocyty uměle aktivované po 24 hod. prodloužené kultivaci s donorem sulfanu Na_2S v koncentraci 0,5 mM.

Dělení po 2 dnech (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia dvoubuněčného embrya 2 dny po aktivaci; Morula (%) – podíl aktivovaných oocytů, které dosáhly stádia moruly 7 dní po aktivaci; Blastocysta (%) – podíl oocytů, které dosáhly stádia blastocysty 7 dní po aktivaci.

5. Diskuze

V procesu zrání a následného embryonálního vývoje prasečích oocytů se uplatňuje řada signálních molekul, nejčastěji protein-kináz, jako MPF, MAPK nebo CSF (Stojkovic *et al.*, 1999; Alberio, 2001; Su *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2007). V nedávné době byl však prokázán fyziologický potenciál také některých plyných molekul, tzv. gasotransmiterů, v různých živočišných tkáních (Wang, 2003). V současné době studovanými gasotransmitery jsou oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S). Zatímco úlohou NO v oocyty se zabývaly předešlé práce (Mitchell *et al.*, 2004; Petr *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2005; Chmelíková *et al.*, 2010), význam CO a H₂S v oocytech savců je dosud neobjasněn. Na základě již publikovaných výsledků (Zhao *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2006; Calvert *et al.*, 2010) existuje předpoklad, že sulfan ovlivňuje nejen meiotické zrání prasečích oocytů, ale také následný embryonální vývoj aktivovaných oocytů.

Našimi experimenty byla v prasečích oocytech GV, po 24 a 48 hod. *in vitro* zrání prokázána přítomnost enzymů uvolňující endogenní sulfan, cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin γ -lyázy (CSE) a 3-mercaptopyruvát-sulfotransferázy (MPST). Tyto enzymy byly zjištěny také v buňkách jater a ledvin myši (Wang, 2002), kardiovaskulárního systému včetně hladkosvalových buněk arterií (Zhao *et al.*, 2008) a mozku potkanů (Lim *et al.*, 2008). Přítomnost CBS byla prokázána v granulózních a kumulárních buňkách myších folikulů (Liang *et al.*, 2007).

Z nízkých hodnot průměrné intenzity signálu enzymu CBS se lze domnívat, že množství CBS v prasečích oocytech je menší než v případě CSE a MPST. V oocytech myši však nebyla přítomnost CBS prokázána vůbec (Liang *et al.*, 2007). Pravděpodobně se CBS podílí na uvolňování H₂S v prasečích oocytech méně než enzymy CSE a MPST.

Protože jsme zjistili přítomnost enzymů CBS, CSE a MPST v oblasti zárodečného vaku v oocytech GV, lze předpokládat význam těchto enzymů pro GVBD. Také inhibice CBS v kumulárních buňkách potlačuje meiotické zrání myších oocytů (Liang *et al.*, 2007).

Zatímco množství a rozdíly v lokalizaci CBS byly během meiotického zrání prasečích oocytů minimální, v intenzitě signálu CSE a MPST byly zaznamenány změny, zejména v korové části oocyty. Přestože intenzita signálu CSE během 24 hod. kultivace vzrostla, signál MPST během 24 hod. kultivace byl slabší. Po 24 a 48 hod. byla relativní intenzita signálu obou enzymů na podobné úrovni. Od přítomnosti enzymů v jednotlivých fázích meiotického zrání pak lze předpokládat také obdobnou produkci H₂S.

Výraznější změny v intenzitě signálu CSE a MPST v oocytech během meiotického zrání způsobují zejména změny v korové oblasti oocytů. V oblasti jádra a cytoplazmy nedocházelo k výrazným změnám v intenzitě signálu CSE a MPST. S velkým množstvím enzymů CSE a MPST v korové oblasti může souviset také množství endogenně uvolněného H₂S v oocytech.

Lokalizace enzymů v korové oblasti pravděpodobně souvisí s cílovými molekulami H₂S. Již dříve byl objasněn vliv H₂S na K_{ATP}-kanály (Zhao *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2008). K_{ATP}-kanály jsou přímými cíly H₂S, který tak nevyužije v této buněčné signalizaci druhé posly (Calvert *et al.*, 2010). Přítomnost K_{ATP}-kanálů byla prokázána v pohlavních buňkách nižších obratlovců (Wilbrand *et al.*, 1992; Honoré *et Lazdunski*, 1993), mRNA proteinů K_{ATP}-kanálů byla detekována také v oocytech prasete (Du *et al.*, 2010). Draslíkové kanály jsou vedle regulace membránového potenciálu zapojeny do řady biologických funkcí. V oocytech žab rodu *Xenopus* otevření K_{ATP}-kanálů reguluje citlivost k progesteronu a následné indukci meiotického zrání (Honoré *et Lazdunski*, 1993; Guillemare *et al.*, 1995; Saldana *et Vázquez-Cuevas*, 2004; Tammaro *et Ashcroft*, 2009; Wilbrand *et al.*, 1992).

U somatických buňek byl prokázán vliv H₂S na aktivitu PKC a tok některých iontů, jako je Ca²⁺ (Pan *et al.*, 2008). Protože se Ca²⁺ ionty a PKC významně podílí na regulaci meiotického zrání a časně embryogeneze (Sedmíková *et al.*, 2006; Petr *et al.*, 2007), stává ze H₂S signální molekula s velmi širokým spektrem účinku v oocytech.

Dalším způsobem, jak sulfan může regulovat meiotické zrání je koncentrace cAMP. Bylo zjištěno, že fyziologická koncentrace H₂S zvyšuje koncentraci cAMP v oocytu *Xenopus laevis* (Kimura, 2000). Od koncentrace cAMP, jako druhého posla, se odvíjí aktivita řady enzymů, mezi nimi protein-kinázy A, PKA (Alberts *et al.*, 1998; Campbell *et Reece*, 2008).

Předmětem dalších experimentů bylo objasnit vliv donoru sulfanu Na₂S na stárnutí a vývojovou kompetenci prasečích oocytů. Zralé oocyty byly vystaveny 24 hod. prodloužené kultivace za přítomnosti donoru sulfanu Na₂S a následně aktivovány (Jílek *et al.*, 2001). Oocyty aktivované ihned po dosažení metafáze II dosáhly v souladu s dříve publikovanými výsledky téměř 95 % úspěšnosti aktivace (Jílek *et al.*, 2001). Prodloužená kultivace prasečích oocytů 24 hod. statisticky významně snižovala podíl oocytů schopných aktivace. Přítomnost donoru Na₂S snížila míru aktivace v porovnání se zralými oocyty kultivovanými dalších 24 hod. o více než 10 %, přestože nebyly rozdíly statisticky průkazné. Donor Na₂S ve vyšší koncentraci dále signifikantně snižoval podíl aktivovaných oocytů na méně než 50 %, čímž se podíl aktivovaných oocytů nelišil od spontánně aktivovaných oocytů po 2 dnech prodloužené kultivace (Petrová *et al.*, 2004).

Přestože donor H_2S nezvyšoval podíl aktivovaných oocytů, výrazně zlepšil jejich schopnost embryonálního vývoje. Zralé oocyty kultivované s donorem Na_2S totiž dosáhly po aktivaci signifikantně vyššího podílu dvoubuněčných embryí, morul i blastocyst, oproti skupině oocytů vystavené 24 hod. prodloužené kultivace bez donoru H_2S . Donor H_2S zlepšoval embryonální vývoj oocytů po prodloužené kultivaci na úroveň oocytů, které prodloužené kultivaci vystaveny nebyly.

Jednorázová expozice oocytů donorem H_2S snižovala podíl aktivovaných oocytů, naopak výrazně zlepšila následný embryonální vývoj po aktivaci. Toto zjištění podporuje domněnku o protektivním účinku H_2S na somatické buňky, kde sulfan potlačuje nejen apoptózu, ale také zánětlivé procesy (Gadalla *et* Snyders, 2010; Tang *et al.*, 2010; Baskar *et* Bian, 2011). Vystavení oocytů donoru Na_2S však nezajišťuje postupné uvolňování H_2S , ale jednorázovou dávku (Lee *et al.*, 2011), čímž nezahrnuje trvalý vliv H_2S na oocyty během prodloužené kultivace.

Objasnění úlohy H_2S v signálních drahách zrajících oocytů a časných embryí vyžaduje další experimenty založené na dlouhodobé expozici embryí H_2S během jejich vývoje, na použití inhibitorů enzymů uvolňujících sulfan a popř. sledování produkce H_2S těmito enzymy.

6. Závěr

Biotechnologie reprodukce prasat jsou dynamicky rozvíjejícím se oborem. Úspěšnost reprodukčních biotechnologií je limitována dostatečným počtem kvalitních oocytů dozrálých do metafáze 2. meiotického dělení. Objasnění signálních drah v oocytech může zvýšit kvalitu používaných oocytů. Mezi intenzivně studované molekuly v regulačních procesech fyziologie buněk patří sulfan.

Cílem práce bylo prokázat přítomnost enzymů cystathionin β -syntáza (CBS), cystathionin γ -lyáza (CSE) a 3-mercaptopyruvát-sulfotransferáza (MPST) v prasečích oocytech během zrání a objasnit vliv donoru sulfanu Na_2S na průběh prodloužené kultivace a vývojovou kompetenci oocytů prasete.

V prasečích oocytech GV a po 24 a 48 hod *in vitro* zrání byly prokázány enzymy endogenně uvolňující sulfan CBS, CSE a MPST. Intenzita signálu v oocyty byla nejvyšší u enzymů CSE a MPST v korové oblasti, kde intenzita těchto enzymů podléhala během zrání výrazným změnám. Podstatně nižší intenzita signálu byla sledována u enzymu CBS, který v průběhu celé *in vitro* kultivace prokazoval stabilně nízké hodnoty signálu s nepatrnými výkyvy. Je pravděpodobné, že nejdůležitějšími enzymy uvolňující H_2S v prasečích oocytech jsou CSE a MPST a svojí úlohu sehrávají především v korové oblasti, kde se sulfan může podílet na regulaci řady faktorů, jako cAMP nebo PKA.

Dalším experimentem byl studován vliv donoru sulfanu Na_2S na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů a jejich vývojovou kompetenci. Donor sulfanu Na_2S nepatrně snižoval počet partenogeneticky aktivovaných oocytů, ale výrazně zlepšil časný embryonální vývoj prasečího oocytu. Toto zjištění podporuje domněnku o protektivním účinku H_2S na stárnoucí oocyty vystavené prodloužené kultivaci.

Studium efektu H_2S vyžaduje další experimenty zaměřené na meiotické zrání, aktivaci a časný vývoj embryí. Pro zlepšení kvality prasečích oocytů pro biotechnologické využití bude vhodné zaměřit se také na interakce H_2S a dalších gasotransmiterů, jako je např. oxid uhelnatý.

7. Použitá literatura

- ABBOTT, A. L., XU, Z., KOPF, G. S., DUCIBELLA, T., SCHULTZ, R. M. 1998. *In vitro* culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in *in vivo* unfertilized mouse eggs. *Biology of reproduction*. 59 (6). 1515-1521.
- ABEYDEERA, L. R. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57 (1). 257-273.
- ALBERIO, R., ZAKHARTCHENKO, V., MOTLÍK, J., WOLF, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45 (7). 797-809.
- ALBERTINI, D. F., ANDERSON, E. 1974. The appearance and structure of intercellular connection during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *The Journal of Cell Biology*. 63 (1). 234-250.
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing s.r.o., Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 80-902906-0-4.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th. edition. Garland Science, New York. p. 1423 ISBN 0-8153—4072-9.
- BASKAR, R., BRIAN, J. S. 2011. Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *European Journal of Pharmacology*. 656 (1-3). 5-9.
- BEAUCHAMP, R. O., BUS, J. S., POPP, J. A., BOREIKO, C. J., ANDJELKOVICH, D. A. 1984. A critical-review of the literature on hydrogen-sulfide toxicity. *CRC Critical Review in Toxicity*. 13 (1). 25-97.
- BLACKSTONE, E, MORRISON, M., ROTH, M. B. 2005. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*. 308 (5721). 518-518.
- CALVERT, J. W., COETZEE, W. A., LEFER, D. J. 2010. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 12 (10). 1203-1217.
- CAMPBELL, N. A., REECE, J. B. 2008. *Biologie*. Computer Press, a.s., Brno. 1332 s. ISBN: 80-251-1178-4.
- CANTÍ, C., BOGDANOV, Y., DOLPHIN, A. C. 2000. Interaction between G proteins and accessory β subunits in the regulation of α 1B calcium channels in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology*. 527 (3). 419-432.

- DU, Q. Y., JOVANOVIĆ, S., SUKHODUB, A., BARRATT, E., DREW, E., WHALLEY, K. M., KAY, V., McLAUGHLIN, M., TELFER, E. E., BARRATT, C. L. R., JOVANOVIĆ, A. 2010. Human oocytes express ATP-sensitive K(+) channels. *Human Reproduction*. 25 (11). 2774-2782.
- EBRAHIMKHANI, M. R., MANI, A. R., MOORE, K. 2005. Hydrogen sulphide and the hyperdynamic circulation in cirrhosis: a hypothesis. *GUT*. 54 (12). 1668-1671.
- ELROD, J. W., CALVERT, J. W., MORRISON, J., DOELLER, J. E., KRAUS, D. W., TAO, L., JIAO, X. Y., SCALIA, R., KISS, L., SZABO, C., KIMURA, H., CHOW, C. W., LEFER, D. J. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (39). 15560-15565.
- EPPIG, J. J. 1993. Regulation of mammalian oocyte maturation. 185-208.
- EPPIG, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproductions*. 122 (6). 829-838.
- FAIR, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3-4). 203-216.
- FAN, H., TONG, CH., CHEN, D. a SUN, Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47 (14). 1157-1162.
- FAN, H., HUO, L., MENG, X., ZHONG, Z., HOU, Y., CHEN, D., SUN, Q. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1552-1564.
- FAN, H., Sun, Q. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535-547.
- FULKA, J. Jr., FIRST, N. L., MOOR, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41-49.
- FURCHGOTT, R. F., JOTHIANANDAN, D., KHAN, M. T. 1992. Comparison of properties of nitric-oxide and nitrosocysteine as relaxants of rabbit aorta. *Biology of Nitric Oxide 1: Physiological and Clinical Aspects*. 1. 17-20.
- GADALLA, M. M., SNYDER, S. H. 2010. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of neurochemistri*. 113 (1). 14-26.

- GARRINGTON, T. P., JOHNSON, G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 11 (2). 211-218.
- GROSS, S. D., SCHWAB, M. S., TAIEB, F. E., LEWELLYN, A. L., QIAN, Y., MALLER, J. L. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90^{Rsk}. *Current Biology*. 10 (8). 430-438.
- GUILLEMARE, E., LAZDUNSKI, M., HONORÉ, E. 1995. Glibenclamide opens ATP-sensitive potassium channels in *Xenopus* oocyte follicular cells during metabolic stress. *Molecular Pharmacology*. 47 (3). 588-594.
- HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation, in HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. (eds.), *Reproduction in Farm Animals* (7th ed.). Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 68-81.
- HALL, J. G. 1990. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *The American Journal of Human Genetics*. 46 (5). 857-873.
- HAMID, J., NELSON, D., SPAETGENS, R., DUBEL, S. J., SNUTCH, T. P., ZAMPONI, G. W. 1999. Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (10). 6195-6202.
- HEIKINHEIMO, O., GIBBONS, W. E. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Medicine*. 4 (8). 745-756.
- HÖLZENSPIES, J., STLOORVOGEL, W., COLENBRANDER, B., ROELEN, B. A., GUTKNECHT, D., van HAEFTEN, T. 2009. Cdc2/SPDY transiently associates with endoplasmic reticulum exit sites during oocyte maturation. *BMC Developmental Biology*. 9 (8). p. 16.
- HONORÉ, E., LAZDUNSKI, M. 1993. Single-channel properties and regulation of pinacidil glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells from *Xenopus*-oocyte. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 424 (2). 113-121.
- HU, Y., CHEN, X., PAN, T. T., NEO, K. L., LEE, S. W., KHIN, E. S. W., MOORE, P. K., BIAN, J. S. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 455 (4). 607-616.
- HUNTER, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122-130.

- HUO, L. J., LIANG, C. G., YU, L. Z., ZHONG, Z. S., YANG, Z. M., FAN, H. Y., CHEN, D. Y., SUN, Q. Y. 2005. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction*. 129 (4). 403-409.
- HURK van den, H., ZHAO, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717-1751.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47 (1). 23-32.
- CHMELÍKOVÁ, E., JEŠETA, M., SEDMÍKOVÁ, M., PETR, J., TŮMOVÁ, L., KOTT, T., LIPOVOVÁ, P., JÍLEK, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18 (3). 235-244.
- CHOI, T. S., FUKASAWA, K., ZHOU, R. P., TESSAROLLO, L., BORROR, K., RESAU, J., VANDEWOUDE, G. F. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (14). 7032-7035.
- JABLONKA-SHARIFF, A., OLSON, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139 (6). 2944-2954.
- JÍLEK, F., HUTTELOVÁ, R., PETR, J., HOLUBOVÁ, M., ROZINEK, J. 2001. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of the protein kinase inhibitor 6-dimethyl amimopurine. *Reproduction in Domestic Animals*. 36 (3-4). 139-145.
- JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J. K., TILLY, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145-150.
- JOLLIFF, J. W., PRATHER, R. S. 1997. Parthenogenic development of *in vitro*-matured, *in vivo*-cultured porcine oocytes beyond blastocyst. *Biology of Reproduction*. 56 (2). 544-548.
- 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.
- JONES, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130 (6). 813-823.

- KAMATCHI, G. L., TIWARI, S. N., CHAN, C. K., CHEN, D., DO, S.-H., DURIEUX, M. E., LYNCH, C. 2003. Distinct regulation of expressed calcium channels 2.3 in *Xenopus* oocytes by direct or indirect activation of protein kinase C. *Brain Research*. 968 (2). 227 – 237.
- KAMOUN, P. 2004. H₂S, a new neuromodulator. *Medicine Sciences*. 20 (6-7). 697-700.
- KELSO, S. R., NELSON, T. E., LEONARD, J. P. 1992. Protein kinase C – mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology*. 449. 705-718.
- KIKUCHI, N., NAITO, K., NOGUCHI, J., SHIMADA, A., KANEKO, H., YAMASHITA, M., AOKI, F., TOJO, H., TOYODA, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63 (3). 715-722.
- KIM, N., FUNAHASHI, H., PRATHER, R. S., SCHATTEN, G., DAY, B. N. 1996. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Molecular reproduction and development*. 43 (2). 248-255.
- KIMURA, H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267 (1). 129-133.
- KISHIMOTO, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6). 654-663.
- KOMERSOVÁ, K., SECHSER, T. 2002. Lékové profily: gliclazidum. *Remedia*. 12 (1). 10-18.
- KRIVOKHARCHENKO, A., POPOVA, E., ZAITSEVA, I, VILIANOVICH, L., GANTEN, D., BADER, M. 2003. Development of parthenogenetic rat embryos. *Biology of Reproduction*. 68 (3). 829-836.
- KRUMENACKER, J., HANAFY, K. A., MURAD, F. 2004. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin*. 62 (6). 505-515.
- KUME, S., ENDO, T., NISHIMURA, Y., KANO, K., NAITO, K. 2007. Porcine SPDYA2 (RINGO A2) stimulates Cdc2 activity accelerates meiotic maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 76 (3). 440-447.
- LEE, Z. W., ZHOU, J. B., CHEN, C. S., ZHAO, Y. J., TAN, C. H., LI, L., MOORE, P. K., DENG, L. W. 2011. The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 6 (6). e21077.
- LI, L., MOORE, P. K. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends in Pharmacological Sciences*. 29 (2). 84-90.

- LIANG, CH., SU, Y., FAN, H., SCHATTEN, H., SUN, Q. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endocrinology*. 21 (9). 2037-2055.
- LIANG, R., YU, W. D., DU, J. B., YANG, L. J., SHANG, M., GUO, J. Z. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119 (22). 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 beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89-96.
- LIM, J. J., LIU, Y. H., KHIN, E. S. W., BIAN, J. S. 2008. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-cell Physiology*. 295 (5). C1261-C1270.
- LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ZIPURSKY, L., DARNELL, J. 2004. *Molecular Cell Biology* 5th. edition. Palgrave Macmillan, W. H. Freeman. p. 967 ISBN 9780716743668.
- LOUVET, L., COLLIN, T. 2005. Involvement of ryanodine receptors in IP3-mediated calcium signaling in neurons – a modeling approach. *Neuroscience Letters*. 381 (1-2). 149-153.
- LOWICKA, E., BELTOWSKI, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas for interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports*. 59 (1). 4-24.
- MADGWICK, S., JONES, K. J. 2007. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. *Cell Division*. 2 (4). p. 7.
- MAINES, M. D., POLEVODA, D., COBAN, T., JOHNSON, K., STOLIAR, S., HUANG, T. J., PANAHIAN, N., CORY-SLECHTA, D. A., McCOUBREY, W. K. 1998. Neuronal overexpression of heme oxygenase-1 correlates with an attenuated exploratory behavior and causes an increase in neuronal NADPH diaphorase staining. *Journal of Neurochemistry*. 70 (5). 2057-2069.
- MANCARDI, D., PENNA, C., MERLINO, A., DEL SOLDATO, P., WINK, D. A., PANGLIARO, P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochimica et biophysica Acta-Bioenergetics*. 1787 (7). 864-872.
- MARKS, A. R. 1996. Expression and regulation of ryanodine/calcium release channels. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 6 (4). 130-135.

- MEHLMANN, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocyte: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-799.
- MIAO, Y., KIKUCHI, K., SUN, Q., SCHATTEN, H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*. 15 (5). 573-585.
- MITCHELL, L. M., KENNEDY, R. C., HARTSHORNE, M. 2004. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. *Human Reproduction*. 19 (1). 1-11.
- MIYAZAKI, S. 2006. Thirty years of calcium signals at fertilization. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 17 (2). 233-243.
- MOITRA, S., SAHU, S. 2010. Regulators of meiotic cell division of the growing oocytes. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1 (4). 172-183.
- MOTLÍK, J., CROZET, N., FULKA, J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72. 323-328.
- MOTLÍK, J., FULKA, J., FLÉCHON, J. - E. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 76. 31-37.
- MOTLÍK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P. 1997. Interplay between Cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 49 (2). 461-469.
- MOTOLA, S., CAO, X., POPLIKER, M., TSAFRIRI, A. 2008. Involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in LH- and meiosis-activating sterol (MAS)-induced maturation in rat and mouse oocytes. *Molecular reproduction and development*. 75 (10). 1533-1541.
- NAKAMURA, Y., YAMAGATA, Y., SUGINO, N., TAKAYAMA, H., KATO, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67 (5). 1588-1592.
- NICHOLSON, C. K., CALVERT, J. W. 2010. Hydrogen sulfide and ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*. 62 (4). 289-297.
- OLSON, K. R. 2011. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 301 (2). 297-312.

- OZIL, J. P. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*. 109 (1). 117-127.
- PAE, H. O., LEE, Y. C., JO, E. K., CHUNG, H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archive of Pharmacal Research*. 32 (8). 1155-1162.
- PALMER, R. M. J., BRIDGE, L., FOXWELL, N. A., MONCADA, S. 1992. The Role of nitric-oxide in endothelial-cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *British Journal of Pharmacology*. 105 (1). 11-12.
- PAN, T. T., NEO, K. L., HU, L.-F., YONG, Q. C., BIAN, J. S. 2008. H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. 294 (1). C169-C177.
- PELECH, S., 2006. Dimerization in protein kinase signaling. *Journal of Biology*. 5 (12).
- PETR, J., CHMELÍKOVÁ, E., DÖRFLEROVÁ, A., JEŠETA, M., KUTHANOVÁ, Z. 2007. Effects of protein kinase C on parthenogenetic activation of pig oocytes using calcium ionophore or nitric oxide-donor. *Czech Journal of Animal Science*. 52 (12). 415-422.
- PETR, J., RAJMON, R., ROZINEK, J., SEDMÍKOVÁ, M., JEŠETA, M., CHMELÍKOVÁ, E., ŠVESTKOVÁ, D., JÍLEK, F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71 (1). 115-122.
- PETROVÁ, I., SEDMÍKOVÁ, M., CHMELÍKOVÁ, E., ŠVESTKOVÁ, D., RAJMON, R. 2004. *In vitro* aging of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49 (3). 93-98.
- PETROVÁ, I., SEDMÍKOVÁ, M., CHMELÍKOVÁ, E., ŠVESTKOVÁ, D., RAJMON, R. 2004. *In vitro* ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49 (3). 93-98.
- PETROVÁ, I., SEDMÍKOVÁ, M., PETR, J., VODKOVÁ, Z., PYTLOUN, P., CHMELÍKOVÁ, E., ŘEHÁK, D., ČTRNÁCTÁ, A., RAJMON, R., JÍLEK, F. 2009. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 55 (1). 75-82.
- POSS, K. D., TONEGAWA, S. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (20). 10925-10930.
- PRATHER, R. S., DAY, B. N. 1998. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. *Theriogenology*. 49 (1). 23-32.

- PROCHÁZKA, R., KAŇKA, J., ŠUTOVSKÝ, P., FULKA, J., MOTLÍK, J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *Journals of Reproduction and Fertility*. 96 (2). 725-734.
- ROSSELLI, M., KELLER, P. J., DUBEY, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*. 4 (1). 3-24.
- SALDANA, C., VAZQUEZ-CUEVAS, F., GARAY, E., ARELLANO, R. O. 2005. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 202 (3). 814-821.
- SAMMUT, I. A., FORESTI, R., CLARK, J. E., EXON, D. J., VESELY, M. J. J., SARATHCHANDRA, P., GREEN, C. J., MORTTELINI, R. 1998. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *British Journal of Pharmacology*. 125 (7). 1437-1444.
- SANTELLA, L., LIM, D., MOCCIA, F. 2004. Calcium and fertilization: the beginning of life. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 29 (8). 400-408.
- SEDMÍKOVÁ, M., RAJMON, R., PETR, J., ŠVESTKOVÁ, D., CHMELÍKOVÁ, E., BANTIRGU, A., ROZINEK, A. J., JÍLEK, F. 2006. Effect of protein kinase C inhibitors on porcine oocyte activation. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology*. 305A (4). 376-382.
- SHIBUYA, N., TANAKA, M., YOSHIDA, M., OGASAWARA, Y., TOGAWA, T., ISHII, K., KIMURA, H. 2009. 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11 (4). 703-714.
- SHIMADA, M., KAWANO, N., TERADA, T. 2002. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of *in vitro* maturation media. *Reproduction*. 124 (4). 557-564.
- SCHMITT, A., NEBRADA, A. R. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*. 115 (12). 2457-2459.
- SLÁDEČEK, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. *Academia*. p. 448.
- STÁRKA, L. 2010. Hydrogen Sulfide - Another Gaseous Hormone?. *Chemické listy*. 103 (1). 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 in domestic animals*. 34 (3-4). 335-342.

- SU, Y., WIGGLESWORTH, K., PENDOLA, F. L., ÓBRIEN, M. J., EPPIG, J. J. 2002. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*. 143 (6). 2221-2232.
- SUGIURA, Y., KASHIBA, M., MARUYAMA, K., HOSHIKAWA, K., SASAKI, R., SAITO, K., KIMURA, H., GODA, N., SUEMATSU, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (5-6). 781-787.
- SUN, Q., NAGAI, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journals of Reproduction and Development*. 49 (5). 347-359.
- SUN, X., LIU, Y., YUE, K., MA, S., TAN, J. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (2). 228-234.
- TAMMARO, P., ASHCROFT, F. M. 2009. A cytosolic factor that inhibits K(ATP) channels expressed in *Xenopus* oocytes by impairing Mg-nucleotide activation by SUR1. *Journal of Physiology-London*. 587 (8). 1649-1656.
- TANG, G, WU, L., LIANG, W., WANG, R. 2005. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*. 68 (6). 1757-1764.
- TANG, G. H., WU, L. Y., WANG, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37 (7). 753-763.
- TANGHE, S., Van SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYON, M., de KRUIF, A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 61 (3). 414-424.
- TANIGUCHI, S., NIKI, I. 2011. Significance of hydrogen sulfide production in the pancreatic beta-cell. *Journal of Pharmacological Sciences*. 116 (1). 1-5.
- TANITO, M., AGBAGA, M. P., ANDERSON, R. E. 2007. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 42 (12). 1838-1850.
- TAO, Y., XIE, H. R., HONG, H. Y., CHEN, X. F., JANG, J., XIA, G. L. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13 (1). 1-9.

- TATEMOTO, H., SAKURAI, N., MUTO., N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*. 63 (3). 805-810.
- TATONE, C., MONACHE, S. D., IORIO, R., CASERTA, D., COLA, M. D., COLONNA, R. 2002. Possible role for Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca²⁺ signal in mouse oocyte activation. *Molecular Human Reproduction*. 8 (8). 750-757.
- VANDERHYDEN, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. 2006-2022.
- VERMA, A., HIRSCH, D. J., GLATT, C. E., RONNETT, G. V., SNYDER, S. H. 1993. Carbon-monoxide – a stative neural messenger. *Science*. 259 (5093). 381-384.
- VINCENT, T., CHEEK, T. R., JOHNSON, M. H. 1992. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *Journal of Cell Science*. 103. 389-396.
- WANG, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *FASEB Journal*. 16 (13). 1792-1798.
- WANG, R. 2003. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5 (4). 493-501.
- WANG, W. H., MACHÁTY, Z., ABEYDEERA, L. R., PRATHER, R. S., DAY, B. N. 1998. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biology of Reproduction*. 58 (6). 1357–1366.
- WANG., W., SUN, Q., HOSOE, M., SHIOYA, Y., DAY, B. N. 2007. Quantified analysis of cortical granele distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56 (6). 1376-1382.
- WASSARMAN, P. M. 1988. The Mammalian ovum. 69-102. In: KNOBIL, E., NEIL, J., editors. 1988. *The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. p. 2413.
- WHITAKER, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Journals of Reproduction and Fertility: Reviews of Reproduction*. 1. 127-135.
- WILBRAND, F., HONORÉ, E., LAZDUNSKI, M. 1992. Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Cell Biology*. 89 (11). 5133-5137.
- YANAGIMACHI, R. 1988. Mammalian fertilization. 135-185. In: KNOBIL, E., NEIL, J., editors. 1988. *The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. p. 2413.

- YANG, G. D., WU, L. Y., JIANG, B., YANG, W., QI, J., CAO, K., MENQ, Q., MUSTAFA, A. K., MU, W., ZHANG, S., SNYDER, S. H., WANG, R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 322 (5901). 587-590.
- YE, J., FLINT, A. P. F., LUCK, M. R., CAMPBELL, K. H. S. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125 (5). 645-656.
- YI, Y. J., PARK, C. S. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cykloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurin. *Animal Reproduction Science*. 86 (3-4). 297–304.
- YONG, Q. CH., LEE, S. W., FOO, S. C., KAY, L. N., CHEN, X., BIAN, J. S. 2008. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology*. 295 (3). H1330-H1340.
- YOSHIDA, S. 1997. Effect of X-irradiation on the calcium channel of the mouse oocyte. *Life Sciences*. 60 (16). 1377 – 1383.
- ZAKHARY, R., POSS, K. D., JAFFREY, S. R., FERRIS, CH. D., TONEGAWA, S., SNYDER, S. H. 1996. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbonmonoxide. *Neurobiology*. 94 (26). 14848–14853.
- ZHANG, M. I. N., O'NEIL, R. G. 2001. Kinetics of activation of PKC-regulated epithelial calcium channel. *Cell Calcium*. 29 (4). 263-275.
- ZHANG, Q. Y., DU, J. B., ZHOU, W. J., YAN, H., TANG, C. S., ZHANG, C. Y. 2004. Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317 (1). 30-37.
- ZHAO, W. M., ZHANG, J., LU, Y. J., WANG, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K-ATP channel opener. *EMBO Journal*. 20 (21). 8428-8433.
- ZHU, X. Y., GU, H., NI, X. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75-82.