

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Expresní izolace izoforem hemoxygenázy ve stárnoucích oocytech
prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michaela Poupalová

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

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci *Exprese izoformem hemoxygenázy ve stárnoucích oocytech prasete* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 6. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení diplomové práce a užitečné připomínky. Dále bych chtěla mnohokrát poděkovat Ing. Markétě Dvořákové a Ing. Davidu Němečkovi za cenné rady a pomoc během zpracování diplomové práce.

Expresí izoforem hemoxygenázy ve stárnoucích oocytech prasete

Souhrn

Kvalita a oplozovací schopnost oocytů dozrávajících v *in vitro* podmínkách je zásadní pro jejich využití v biotechnologiích. V průběhu prodloužené kultivace dochází v oocytech k mnoha morfologickým a funkčním změnám, které mají za následek zejména snížení oplozovací schopnosti oocytů a vyšší míru apoptózy, polyspermie, partenogenetické aktivace a chromozomálních aberací. Tyto změny mají negativní vliv také na následný embryonální vývoj. Pochopení mechanismu stárnutí oocytů by tak mohlo zásadním způsobem přispět k rozvoji reprodukčních biotechnologií hospodářských zvířat a postupů v lidské asistované reprodukci.

Enzym hemoxygenáza (HO) katalyzuje oxidační štěpení hemu na biliverdin, oxid uhelnatý (CO) a železnaté ionty. Existují dvě izoformy hemoxygenázy, tj. HO-1 a HO-2. HO-1 má cytoprotektivní vlastnosti a v buňkách je exprimována zejména v reakci na působení stresových faktorů. HO-2 je zodpovědná spíše za bazální produkci CO. CO se řadí mezi gasotransmitery, což jsou endogenně produkované signální molekuly plynů. Význam systému HO/CO byl prokázán v reprodukční soustavě samců i samic. Jeho význam přímo v oocytech však není znám.

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že je HO exprimována v prasečích oocytech během jejich prodloužené kultivace v *in vitro* podmínkách a že se během stárnutí mění exprese jednotlivých izoforem. Hodnoceny byly oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení (MII) a dále ve třech fázích stárnutí dle délky prodloužené kultivace, tj. 24, 48 a 72 hodin. HO-1 a HO-2 byly lokalizovány imunocytochemickou metodou.

Vyhodnocením experimentů bylo potvrzeno, že v průběhu stárnutí oocytů dochází k expresi obou izoforem HO, a to ve všech hodnocených oblastech, tj. v perichromozomální oblasti, korové oblasti a cytoplazmě. HO-1 se nachází zejména v perichromozomální oblasti a během stárnutí dochází ke statisticky významnému zvyšování intenzity signálu. V korové oblasti a cytoplazmě byl detekován statisticky významný rozdíl pouze v oocytech stárnoucích 72 hodin a intenzita signálu je v těchto oblastech slabší.

V případě HO-2 je signál rovnoměrně rozmístěn po celém oocytu a v porovnání s HO-1 je výrazně silnější. Ke statisticky významnému zvýšení intenzity signálu zde docházelo mezi oocyty ve stádiu MII a skupinou oocytů stárnoucích 24 hodin.

Během prodloužené kultivace se tedy významně zvyšuje exprese HO-2 v porovnání s dozrálými oocyty.

Vědecká hypotéza tak byla potvrzena v případě obou izoform HO, tj. podařilo se lokalizovat HO-1 i HO-2 ve stárnoucích prasečích oocytech a zároveň zde dochází ke změnám v expresi v průběhu prodloužené kultivace. Z výsledků experimentů lze předpokládat, že se v oocytech nachází také produkty enzymatické činnosti HO-1 a HO-2, včetně CO a systém HO/CO se tak pravděpodobně uplatňuje v procesu stárnutí oocytů. Předpokladem je, že HO-1 zde působí zejména jako cytoprotektivní faktor, který by mohl pozitivně ovlivňovat kvalitu oocytů. HO-2 je pak zodpovědná zejména za bazální produkci CO, nicméně může hrát roli také v regulaci oxidačního stresu v oocytech.

Získaná data je nutné prověřit dalšími experimenty zaměřenými na lokalizaci a redistribuci obou izoform během stárnutí oocytů. Předmětem dalších výzkumů by měl být také mechanismus účinku a konkrétní funkce HO-1 a HO-2 v oocytech.

Klíčová slova: *oogeneze, oocyt, gasotransmitery, oxid uhelnatý, hemoxygenáza*

Expression of heme oxygenase isoforms during aging of porcine oocytes

Summary

Quality and fertilization rate of oocytes matured *in vitro* conditions is essential for their use in biotechnology. Many morphological and functional changes occurs in oocytes during prolonged cultivation, which result in decreased fertilization rates and higher levels of apoptosis, polyspermy, parthenogenesis and chromosomal anomalies. These changes also have a negative effect on subsequent embryonic development. Understanding the mechanisms of oocyte aging could thus make a major contribution to the development of reproductive biotechnologies in livestock and human assisted reproduction.

The enzyme heme oxygenase (HO) catalyzes the oxidative cleavage of heme to biliverdin, carbon monoxide (CO) and ferrous ions. There are two isoforms of heme oxygenase, i.e. HO-1 and HO-2. HO-1 has cytoprotective properties and in the cells is expressed especially in response to stress factors. HO-2 is responsible for basal production of CO. CO belongs to gasotransmitters, which are endogenously produced signaling gaseous molecules. Meaning of HO/CO system was proven in reproductive system of both males and females. Its importance in oocytes is not known.

The aim of this thesis was to verify the hypothesis that the HO is expressed in porcine oocytes during their prolonged cultivation *in vitro* conditions and that the expression of both isoforms changes during aging. Oocytes were evaluated at the metaphase stage of the second meiotic division (MII) and three stages of aging according to the length of prolonged cultivation, i.e. 24, 48 and 72 hours. HO-1 and HO-2 were localized by immunocytochemistry method.

By evaluating the experiments it was confirmed that both HO isoforms are expressed during aging in all evaluated areas, i.e. in the perichromosomal area, cortical area and cytoplasm. HO-1 is located mainly in the perichromosomal area and during aging occurs statistically significant increase in signal intensity. In the cortical area and the cytoplasm was detected statistically significant difference only in oocytes aging 72 hours and the signal intensity is weaker in these areas.

In the case of HO-2 signal is evenly distributed throughout the oocyte and compared with the HO-1 the signal is significantly stronger. A statistically significant increase in signal intensity occurred between oocytes at the MII stage and the group of oocytes aging 24 hours.

An expression of HO-2 compared with matured oocytes significantly increases during prolonged cultivation.

A scientific hypothesis was confirmed in the case of both HO isoforms, i.e. HO-1 and HO-2 were localized in aging porcine oocytes and at the same time there is a change in expression during prolonged cultivation. From the results of experiments it can be assumed that products of enzymatic activity of HO-1 and HO-2, including CO are also present in oocytes, and therefore HO/CO system is probably related to the oocyte aging. The assumption is that HO-1 acts as a cytoprotective factor, which could have a positive effect on oocyte quality. HO-2 is responsible for basal production of CO, but it may also play a role in the regulation of oxidative stress in oocytes.

The data obtained should be investigated further with more experiments focused on localization and redistribution of both isoforms during oocyte aging. The subject of further research should also be a mechanism of action and specific function of HO-1 and HO-2 in oocytes.

Keywords: *oogenesis, oocyte, gasotransmitters, carbon monoxide, heme oxygenase*

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3. Literární rešerše	11
3.1. Folikulogeneze a oogeneze	11
3.1.1. Primordiální zárodečné buňky a vznik folikulů.....	11
3.1.2. Fáze růstu.....	13
3.1.3. Fáze zrání.....	18
3.2. Stárnutí oocytů.....	21
3.2.1. Změny ve stárnoucích oocytech	21
3.2.2. Mechanismus stárnutí oocytů	23
3.2.3. Důsledky stárnutí oocytů	26
3.3. Oxid uhelnatý jako gasotransmitter	27
3.3.1. Gasotransmitery	27
3.3.2. Oxid uhelnatý a hemoxygenáza.....	27
3.3.3. Funkce oxidu uhelnatého v organismu	30
4. Materiál a metody	34
4.1. Získávání a kultivace oocytů	34
4.2. Imunolokalizace HO-1 a HO-2.....	34
4.3. Statistické vyhodnocení	35
4.4. Experimentální schéma.....	36
5. Výsledky	38
6. Diskuze	48
7. Závěr	54
8. Seznam literatury	55
9. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	80

1. Úvod

Stárnutí oocytů má negativní dopady jak *in vivo*, tak v *in vitro* podmínkách. Jedná se zejména o sníženou oplozovací schopnost oocytů, špatnou kvalitu embryí, vyšší míru polyspermie, chromozomálních aberací a embryonální mortality. Identifikace faktorů ovlivňujících stárnutí oocytů je tak důležitá pro další rozvoj biotechnologií v reprodukci hospodářských zvířat a v lidské asistované reprodukci. Získané poznatky by bylo možné využít např. pro modifikace kultivačních médií a minimalizovat tak negativní vlivy stárnutí na oocyty.

Na regulaci stárnutí a meiotického zrání oocytů se podílí malé signální molekuly plynů zvané gasotransmitery. V případě oxidu dusnatého (NO) a sulfanu (H₂S) již byl prokázán jejich pozitivní vliv na kvalitu oocytů. V potlačení projevů stárnutí se uplatňuje zejména NO.

Vliv oxidu uhelnatého (CO) na zrání a stárnutí oocytů není v současné době plně prozkoumán. Byly však prokázány účinky CO na další reprodukční funkce, jako je erekce, syntéza pohlavních hormonů, ovulace, funkce žlutého tělíska nebo placentace. Vzhledem k těmto poznatkům a také četným interakcím, ke kterým dochází mezi CO, NO a H₂S lze předpokládat, že také CO hraje důležitou roli v regulaci meiotického zrání a stárnutí oocytů.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že je hemoxygenáza přítomná v prasečích oocytech při jejich prodloužené kultivaci *in vitro* podmínkách a že se během stárnutí oocytů mění exprese jednotlivých izoform.

3. Literární rešerše

3.1. Folikulogeneze a oogeneze

3.1.1. Primordiální zárodečné buňky a vznik folikulů

Vývoj oocytů probíhá ve třech fázích: fáze množení, fáze růstu a fáze zrání. K fázi množení dochází ještě v prenatálním období samice a jedná se o mitotické dělení oogonií, které vznikají z primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells – PGCs).

PGCs vznikají z nediferencovaných epiblastických buněk, které jsou během gastrulace součástí zadní části primitivního proužku (Gilbert, 2000). Následně se dostávají do entodermu žloutkového váčku, z něj migrují do zadního střeva a poté podél dorzálního mezenteria do genitální lišty (Freeman, 2003). Do zadního střeva migrují PGCs pasivně, zatímco do genitální lišty se již dostávají améboidním pohybem (Wassarman, 1994). Vznik PGCs z epiblastu reguluje zejména transformující růstový faktor-beta (TGF- β – transforming growth factor-beta) (Ying et al., 2000).

Migrace a proliferace PGCs ve vyvíjejících se gonádách je řízena mnoha faktory a závisí také na interakci PGCs a okolních somatických buněk (Pesce et al., 2002). Na povrchu PGCs je exprimován c-kit receptor a somatické buňky podél migrační dráhy PGCs produkují faktor kmenových buněk (SCF – stem cell factor) neboli Kit ligand, který se na něj váže. SCF pak pozitivně působí na proliferaci PGCs (Fleischmann, 1993). Glykoproteiny jako fibronectin vytváří migrační dráhu a stimulují translokaci migrujících PGCs (Fujimoto et al., 1985). V genitální liště pak dochází k produkci chemoatraktantů, které přitahují PGCs a stimulují jejich mitotickou aktivitu (Godin et al., 1990).

Jakmile PGCs dokončí migraci do genitální lišty, dochází k jejich diferenciaci, výrazné mitotické a transkripční aktivitě a vznikají tak skupiny oogonií propojené intercelulárními cytoplazmatickými můstky (Sawyer et al., 2002). U prasat se PGCs do genitální lišty dostávají do 26. dne po oplození (Takagi et al., 1997). Pro kolonizaci a zanoření PGCs do genitální lišty je důležitá exprese adhezních molekul B-1 integrinu a E-kadherinu.

Oogonie jsou obklopeny mezonefrogenními somatickými buňkami a vytváří se tak klastry zárodečných buněk neboli kortikální pruhy (Anderson et al., 2001). Mitotické dělení oogonií ustává ještě před vznikem folikulů a dochází k zahájení meiózy (Ginsburg et al., 1990). Oogonie, které dokončily mitotické dělení, se nacházejí ve stádiu *preleptotene*, kdy

dochází k premeiotické replikaci DNA. Tato syntetická aktivita signalizuje transformaci oogonií v oocyty (Wassarman, 1994).

Po rozpadu kortikálních pruhů se začínají vyvíjet samotné folikuly (Pepling, 2006). V této fázi mnoho oocytů podléhá apoptóze, což regulují pro- a antiapoptotické proteiny rodiny Bcl (B-cell lymphoma) (Ratts et al., 1995). Zbylé oocyty jsou poté obklopeny jednou vrstvou 4–8 plochých somatických (pregranulózniých) buněk a intaktní bazální membránou a vznikají tak primordiální folikuly (Byskov et al., 1997). Pregranulózní buňky pochází z buněk distálního konce kortikálního pruhu (Picton et al., 1998). Většina primordiálních folikulů však zaniká, v pubertě se jich u prasnic nachází cca 420 000 (Gosden a Telfer, 1987).

Kromě výše zmíněných faktorů se na vzniku primordiálních folikulů významně podílí také aktiviny. Aktiviny a jejich receptory jsou exprimovány v zárodečných a somatických buňkách ovárií, pozitivně ovlivňují tvorbu pregranulózniích buněk a jsou důležité také pro vývoj dostatečného počtu primordiálních folikulů (Bristol-Gould et al., 2006).

3.1.2. Fáze růstu

Primordiální folikuly zůstávají v klidovém stádiu až do nástupu puberty samice, kdy dochází k jejich aktivaci a kontinuálně se rekrutují do rostoucí populace folikulů. Dochází zde k transformaci plochých pregranulózniích buněk na jednu vrstvu kubických granulózniích buněk a vzniká tak primární folikul. Zvyšuje se také počet mitochondrií a drsného i hladkého endoplazmatického retikula, což je dáno zvýšenými požadavky na energii a syntézu proteinů, RNA, lipidů a dalších látek. Tato fáze přeměny primordiálního folikulu na primární se označuje jako počáteční recruitment (Fair et al., 1997).

Pro aktivaci primordiálních folikulů je nezbytná signální dráha PTEN/PI3K (phosphatase and tensin homolog / phosphatidylinositol 3-kinase), která je přítomna v oocytech během vývoje od primordiálního do primárního folikulu a pozitivně působí na proliferaci a životnost buněk (Cantley, 2002). Aktivaci primordiálních folikulů naopak inhibuje signální dráha TSC1/mTORC1 (tuberous sclerosis complex 1 / mammalian target of rapamycin complex 1) a udržuje tak folikuly v klidovém stádiu (Adhikari a Liu, 2010). Obě dráhy jsou proto klíčové pro regulaci aktivace primordiálních folikulů. Dále se zde významně uplatňuje anti-Müllerian hormon (AMH) produkovaný v granulózniích buňkách, který inhibuje počáteční recruitment a je proto důležitý pro zachování rovnováhy mezi počtem aktivovaných a klidových folikulů (Durlinger et al., 1999). V granulózniích buňkách dále dochází k produkci faktoru kmenových buněk (SCF – stem cell factor), který se váže na c-kit receptor na povrchu oocyty. SCF se podílí na zahájení folikulogeneze, pozitivně ovlivňuje růst oocytů a zvyšuje intenzitu přeměny primordiálních folikulů na primární (Nilsson a Skinner, 2004).

Za další vývoj primárních folikulů odpovídá zejména proliferace granulózniích buněk, které vytváří kolem oocyty postupně několik vrstev a vzniká tak sekundární (preantrální) folikul (Kanitz et al., 2001). Vývoj primárních folikulů v sekundární ještě není řízen gonadotropními hormony a stále závisí na intraovariálních faktorech, které jsou produkovány oocyty a granulózniími buňkami (Kol a Adashi, 1995). Klíčovou roli zde má zejména kostní morfogenetický protein-15 (BMP-15 – bone morphogenetic protein-15) a růstový diferenciacní faktor-9 (GDF-9 – growth differentiation factor-9). Oba stimulují proliferaci granulózniích buněk a jsou produkovány v oocytech (Yan et al., 2001).

Ve stádiu sekundárního folikulu dochází k intenzivnímu růstu oocyty, granulóznií buňky dále proliferují a stromální buňky kolem nich vytváří vnitřní a vnější thekální vrstvu (*theca folliculi interna* a *externa*) (van den Hurk et al., 1997). Během růstu se oocyt také

diferencuje, přičemž dochází k tvorbě nových produktů a organel a modifikaci a redistribuci těch stávajících (Picton et al., 1998). V rostoucích oocytech se dále zvyšuje počet ribozómů, mitochondrií a dalších buněčných organel a dochází k intenzivní syntéze RNA a proteinů (van den Hurk a Zhao, 2005). Syntéza proteinů je důležitá zejména pro diferenciaci oocyty, interakci s okolními buňkami, tvorbu *zony pellucidy*, oplození a vývoj raného embrya. Některé proteiny se netvoří přímo v oocyty, ale dostávají se do něj endocytózou z folikulární tekutiny nebo granulóznic buněk (Picton et al., 1998). Dále se akumulují lipidy, glykogen a mnoho organel se přesouvá směrem k periférii oocyty (van den Hurk a Zhao, 2005).

Jednou z nejdůležitějších změn, ke kterým dochází během růstové fáze, je sekrece glykoproteinové membrány, *zony pellucidy*, která tvoří ochranný obal kolem oocyty a skládá se celkem ze tří (myš) nebo čtyř (prase, člověk) typů glykoproteinů – ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Gupta et al., 2007). Tyto proteiny jsou důležité pro správný folikulární vývoj a jejich exprese je závislá na transkripčním faktoru FIG- α (factor in the germline-alpha) (Soyal et al., 2000). Exprese glykoproteinu ZP2 začíná již v primordiálních folikulech, ostatní se začínají exprimovat po zahájení růstu oocyty. *Zonu pellucidu* tvoří dlouhá filamenta složená z dimerů ZP2-ZP3, které jsou nekovalentně spojeny pomocí dimerů ZP1. ZP3 funguje jako primární receptor pro spermie, dochází zde k navázání hlavičky a spouští se akrozomální reakce. ZP2 působí jako sekundární receptor a usnadňuje spermií průnik *zonou pellucidou* (Picton et al., 1998).

Mezi oocytem a granulózními buňkami (a také mezi granulózními buňkami navzájem) se vytváří mezerové buněčné spoje (gap junctions) (Fair et al., 1997). Gap junctions se skládají ze specializovaných proteinů konexinů, konkrétně z konexinu-32, 37, 43, 45 a 57 (Wright et al., 2001). Exprese konexinů je spojena s proliferací granulóznic buněk a jednotlivé druhy konexinů jsou specifické pro různá stádia diferencovaných granulóznic buněk nebo různá stádia folikulogeneze (Johnson et al., 1999). Například konexin-37 je exprimován v oocytech ve všech fázích folikulogeneze. Gap junctions umožňují obousměrnou komunikaci a transport živin, metabolických prekurzorů (aminokyseliny, nukleotidy), hormonů a dalších signálních molekul. Díky těmto spojům mohou oocyty aktivně stimulovat růst a diferenciaci granulóznic buněk, zatímco granulózní buňky podporují růst a diferenciaci oocyty (van den Hurk a Zhao, 2005).

Vývoj sekundárních folikulů stále závisí primárně na intraovariálních faktorech, ale již se v nich tvoří receptory pro gonadotropní hormony, tj. FSH (folikulostimulační hormon) a LH (luteinizační hormon). Gonadotropiny jsou produkovány v adenohipofýze a ovlivňují počet, velikost a míru atrézie folikulů. FSH dále stimuluje vznik gap junctions a zvyšuje

přežitelnost folikulů (van den Hurk et al., 1997). Folikuly jsou však schopny se správně vyvinout i s minimální hladinou FSH nebo defektními FSH receptory (McGhee a Hsueh, 2000). Prostřednictvím LH receptorů v thekální vrstvě se spouští biosyntéza androgenů, které stimulují tvorbu FSH receptorů v granulózních buňkách a tím zesilují efekt FSH na folikuly (Joy et al., 1999). Syntéza androgenů je stimulována pomocí neurotropinů (Adashi a Leung, 1993).

Stejně jako v případě primárních folikulů jsou pro vývoj sekundárních folikulů nezbytné faktory BMP-15 a GDF-9, které stimulují proliferaci granulózních buněk. Dále regulují tvorbu SCF, přičemž GDF-9 zde působí jako inhibitor a BMP-15 jako aktivátor. SCF pak stimuluje růst samotného oocyty (Otsuka a Shimasaki, 2002). GDF-9 navíc zodpovídá za dostupnost biologicky aktivních aktivinů a inhibinů (Elvin et al., 1999). Významně se zde podílí také inzulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1 – insulin-like growth factor-1) a růstový hormon (GH – growth hormone). Tyto faktory působí na růst a přežitelnost folikulů, diferenciaci a proliferaci granulózních a thekálních buněk, tvorbu kortikálních granul v oocyty a na expresi konexinu-43 a receptorů pro FSH (Silva et al., 2009).

Ze sekundárního folikulu vzniká antrální folikul, který obsahuje dutinu vyplněnou tekutinou (antrum). Antrální tekutina slouží jako důležitý zdroj regulačních faktorů pocházejících z krve nebo folikulárních buněk, např. gonadotropinů, steroidů, růstových faktorů, enzymů, proteoglykanů a lipoproteinů. Během folikulárního vývoje se produkce antrální tekutiny zvyšuje vlivem vzrůstající vaskularizace folikulu a propustnosti cév, což je spojeno také s intenzivním zvětšováním folikulu (Hartshorne, 1997).

Vývoj antrálních folikulů se skládá z fáze růstu, recruitmentu, selekce a dominance. Rané antrální folikuly obsahují v granulózních buňkách receptory pro FSH, ale během počáteční fáze růstu jsou na gonadotropinech relativně nezávislé a zvětšují svou velikost za absence nebo jen malého množství FSH a LH. Za těchto podmínek dochází v thekálních buňkách ke vzrůstající expresi enzymů účastnících se biosyntézy steroidů, zatímco v granulózních buňkách ještě nedochází k expresi aromatázy, která v rekrutovaných folikulech umožňuje syntézu estrogenů z androgenních prekurzorů pocházejících z thekálních buněk. V raných antrálních folikulech tak dochází zejména k tvorbě androgenů a progesteronu, ale v důsledku chybějící aromatázy nedochází k produkci estrogenů.

U dospělých prasnic se antrální folikuly o velikosti v průměru 1 mm stávají gonadotropin-dependentní a po přechodném zvýšení hladiny FSH dochází k jejich recruitmentu do rostoucí kohorty oocytů (Driancourt, 2001). Počet rekrutovaných folikulů je mezidruhově rozdílný, u prasnic jich je více než 50. V každém estrálním cyklu dochází

k recruitmentu a selekci antrálních folikulů v rámci jedné nebo více folikulárních vln, přičemž prasnice mají pouze jednu folikulární vlnu.

Ve fázi recruitmentu lze v granulózních buňkách poprvé detekovat aromatázu (Webb et al., 1999). Syntéza androgenů je stimulována pomocí LH, což je navíc podporováno prostřednictvím inhibinu a naopak inhibováno aktivinem a epidermálním růstovým faktorem (EGF – epidermal growth factor). Produkci estrogenů stimuluje FSH, tento účinek je podpořen aktivinem, IGF-1 a BMP-2, 4 a 7 a tlumen pomocí EGF. Aktivita a biologická dostupnost růstových faktorů závisí na jejich receptorech a vzájemných proteinech (Tonetta a diZerega, 1990). FSH redukuje expresi proteinu vázajícího inzulinu podobný růstový faktor-2 (IGFBP-2 – insulin-like growth factor-binding protein-2) v granulózních buňkách, což vede k lepší dostupnosti IGF-1, který společně s FSH zvyšuje aktivitu aromatázy a odpověď folikulů na gonadotropiny. FSH-dependentní inhibice exprese IGFBP-2 v granulózních buňkách je tak klíčová pro další růst rekrutovaných antrálních folikulů (van den Hurk a Zhao, 2005).

V rekrutovaných folikulech dále pokračuje modifikace, proliferace a redistribuce organel. Objevuje se periviteliní prostor, klesá množství drsného i hladkého retikula a mitochondrie, Golgiho aparát, kortikální granula a jádro se přesouvají k periférii oocyту (Fair et al., 1997).

Selekce rekrutovaných antrálních folikulů je vyvolána poklesem hladiny FSH. Rekrutované folikuly se proto musí adaptovat na nízkou hladinu FSH, jinak podléhají atrezii. Vyšší intrafolikulární hladina IGF-1 stimuluje proteolýzu IGFBP-4, což dále vede ke zvýšené produkci IGF-1 v granulózních buňkách a IGF-2 v thekálních buňkách (Webb et al., 1999). Na konci fáze recruitmentu se dále mění poměr aktivinu a inhibinu ve prospěch inhibinu. Vysoká hladina IGF-1 a inhibinu stimuluje ve folikulu steroidogenezi a zvyšuje se tak hladina estrogenů (Driancourt, 2001). Dále dochází k tvorbě dalších FSH a LH receptorů, což vede ke vzniku větší citlivosti na FSH a odpovědi na LH.

Hladina FSH klesá prostřednictvím vysoké produkce inhibinu ve folikulech a negativní zpětné vazby estrogenů na hypofýzu. Dalšího vývoje jsou schopny pouze folikuly, které prodělaly adaptaci na nízkou hladinu FSH (Xu et al., 1995). FSH však není jediným faktorem regulujícím selekci folikulů, protože velké antrální folikuly mohou přímo redukovat citlivost menších folikulů na gonadotropiny (Driancourt, 2001).

Selekcí vzniká v závislosti na druhu nebo plemeni jeden nebo více dominantních (preovulačních) folikulů. U prasnic dosahují tyto folikuly velikosti 8–10 mm. V dominantním folikulu je oocyt obklopen úzce propojenými granulózními buňkami (kumulární buňky)

a společně tvoří kumulo-oocytární komplex, který tvoří výběžek do folikulární tekutiny a je spojen s murálními granulózními buňkami, které obklopují antrum (Eppig, 2001).

Folikulární dominance je podpořena nejméně dvěma lokálními faktory, konkrétně se jedná o IGF-1, který stimuluje tvorbu receptorů pro LH, a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF – vascular endothelial growth factor), jehož produkce je stimulována prostřednictvím LH (Garrido et al., 1993). Zvýšený přítok krve do dominantních folikulů maximalizuje dodávku LH a FSH. Kromě gonadotropinů a již zmíněných intrafolikulárních faktorů ovlivňují proliferaci a diferenciaci granulózních a thekálních buněk další systémové (GH, IGF-1, inzulin) a lokální (BMPs) faktory (Eppig, 2001).

Jakmile dominantní folikuly dosáhnou maximální velikosti, dochází zde k některým změnám, např. se zvyšuje obsah lipidů a zmenšuje se velikost Golgiho aparátu. Během preovulačního vývoje a konečného zrání folikulu se velikost Golgiho aparátu dále redukuje, jaderná membrána je zvlněná a jádérko dostává prstencovitou strukturu. Dochází k prodlužování kumulárních buněk (Assey et al., 1994) a zvětšuje se periviteliní prostor. Tyto změny se objevují ještě před preovulační LH vlnou a označují se jako kapacitace (Hyttel et al., 1997). Na konci růstové fáze ještě před začátkem meiotického zrání má jádro charakteristickou podobu velkého a světlého tzv. zárodečného váčku (GV – germinal vesicle) (Picton et al., 1998). Pokud nedojde k preovulační LH vlně, dominantní folikul podléhá regresi a spouští se recruitment nové folikulární vlny (Fair, 2003).

3.1.3. Fáze zrání

Zrání oocyty je vyvoláno preovulační LH vlnou a nastává pouze v plně dorostlých a meioticky kompetentních oocytech dominantních folikulů. Zrání oocyty zahrnuje jaderné a cytoplazmatické zrání. Jaderné zrání trvá u prasnice cca 44 hodin a dochází zde ke znovuzahájení meiózy (van den Hurk et al., 1999).

Meióza je poprvé zahájena již v prenatalním období samice a začíná profází, která sestává z pěti dílčích stádií: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakineze*. Ve fázi *zygotene* se párují homologní chromozomy, během *pachytene* pak dochází ke crossing overu. První meiotický blok nastává ve stádiu *diktyotene* (konec fáze *diplotene*) a vzniká tak oocyt I. řádu. V tomto stádiu oocyty zůstávají, dokud folikul nezanikne nebo plně nedoroste až do preovulační LH vlny (Wassarman, 1994). Po LH peaku probíhá meióza až do metafáze II, kdy nastává druhý meiotický blok a vzniká oocyt II. řádu. Meióza je poté dokončena až po oplození (van den Hurk et al., 1999).

Cytoplazmatické zrání je nezbytné např. pro schopnost oocyty zabránit polyspermii a tvorbu prvojádra a zahrnuje redistribuci organel a akumulaci kortikálních granul (van den Hurk et al., 1999).

Hlavní faktor zodpovědný za zahájení zrání oocyty je M-fázi podporující faktor (MPF – M-phase-promoting factor). MPF se skládá ze dvou podjednotek: katalytickou podjednotku tvoří serin / threonin protein kináza p34^{cdc2} a regulační podjednotku cyklin B (Dunphy et al., 1988). Před preovulační LH vlnou se v oocyty nachází vysoká hladina cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP – cyclic adenosine monophosphate), který brání aktivaci MPF a udržuje tak oocyt v prvním meiotickém bloku. Do oocyty se cAMP dostává z granulózních buněk prostřednictvím gap junctions. Granulózní buňky produkují také cyklický guanosinmonofosfát (cGMP – cyclic guanosine monophosphate), který v oocyty inhibuje fosfodiesterázu 3A (PDE3A – phosphodiesterase 3A), která je v aktivním stavu zodpovědná za odbourávání cAMP (Sun et al., 2009). Vysoká hladina cAMP v oocyty dále udržuje vyšší koncentraci protein kinázy A (PKA – protein kinase A), která fosforyluje kinázy Wee1 a Myt1. Tyto kinázy jsou zodpovědné za fosforylaci MPF. Fosforylovaný MPF je neaktivní. PKA dále fosforyluje a tím inaktivuje fosfatázu cdc25, která je klíčová pro aktivaci MPF (Kanki a Donoghue, 1991).

LH peak stimuluje rapidní vzestup intracelulárního vápníku v kumulárních buňkách prostřednictvím aktivace fosfolipázy C (PLC – phospholipase C). Intracelulární mobilizace vápníku je následována influxem vápníku do oocyty (Homa, 1995). V důsledku toho dochází

k poklesu hladiny cAMP a PKA, což vede k aktivaci mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK – mitogen-activated protein kinase). Aktivní MAPK je nezbytná pro inhibici kinázy Myt1, která je zodpovědná za inhibiční fosforylaci p34^{cdc2} a tím MAPK napomáhá aktivaci MPF (Stojkovic et al., 1999). MAPK dále způsobuje pokles hladiny cGMP a v důsledku toho stoupá hladina PDE3A, která dále hydrolyzuje cAMP v oocytu. LH dále stimuluje defosforylaci cdc25 kinázy, která tak může odstranit inhibiční fosfátovou skupinu na p34^{cdc2} a tím aktivovat MPF (Kanki a Donoghue, 1991).

Fosforylací příslušných proteinů způsobuje aktivní MPF kondenzaci chromozomů, rozpad zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown) a reorganizaci cytoskeletu při tvorbě dělicího vřeténka (Alberts a kol., 2005). GVBD nastává u prasnice cca 24 hodin po LH peaku (Torner et al., 1998). Aktivita MPF během GVBD stoupá, nejvyšších hodnot dosahuje v metafázi I a klesá během přechodu z anafáze do telofáze. V metafázi II je aktivita MPF opět vysoká (Mattioli et al., 1991). Aktivita MAPK postupně stoupá až do metafáze II a zůstává vysoká i během anafáze a telofáze (Wehrend a Meinecke, 1998).

Po dokončení prvního meiotického dělení se oocyty brání partenogenetické aktivaci pozastavením buněčného cyklu v metafázi II (Tunquist a Maller, 2003). Druhý meiotický blok je udržován pomocí cytostatického faktoru (CSF – cytostatic factor), který se nachází v cytoplazmě ovulovaných oocytů. Jedná se o skupinu molekul, které zabraňují odbourávání cyklinu B, což je nezbytné pro udržení aktivity MPF. Důležitým komponentem cytostatického faktoru je Mos protein, který stimuluje aktivitu MAPK (Stojkovic et al., 1999). Systém Mos/MAPK následně inhibuje degradaci cyklinu B a tím stabilizuje MPF. Pro udržení oocytů v druhém meiotickém bloku je nezbytná také inhibice anafázi podporujícího komplexu (APC/C – anaphase-promoting complex). Oocyty zůstávají v metafázi II až do oplození a pro vystoupení z meiotického bloku je nezbytné snížení aktivity MPF. Průnik spermie do oocytu způsobuje rapidní nárůst koncentrace vápníku, což stimuluje aktivitu APC/C, který je zodpovědný za odbourávání cyklinu B (Yamamoto et al., 2005). V případě, že nedojde k oplození, zůstávají neoplozené oocyty ve vejcovodu a dochází k jejich stárnutí (Tatone et al., 2008).

Cytoplazmatické zrání zahrnuje zejména změny v lokalizaci, morfologii a biochemických vlastnostech organel a cytoskeletu a oocyty tak získávají vývojovou kompetenci, která je nezbytná pro oplození a následný embryonální vývoj. Během cytoplazmatického zrání dochází k syntéze proteinů a dalším procesům, které vyžadují velké množství energie (Krisher a Bavister, 1998). V důsledku toho se zvyšuje počet mitochondrií a přesouvají se do míst s vysokou spotřebou energie (Dumollard et al., 2006). Během růstové

fáze vznikají z Golgiho aparátu kortikální granula, která jsou v nezralých oocytech náhodně rozptýlena v cytoplazmě. Během zrání se přesouvají k periferii oocytu a jejich migrace probíhá pomocí mikrofilament (Yoshida et al., 1993). Dále dochází k fragmentaci Golgiho aparátu a formování endoplazmatického retikula do 1–2 μm velkých klastrů, které se také soustředí v kortikální části oocytu. Reorganizace retikula je důležitá pro schopnost oocytu dlouhodobé oscilace vápníku (FitzHarris et al., 2003).

Vlivem LH dále dochází k produkci kyseliny hyaluronové v kumulárních buňkách a tvoří se tak muko-elastický extracelulární matrix, který je důležitý pro uvolnění oocytu z folikulu a jeho zachycení fimbriemi vejcovodu. Tento proces je označován jako kumulární expanze (Talbot et al., 2003). Důležitou roli zde hraje i růstový diferenciacní faktor-9 (GDF-9 – growth differentiation factor-9), který stimuluje produkci kyseliny hyaluronové (Elvin et al., 1999). Vlivem kumulární expanze dochází k narušení gap junctions, což je také jedním ze spouštěcích signálů pro znovuzahájení meiózy, protože dochází k redukci dodávky cAMP do oocytu (Picton et al., 1998). Pro expanzi kumulu je dále důležitý epidermální růstový faktor (EGF – epidermal growth factor), který slouží také jako parakrinní mediátor LH v indukci ovulace (Park et al., 2004).

3.2. Stárnutí oocytů

Oocyty nacházející se ve stádiu druhého meiotického bloku jsou obvykle oplozeny brzy po ovulaci. Optimální období pro oplození se liší u jednotlivých druhů (Lash a Whittaker, 1974). Pokud nedojde k oplození včas, dochází u zbylých oocytů ve vejcovodu (*in vivo*) nebo v kultuře (*in vitro*) k procesu zvaném stárnutí oocytů (Tatone et al., 2008).

3.2.1. Změny ve stárnoucích oocytech

Funkční změny spojené se stárnutím oocytů zahrnují sníženou oplozovací schopnost (Lanman, 1968), zvýšenou míru polyspermie (Badenas et al., 1989), partenogeneze (Blandau, 1952), chromozomálních aberací (Szollosi, 1971) a apoptózy (Fujino et al., 1996), sníženou vnímavost na aktivační stimuly (Szollosi, 1971), zahájení anafáze II (Xu et al., 1997), částečnou exocytózu kortikálních granul (Szollosi, 1971), sníženou aktivitu MPF a MAPK (Kikuchi et al., 1995), epigenetické změny (Liang et al., 2008) a narušený a/nebo zpomalený vývoj embryí nebo plodů (Lanman, 1968).

Během stárnutí dochází dále k četným morfologickým změnám, které zahrnují změny ve struktuře cytoplazmatické membrány, *zony pellucidy*, cytoskeletu a mitochondrií, posun dělicího vřeténka, pólového tělíska a kortikálních granul a rozptýlení centrozomálního materiálu (Szollosi, 1971).

Konkrétně dochází k tvorbě klkovitých výběžků cytoplazmatické membrány, která může takto přecházet až do perivitelinního prostoru, kde tvoří struktury vločkovitého vzhledu (Szollosi, 1971). *Zona pellucida* starých oocytů je tvrdá a skládá se ze shluků granulo-fibrilárního materiálu oddělených od sebe navzájem cca 0,3 μm širokým prostorem a *zona pellucida* tak získává dlaždicovitou strukturu (Longo, 1981).

Další důsledkem stárnutí je posun a degenerace prvního pólového tělíska. Pólové tělísko často začíná degenerovat ještě před ovulací a přibližně 70 % jich je degenerovaných v průběhu 6 hodin po jaderném zrání. Některá tělíska se během jaderného zrání posouvají směrem od dělicího vřeténka a vzdálenost se během stárnutí oocyty dále zvětšuje. Dochází také ke zvětšování perivitelinního prostoru, což dále přispívá k posunu a degeneraci pólového tělíska (Miao et al., 2004).

Kortikální reakce se u starých oocytů snadno spouští spontánně bez oplození. Kortikální granula podléhají částečné exocytóze a mění svou polohu v oocyty (Szollosi,

1971). Nachází se ve dvou morfologicky odlišných skupinách, jedná se o prstenec granul nacházející se pod cytoplazmatickou membránou a dále o oblast o vyšší hustotě kortikálních granul nacházející se nad chromozomy (Ebner et al., 2000).

Během stárnutí se také mění potenciál mitochondriální membrány a dochází k nabobtnání mitochondriální matrix (Wilding et al., 2001).

Intaktní dělicí vřeténko je klíčové pro správnou distribuci chromozómů v dělicích se blastomerách, což je zásadní pro správný embryonální vývoj. Během stárnutí se dělicí vřeténko zkracuje a může být bi- nebo multipolární a dochází tak k narušení segregace chromozómů (George et al., 1996). Ztráta centrozomálních struktur je pak spojena se ztrátou integrity mikrotubulů (Sun a Schatten, 2007). Dále dochází k narušené expresi proteinů nezbytných pro stabilitu vřeténka a změnám motorového proteinu kinezinu EG5 (Hall et al., 2007). U stárnoucích myších oocytů byla pozorována postupná ztráta mikrotubulů z dělicího vřeténka, k čemuž docházelo přednostně v jeho centrální části v blízkosti chromozómů. Také cytoplazmatické mikrotubuly postupně podléhaly depolymerizaci (Longo, 1974).

Ve stárnoucích oocytech může dále docházet k předčasné separaci chromozómů, což je spojeno se vznikem aneuploidii (Mailhes et al., 1998). Byla pozorována také ztráta chromozómů, jejich fragmentace, shlukování a separace chromatid (Rodman, 1971).

3.2.2. Mechanismus stárnutí oocytů

Během stárnutí se v oocytu hromadí volné kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species), zejména pak peroxid vodíku (H_2O_2), peroxynitrid ($ONOO^-$) a superoxidový anion ($O_2 \cdot^-$) (Takahashi et al., 2003). ROS vznikají v mitochondriích jako vedlejší produkt oxidativní fosforylace, ale jejich produkci podporují i různé faktory vnějšího prostředí, např. působení světla nebo nedostatek folikulární a tubální tekutiny bohaté na antioxidanty (Mastroianni a Jones, 1965). Během stárnutí oocytu dále dochází k vyčerpávání intracelulárních faktorů, které slouží jako ochrana proti ROS, např. antioxidantu glutathionu (Boerjan a de Boer, 1990).

V důsledku postupného zvyšování produkce ROS a vyčerpání antioxidantní ochrany dochází v oocytu k oxidačnímu stresu. Předpokladem je, že oxidační stres přímo ovlivňuje některé biochemické děje a zároveň funguje jako spouštěč pro kaskádu dalších procesů, které jsou zodpovědné za stárnutí oocytu (Lord et al., 2013). S oxidačním stresem souvisí pokles koncentrace důležitých faktorů, jako jsou MPF a MAPK a narušení funkce mitochondrií a homeostázy vápníku v oocytu (Lord a Aitken, 2013).

ROS mohou dále způsobovat úbytek antiapoptotických (Takahashi et al., 2009) a zvýšení exprese proapoptotických faktorů (Chaube et al., 2007) a mají tak vliv na spuštění programované buněčné smrti v oocytu.

3.2.2.1. MPF

V případě MPF se ROS uplatňují jako inhibitory tyrozin fosfatázy cdc25 (zodpovědné za odstranění inhibičních fosfátových skupin na $p34^{cdc2}$ a aktivaci MPF) (Brisson et al., 2007) a jako stimulatory tyrozin kináz Wee1 a Myt1 (Chan et al., 1986), které fosforylují $p34^{cdc2}$ a tím inaktivují MPF. Ve stárnoucích oocytech tak dochází ke vzniku inaktivní formy MPF (pre-MPF), která obsahuje inhibiční fosforylace na $p34^{cdc2}$. Během stárnutí oocytu tak koncentrace aktivního MPF postupně klesá, což je spojeno s vyšší úrovní partenogenetické aktivity a fragmentace (Kikuchi et al., 2000).

3.2.2.2. Dysfunkce mitochondrií

DNA, proteiny a lipidy mitochondrií se nachází v těsné blízkosti zdroje ROS (vnitřní mitochondriální membrána) a jsou tak obzvláště citlivé na oxidační stres. V případě mitochondriální DNA (mtDNA) hraje roli i absence protektivních histonů a reparačních mechanismů (Shigenaga et al., 1994). S prodlužující se dobou po ovulaci je vlivem oxidačního stresu funkce mitochondrií narušena a dochází k poškození mtDNA (Sohal a Dubey, 1994), ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu (Liu et al., 2000), zvýšené tvorbě ROS během oxidativní fosforylace (Liu et al., 2009) a k poklesu produkce ATP (Chi et al., 1988).

S nedostatkem ATP dále souvisí např. narušení dynamiky aktinu a tubulinu (Bershadsky et al., 1980), což má negativní vliv na funkci cytoskeletu a dochází např. k exocytóze kortikálních granul a posunu pólového tělíska (Chi et al., 1988).

Dysfunkce mitochondrií je dále spojena se vznikem apoptózy, kdy v důsledku jejich poškození dochází k uvolňování cytochromu C z vnitřní mitochondriální membrány, který aktivuje další faktory, jako jsou kaspázy (Takai et al., 2007). Kaspázy jsou rodina cystein proteáz, které zprostředkují apoptózu a zánětlivý proces prostřednictvím aspartát specifického štěpení širokého spektra buněčných substrátů (Lamkanfi et al., 2002).

3.2.2.3. Oscilace vápníku

Oxidační stres může být dále zodpovědný za narušení homeostázy vápníku v oocyту (Igarashi et al., 1997). ROS mají schopnost přímo ovlivňovat vápníkové kanály a Ca²⁺-dependentní ATPázy endoplazmatického retikula (Rohn et al., 1993) a také signální molekulu kalmodulin (Gao et al., 2001).

Při oplození dochází u savců k zahájení dalšího vývoje oocyту pomocí rapidního vzestupu koncentrace vápníku (Bos-Mikich et al., 1995). Za oscilaci vápníku jsou zodpovědné receptory pro inositoltrifosfát (IP₃ – inositoltriphosphate) na endoplazmatickém retikulu oocyту (Yoon et al., 2008). V případě, že dojde k oplození starého oocyту, může v důsledku narušení homeostázy docházet k abnormální oscilaci vápníku, která tak funguje jako iniciátor apoptózy (Takahashi et al., 2000). Frekvence uvolňování vápníku je v těchto

oocytech výrazně vyšší, ale amplituda je naopak podstatně menší než v čerstvých oocytech (Igarashi et al., 1997).

Předpokladem je, že pokles hladiny ATP a antiapoptotického faktoru Bcl-2 a hromadění ROS během postovulačního stárnutí funguje jako proapoptotický stimul a za těchto podmínek oscilace vápníku po oplození spouští buněčnou smrt (Fissore et al., 2002).

3.2.2.4. Kumulární buňky

Na stárnutí oocyty se podílí také kumulární buňky, přičemž v jejich přítomnosti dochází ke stárnutí rychleji. Oocyty stárnoucí *in vivo*, případně *in vitro* s kumulárním obalem vykazují zvýšený výskyt partenogenetické aktivace a fragmentace a rychlejší pokles MPF a MAPK v porovnání s denudovanými oocyty stárnoucími *in vitro* (Miao et al., 2005). Stejně tak po přidání kumulárních buněk do kultivačního média s denudovanými oocyty dochází k urychlení stárnutí na stejnou úroveň jako v případě oocytů, které mají kumulární obal (Qiao et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že zablokování gap junctions v rámci kumulo-oocytárního komplexu nezabrání zrychlenému stárnutí oocyty. Na základě těchto pozorování se předpokládá, že kumulární buňky vylučují rozpustné parakrinní faktory, které podporují postovulační stárnutí oocyty (Wu et al., 2011).

3.2.3. Důsledky stárnutí oocytů

V důsledku stárnutí oocytů dochází zejména ke snížení jejich oplozovací schopnosti (Marston a Chang, 1964), produkci nekvalitních embryí (Yanagida et al., 1998) a vyššímu výskytu embryonální mortality (Wilcox et al., 1998) a abnormalit u mláďat (Tarin et al., 1999).

3.2.3.1. Snížená oplozovací schopnost oocytů

K narušení oplozovací schopnosti dochází v důsledku biochemických a funkčních změn, které se v oocyту hromadí během postovulačního stárnutí. Jedná se zejména o předčasnou exocytózu kortikálních granul (Szollosi, 1971) a tvrdnutí *zony pellucidy* (Longo, 1981), což narušuje schopnost interakce *zony pellucidy* se spermii a zahájení akrozomální reakce. Dále dochází ve zvýšené míře k peroxidaci lipidů a snížení fluidity cytoplazmatické membrány, což snižuje pravděpodobnost fúze membrány a spermie (Takahashi et al., 2003).

3.2.3.2. Nízká kvalita embryí a abnormality u mláďat

Embrya pocházející ze starých oocytů vykazují obecně horší kvalitu a opožděný nebo narušený vývoj (Yanagida et al., 1998). Pokles kvality embryí je spojen s cytoplazmatickým stárnutím, které do značné míry omezuje schopnost oocyту podporovat embryonální vývoj, zejména pokud dochází ke změnám ve skladbě proteinů a mRNA (Tarin et al., 2000).

U myších mláďat pocházejících ze starých oocytů byl pozorován zpomalený růst, opožděný vývoj a nižší životaschopnost. Negativní vliv postovulačního stárnutí dále přetrvával u jejich potomků, kteří vykazovali horší reprodukční úspěšnost. U synů byl pozorován zejména vyšší výskyt neplodnosti, u dcer pak prodloužené intervaly mezi porody a nižší počet vrhů a mláďat za život samice. Také v další generaci pak stále docházelo ke vzniku vrozených defektů, vyšší mortalitě před odstavením a nižší váze při odstavení. Předpokladem je, že tyto abnormality mohou vznikat přenosem subpopulace defektních mitochondrií (Tarin et al., 2002). Jiným vysvětlením může být změna epigenetického profilu, což ovlivňuje genovou expresi v embryu (Mayer et al., 2000), protože vlivem stárnutí se významně mění metylační vzor imprintovaných genů v oocyту a vyvíjející se placentě (Liang et al., 2008).

3.3. Oxid uhelnatý jako gasotransmitter

3.3.1. Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou endogenně produkováné signální molekuly plynů. Všechny gasotransmitery mají své specifické enzymy zodpovědné za jejich produkci a také substráty, se kterými reagují. Jedná se o malé molekuly s jednoduchou strukturou a jejich produkce nevyžaduje složité chemické procesy nebo dodávku velkého množství substrátů. Jejich jednoduchá struktura jim umožňuje rychle se pohybovat v intracelulárním i extracelulárním prostoru a volně procházet přes buněčnou membránu. Pro jejich uvolnění z buňky tak není potřeba exocytóza a mohou volně prostupovat do buněk bez nutnosti receptory zprostředkovaného transportu nebo aktivní endocytózy. Mezi významné gasotransmitery patří oxid uhelnatý (CO), oxid dusnatý (NO) a sulfan (H₂S) (Wang, 2002).

Na rozdíl od neurotransmiterů, nejsou gasotransmitery uloženy ve vezikulech a musí tak být v případě potřeby rychle syntetizovány. Oproti klasickým signálním molekulám, které působí prostřednictvím receptorů spřažených s G proteiny nebo tyrozinkinázových receptorů, gasotransmitery své cílové intracelulární substráty chemicky modifikují. Pomocí posttranslačních modifikací jsou schopny vyvolat bezprostřední efekt v cílové buňce (Untereiner et al., 2012).

3.3.2. Oxid uhelnatý a hemoxygenáza

Oxid uhelnatý je bezbarvý plyn, který vzniká při nedokonalém spalování uhlíkatých látek (Goldbaum et al., 1975). V biologických systémech typicky reaguje s kovy hemoproteinů (Piantadosi, 2002). Jedná se o jedovatý plyn, který vstupuje do organismu přes respirační trakt, a jeho převážná část se váže na železo hemoglobinu za vzniku karboxyhemoglobinu. Vlivem zvýšené koncentrace CO v tkáních dále dochází k narušení mitochondriálních funkcí. CO je tak ve vysokých koncentracích pro živé organismy toxický (Goldbaum et al., 1975).

Mezi CO, H₂S a NO existuje několik zásadních rozdílů. CO se váže pouze na přechodné kovy, zatímco NO a H₂S reagují jak s kovy, tak s různými organickými složkami biologických systémů (Fukuto et al., 2012). Na rozdíl od NO a H₂S není CO v těle savců metabolizován a k jeho eliminaci tak dochází pouze vydechováním z plic (Kreck et al., 2001). Z těchto tří plynů je CO nejstabilnějším gasotransmitterem. Vzhledem k tomu,

že postrádá nepárové elektrony a nedochází k jeho disociaci ve vodném roztoku, je velmi málo reaktivní. Díky tomu může CO působit delší dobu a na delší vzdálenosti než NO a H₂S (Untereiner et al., 2012).

Syntéza endogenního CO v organismu je řízena pomocí enzymu hemoxygenázy (HO) a je spojena s katabolismem hemu. Hemoxygenáza katalyzuje oxidační štěpení hemu na biliverdin, CO a železnaté ionty (Fe²⁺). Elektrony využití v této reakci poskytuje NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát)-dependentní cytochromreduktáza. V počáteční fázi je hem oxidován na alfa-metahydroxyhem. V další fázi pak reaguje s kyslíkem a vzniká verdohem a CO (Tenhunen et al., 1969). Verdohem je nakonec převeden na biliverdin, ze kterého působením biliverdin reduktázy vzniká bilirubin (Tenhunen et al., 1970).

Minoritní část endogenního CO může vznikat také z nehemových zdrojů, např. jako vedlejší produkt oxidace lipidů nebo cytochrom P450-dependentního metabolismu xenobiotik (např. metylenchloridu) (Vreman et al., 2000).

Existují tři izoformy hemoxygenázy – HO-1 (indukovatelná forma, známá také jako heat shock protein 32), HO-2 a HO-3 (konstitutivní formy).

HO-1 má cytoprotektivní vlastnosti a k její zvýšené expresi dochází v případě, že je buňka vystavena fyzikálnímu, chemickému nebo oxidačnímu stresu. HO-1 je dále zodpovědná za odbourávání hemoglobinu stárnoucích erytrocytů (Otterbein a Choi, 2000).

Expresce HO-2 není regulována chemickou nebo fyzikální zátěží, ale je aktivována pomocí glukokortikoidů nadledvin (Raju et al., 1997).

HO-3 vzniká alternativním sestřihem primárního transkriptu genu pro HO-2 a výsledný enzym má nižší enzymatickou aktivitu (Hayashi et al., 2004).

HO-1 a HO-2 katalyzují stejnou reakci a vykazují značnou homologii, ale jejich distribuce v tkáních je odlišná (Ryter et al., 2006). Jejich sekvenční homologie aminokyselin je přibližně 40 % (Abraham a Kappas, 2008). Bazální hladina HO-1 se vyskytuje v tkáních, které se pravidelně účastní odbourávání erytrocytů, jako je slezina, játra a kostní dřev. V ostatních tkáních je hladina HO-1 obvykle nízká, ale její exprese může být stimulována širokou škálou stresových podnětů, jako jsou extrémní teploty, ROS, thiolové sloučeniny, těžké kovy, metaloporfyriny, NO a jeho deriváty, metabolity lipidů, nádorové promotory, změny v tenzi kyslíku, některé antioxidanty a cytokiny a endogenní hormony. Mechanismus exprese HO-1 se liší mezi různými živočišnými druhy a buněčnými typy, ale vyskytuje se ve většině tkání a u většiny vyšších obratlovců. CO, který vzniká v důsledku aktivace HO-1, se účastní zejména erytropoézy a antiapoptotických, protizánětlivých a antiproliferativních mechanismů a působí cytoprotektivně (Ryter et al., 2006).

K nejvyšší úrovni exprese HO-2 dochází ve varlatech, nervové soustavě, játrech, endotelu a hladké svalovině. Produkce CO katalyzovaná pomocí HO-2 je častěji spojena s fyziologickými procesy probíhajícími v tkáních, které nejsou vystaveny stresu. Jedná se např. o steroidogenezi, paměť a učení, udržování svalového tonu střev a cév a transport iontů ve střevech (Wu a Wang, 2005).

Reakce katalyzované pomocí HO-1 a HO-2 jsou řízeny identickými kofaktory, ale uplatňují se zde jiné efektorové mechanismy a obě izoformy jsou kódovány odlišnými geny. V důsledku toho mají různé strukturní a funkční vlastnosti (Abraham a Kappas, 2008). Vzhledem k tomu, že ke zvýšené expresi HO-1 dochází vlivem různých stresových faktorů působících na buňku, je pravděpodobné, že degradace hemu zde probíhá také za účelem produkce biliverdinu a bilirubinu, které mají antioxidační vlastnosti. HO-2 pak slouží zejména k podpoře odbourávání hemu za účelem udržení homeostázy železa a vlastní produkce CO (Maines et al., 1986).

3.3.2.1. Interakce oxidu uhelnatého, sulfanu a oxidu dusnatého

Mezi CO, NO a H₂S dochází k četným interakcím. CO může potlačovat ale i stimulovat expresi a aktivitu syntázy oxidu dusnatého (NOS – nitric oxide synthase) prostřednictvím vazby na hemovou část NOS a tím regulovat odpověď tkání na stres (Motterlini et al., 1997). NOS je zodpovědná za tvorbu NO, který zvyšuje expresi HO-1 a tím i produkci CO, přičemž se řadí mezi nejsilnější induktory HO-1 vůbec (Foresti a Motterlini, 1999). Vzhledem k cytoprotektivním vlastnostem HO-1 se tento mechanismus uplatňuje během působení stresu na buňku. Aktivita HO-1 naopak inhibuje expresi NOS. CO funguje jako inhibitor NOS také při vzestupu koncentrace NO nad prahovou hodnotu a podílí se tak na udržování homeostázy (Sawle et al., 2005).

Prostřednictvím H₂S dochází ke zvýšení exprese HO-1 a koncentrace CO (Qingyou et al., 2004). V důsledku zvýšené produkce HO-1 se poté snižuje míra exprese NOS a produkce NO (Oh et al., 2006). H₂S dále inhibuje všechny izoformy NOS a reguluje tím produkci HO-1 a CO (Kubo et al., 2007).

3.3.3. Funkce oxidu uhelnatého v organismu

Dle Wu a Wang (2005) se CO v buňce pravidelně účastní pěti hlavních signálních drah:

1. Aktivace rozpustné guanylátcyklázy (sGC – soluble guanylate cyclase) s odpovídajícím vzestupem intracelulárního cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP – cyclic guanosine monophosphate)
2. Změna membránového potenciálu obvykle prostřednictvím změn v aktivitě kalciem aktivovaných draslíkových kanálů (K_{Ca})
3. Zvýšení nebo snížení účinků NO
4. Modulace enzymatického systému cytochromu P450
5. Změny v aktivitě MAPK

CO se podílí na regulaci produkce ROS z mitochondriálních a cytoplazmatických zdrojů, což je hlavní mechanismus, kterým CO působí na buněčné signální dráhy (Kim et al., 2008). Přechodné zvýšení produkce ROS vyvolané prostřednictvím CO je pravděpodobně zodpovědné za stimulaci antioxidantních enzymů a protektivních genů, protože nutí buňku upravit oxidační rovnováhu a tím snižovat další produkci ROS (Lutter et al., 1985).

Klíčové pro fungování CO v organismu je jeho schopnost regulovat několik typů iontových kanálů. Patří sem zejména kalciem aktivované draslíkové kanály s vysokou vodivostí (BK_{Ca}), některé vápníkové kanály, P2X receptory a epiteliální sodíkové kanály.

V kardiovaskulárním systému CO stimuluje vazorelaxaci cév pomocí aktivace sGC (Ramos et al., 1989), stimulace BK_{Ca} (Dubuis et al., 2005) a aktivace NOS (Foresti et al., 2004).

Prostřednictvím aktivace sGC dochází ke zvýšení hladiny intracelulárního cGMP. V důsledku vzestupu cGMP dochází k vazodilataci cév (Ramos et al., 1989), regulaci metabolismu glukózy (Nikberg et al., 1972), stimulaci protizánětlivých mechanismů (Nizamutdinova et al., 2009) a inhibici apoptózy (Liu et al., 2002).

Otevřením BK_{Ca} dochází k hyperpolarizaci, což vede k uzavření napětím řízených vápníkových kanálů, eliminaci intracelulárního vápníku a vazodilataci. Signalizace CO zprostředkovává aktivaci BK_{Ca} např. v hladké svalovině tepen (Wang et al., 1997) a žilních endoteliálních buňkách (Williams et al., 2004). CO je dále důležitý např. pro vazodilataci

aferentních ledvinných arteriol (Botros a Navar, 2006), snižuje intrahepatální vaskulární rezistenci a zvyšuje průtok krve v játrech postižených cirhózou (Van Landeghem et al., 2009).

Při oxidačním stresu může CO působit naopak jako vazokonstriktor. Působením antioxidantů se CO mění zpět na vazodilatátor. Redoxní rovnováha buňky tak může mít rozhodující vliv na to, zda bude CO působit vazokonstrikčně nebo vazodilatačně, což mu umožňuje podílet se na udržování vaskulárního tonu (Lamon et al., 2009). Kromě vazodilatace může CO udržovat správný průtok krve inhibicí agregace trombocytů v místě poškození cév (Wagner et al., 1997).

Vliv CO na apoptózu se liší dle typu tkáně a buňky. Antiapoptotický efekt CO byl prokázán např. v endoteliálních buňkách (Brouard et al., 2000), hladkosvalových buňkách (Liu et al., 2002), hepatocytech (Choi et al., 2003), fibroblastech (Petrache et al., 2000) a kardiomyocytech (Clark et al., 2003). V případě fibroblastů (Zhou et al., 2005) a hladkosvalových buněk (Peyton et al., 2002) byl pozorován také efekt proapoptotický. CO se dále podílí na regulaci buněčného cyklu a proliferace hladkosvalových buněk (Durante et al., 2006).

CO působí protizánětlivě prostřednictvím inhibice prozánětlivých enzymů a cytokinů a regulace aktivity příslušných signálních molekul, jako je MAPK, sGC a hypoxií indukovaný faktor-1 (HIF-1 – hypoxia-inducible factor-1) (Untereiner et al., 2012). Dále snižuje míru adheze leukocytů k cévní stěně, migrace neutrofilů do míst zánětu (Pae et al., 2004) a aktivace makrofágů (Fujita et al., 2001) a inhibuje uvolňování histaminu z mastocytů a aktivaci bazofilů (Otterbein et al., 2000).

CO hraje důležitou roli také v regulaci nervového systému. Reguluje např. cirkadiánní rytmus, adaptaci na pачy, paměť a změny chování. Neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, roztroušená skleróza) negativně působí na produkci CO, který může působit jako neuroprotektivum. CO chrání buňky nervového systému před produkcí ROS a nadměrnou syntézou NO (Mahan, 2012).

3.3.3.1. Oxid uhelnatý v reprodukci

Přítomnost HO byla prokázána také v orgánech a tkáních zodpovědných za steroidogenezi (Maines, 1992). HO se podílí na steroidogenezi pravděpodobně prostřednictvím regulace aktivity a koncentrace enzymatického systému cytochromu P450. Existuje zde také vztah mezi steroidogenezí a metabolismem hemu, kdy se změny v biosyntéze a degradaci hemu odráží v koncentraci cytochromu P450 (Kutty et al., 1988).

Varlata patří mezi orgány s nejintenzivnější aktivitou HO. HO-1 je exprimována zejména v zárodečných buňkách, intersticiálních makrofázích a Sertoliho a Leydigových buňkách. HO-2 se vyskytuje v subpopulaci zralých zárodečných buněk. Aktivita a distribuce obou izoform je významně ovlivněna různými stresovými faktory (Ozawa et al., 2002). Během stresu se zvyšuje exprese HO-1 v Leydigových buňkách, které využívají systém HO-1/CO pravděpodobně pro omezení počtu zárodečných buněk pomocí apoptózy. Apoptóza zprostředkovaná CO se tak pod vlivem stresorů podílí na vzniku oligospermie (Maines a Ewing, 1996). Množství HO-2 naopak klesá v důsledku úbytku zárodečných buněk (Ozawa et al., 2002). CO ve varlatech dále zprostředkovává relaxaci myofibroblastů, které se účastní regulace peristaltiky semenotvorných kanálků, což je nutné pro transport spermií (Middendorff et al., 2000).

Přítomnost HO byla prokázána v neuronech i ostatních buňkách dolních cest močových prasete a CO zde vyvolává relaxaci hladké svaloviny močové trubice spojenou s malým vzestupem hladiny cGMP (Werkström et al., 1997). CO se dále podílí na reflexní aktivitě *musculus bulbospongiosus*. Jedná se o sval, který u samců napomáhá vypuzení moči a ejakulátu z močové trubice a ovlivňuje také erekci (Burnett et al., 1998). U myši s delecí genu pro HO-2 dochází ke zpoždění ejakulace (Abdel-Hamid, 2004) a narušení funkce *m. bulbospongiosus* (Burnett et al., 1998).

Systém HO/CO pravděpodobně hraje důležitou roli také během erekce. U krysu byla HO-2 nalezena v endotelu vystylajícím venózní prostory topořivého těla a v adventiciích a buňkách obklopujících tepny penisu. S přibývajícím věkem se obsah HO-2 snižuje, což může být spojeno s poruchami erekce (Hu a Han, 2006).

U samic byla HO pozorována v důležitých strukturách vaječníku (granulózní a thekální buňky, žluté tělísko a ovariální stroma) (Alexandreaanu a Lawson, 2003), děloze, trofoblastu (Acevedo a Ahmed, 1998) a placentě (Lyall et al., 2000).

HO-1 je důležitá pro vývoj oocytů, ovulaci, vznik žlutého tělísko a také oplozovací schopnost oocytu. U myši s delecí genu pro HO-1 byla pozorována výrazně nižší produkce

oocytů a oocyty byly méně oplozeníschopné (Zenclussen et al., 2012). Po ovulaci se v luteinizující tkáni nachází imunitní buňky, zejména makrofágy a eozinofily. Přítomnost HO-1 zde může představovat důležitý protizánětlivý mechanismus. HO-1 působí cytoprotektivně a protizánětlivě také při prasknutí folikulu během ovulace (Richards et al., 2002). Nedostatek HO-1 má negativní vliv také na březost, což souvisí s nižším počtem a horší kvalitou žlutých tělísek (Zenclussen et al., 2012).

Exprese HO-1 během cyklu je regulována pomocí hormonů. V nejvyšší míře se HO-1 exprimuje během říje samice, což je klíčové pro implantaci blastocysty (Zenclussen et al., 2014). HO-1 se exprimuje v trofoblastu embrya i endometriu dělohy a podporuje včasné uchycení blastocysty. HO-1 dále reguluje následnou diferenciaci trofoblastu a placentaci (Zenclussen et al., 2011).

V lidské placentě byla ve vysokém množství nalezena zejména HO-2 a její koncentrace postupně dále stoupá s postupujícím těhotenstvím. Kromě placenty se nachází také v plodových obalech, buňkách trofoblastu, endotelu a hladké svalovině cév (Yoshiki et al., 2000). Regulace HO v placentě z velké části závisí na lokální koncentraci kyslíku (Appleton et al., 2002) a glukózy (Appleton et al., 2003). Tepny fetoplacentární jednotky jsou udržovány ve stavu téměř maximální dilatace kvůli snazší dodávce kyslíku a živin (Boura a Walters, 1991). Placenta postrádá inervaci a je proto odkázána na lokální a oběhové vazoaktivní látky (Reilly a Russell, 1977). Vzhledem k množství HO v placentě a vazodilatačním vlastnostem CO je pravděpodobné, že se CO podílí na udržování správného vaskulárního tonu během celého období gravidity (Lyll et al., 2000). Kromě toho zvyšuje také průtok krve placentou (Farley et al., 2004).

Množství HO-1 a HO-2 se během gravidity zvyšuje i v myometriu. Koncentrace HO-1 zde stoupá také působením progesteronu (Acevedo a Ahmed, 1998). Intenzivní produkce progesteronu tak může být důvodem vysokého množství HO-1 ve žlutém tělísku (Alexandreaanu a Lawson, 2003).

CO se v placentě dále podílí na inhibici nadměrné aktivace zánětlivých a apoptotických procesů (Bainbridge a Smith, 2005) a udržování rovnováhy oxidantů a antioxidantů (Kiely et al., 1999).

4. Materiál a metody

4.1. Získávání a kultivace oocytů

Oocyty byly aspirovány z vaječníků odporažených prepubertálních prasniček v neznámé fázi estrálního cyklu. Vaječníky byly transportovány v termo lahvích s fyziologickým roztokem (0,9% chlorid sodný) o teplotě 39 °C do laboratoře Katedry veterinárních disciplín a zpracovány byly do 2 hodin po odběru. V laboratoři pak byly vaječníky dezinfikovány ethanolem a folikulární tekutina s oocyty byla aspirována z folikulů o velikosti 2–5 mm pomocí injekční stříkačky (10 ml, Lauer solo, B. Braun) s jehlou 20 G (Sterican, Braun Melsungen, Germany). Folikulární tekutina byla vypuštěna do Petriho misky (Nunc, Roskilde, Denmark) a oocyty z ní byly vybírány pod binokulární lupou pomocí skleněné pipety. Pro kultivaci byly selektovány plně dorostlé oocyty s kompaktním kumulárním obalem a neporušenou cytoplazmou.

Před kultivací byly oocyty třikrát propláchnuty v modifikovaném kultivačním médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Oocyty byly kultivovány ve vícejamkových destičkách 4-well multidish (Nunc, Denmark) v 1 ml média M199, které obsahuje v 1 ml 0,6 mg laktátu vápenatého, 0,039 ml 7% roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 0,025 mg gentamicinu, 0,25 mg pyruvátu sodného, 1,5 mg HEPES, gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 I.U. : 6,6 I.U./ml (P.G. 600, Intervet, Holland) a 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL, Life Technologies, Deutsdsland). Médium bylo vždy přefiltrováno a min. 30 minut temperováno v termoboxu, kde probíhala i samotná kultivace oocytů a to v podmínkách řízené atmosféry 5 % CO₂ ve směsi se vzduchem při 39 °C po dobu 44–48 hodin do stádia MII. Poté byl oocytům protahováním skleněnou pipetou odstraněn kumulární obal. Oocyty byly poté vystaveny prodloužené kultivaci v médiu M199 po dobu 24, 48 a 72 hodin.

4.2. Imunolokalizace HO-1 a HO-2

K experimentu byly získány oocyty ve třech stádiích stárnutí dle délky prodloužené kultivace (24, 48 a 72 hodin). Před vlastní imunolokalizací HO-1 a HO-2 byly oocyty svléknuty ze zony *pellucida*, aby mohlo docházet k penetraci protilátek proti HO-1 a HO-2 do cytoplazmy. *Zona pellucida* byla odstraněna pomocí 0,1% pronázy v PBS-PVA. Oocyty byly poté 1–2 minuty oplachovány ve třech kapkách 0,1% BSA v PBS a následně fixovány

v 2,5% roztoku paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě. Fixace probíhala celkem 1 hodinu, přičemž po 30 minutách byl fixační roztok vyměněn za čerstvý.

Oocyty byly dále po dobu 2 hodin vystaveny účinku permeabilizačního roztoku, který obsahuje 0,5 ml 10% Triton X-100, 10 ml PBS a 0,2 ml 5% BSA. Roztok byl vyměněn za čerstvý po 5 minutách a po 1 hodině.

Po permeabilizaci byly oocyty opláchnuty v 10 ml PBS a 0,1% Tweenu 20 a inkubovány za přítomnosti primární monoklonální protilátky anti-HO-1 nebo anti-HO-2 (ABNOVA, Taiwan). Inkubace probíhala přes noc (14–16 hodin) ve vlhku a při teplotě 4 °C v inkubačním médiu, které obsahuje 0,1% BSA a 0,01% Tween 20 v PBS. Protilátky byly naředěny na koncentraci 1 µg na 100 µl. Po inkubaci byly oocyty třikrát vždy po dobu 10 minut promývány v roztoku o složení 0,1% Tweenu 20 v PBS, aby byly odstraněny nenavázané protilátky.

Aby došlo ke zviditelnění primární protilátky, probíhala další inkubace se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC) (Sigma-Aldrich). Protilátka byla zředěna na koncentraci 1 µg na 1000 µl. Inkubace probíhala při zatemnění v laboratorní teplotě v roztoku 0,1% BSA a 0,01% Tweenu 20 v PBS po dobu 1 hodiny. Oocyty byly po inkubaci opět třikrát po dobu 10 minut promývány v roztoku 0,1% Tweenu 20 v PBS.

Po promytí byly oocyty 15 minut ponechány v 0,1% roztoku BSA v PBS. Poté byl pomocí barviva Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) po dobu 10 minut v 0,1% roztoku BSA v PBS označen chromatin oocytů. Po obarvení byly oocyty opláchnuty v 0,1% roztoku BSA v PBS.

Oocyty byly následně opláchnuty v ekvilibračním pufru a přeneseny na podložní sklíčko v kapce glycerolu v PBS. Na podložní sklíčko bylo poté připevněno krycí sklíčko. Preparáty byly snímány na konfokálním skenovacím mikroskopu (Zeiss, Germany) a intenzita signálu byla vyhodnocena analýzou obrazu v programu NIS Elements.

4.3. Statistické vyhodnocení

Všechny experimenty byly min. třikrát zopakovány. Data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA verze 12 a pro vyhodnocení statistických rozdílů byla použita metoda ANOVA. Byla hodnocena relativní intenzita signálu ve všech stádiích stárnutí oocytů, vždy zvlášť pro HO-1 a HO-2. Relativní hodnoty byly srovnávány

s hodnotami získanými z oocytů ve stádiu MII, které byly brány jako 100%. Za statisticky významný rozdíl byla považována hodnota na hladině významnosti $\alpha (H_0) < 0,05$.

4.4. Experimentální schéma

K jednotlivým experimentům byla provedena kontrola průběhu meiotického zrání oocytů. Pro hodnocení byly použity experimenty, ve kterých více než 85 % oocytů dosáhlo po 48 hodinách kultivace metafáze druhého meiotického dělení.

Experiment č. 1: Lokalizace HO-1 během stárnutí prasečích oocytů

První experiment se týkal zjišťování intracelulární lokalizace enzymu HO-1 během stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly rozděleny do tří skupin podle délky prodloužené kultivace, tj. 24, 48 a 72 hodin. HO-1 byla lokalizována imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metody 4.2.). Preparáty byly následně snímány na konfokálním skenovacím mikroskopu (Zeiss, Germany) a intenzita signálu byla vyhodnocena analýzou obrazu v programu NIS Elements. Relativní intenzita signálu byla hodnocena v perichromozomální oblasti, cytoplazmě a korové oblasti. Získané hodnoty z jednotlivých oblastí v daných stádiích stárnutí byly vzájemně porovnávány statistickou metodou ANOVA.

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde kontrolní skupina oocytů byla inkubována pouze se sekundární protilátkou, aby bylo možné vyloučit nespecifickou vazbu v oocytech. Pro hodnocení byly použity experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál.

Experiment č. 2: Lokalizace HO-2 během stárnutí prasečích oocytů

Druhý experiment se týkal zjišťování intracelulární lokalizace HO-2 během stárnutí prasečích oocytů. Stejně jako v experimentu č. 1 byla HO-2 lokalizována imunocytochemickou metodou (viz Materiál a metody 4.2.) a preparáty snímány na konfokálním skenovacím mikroskopu (Zeiss, Germany). Intenzita signálu byla vyhodnocena analýzou obrazu v programu NIS Elements. Z důvodu rovnoměrného rozmístění signálu HO-2 byla hodnocena pouze průměrná intenzita signálu v celých oocytech.

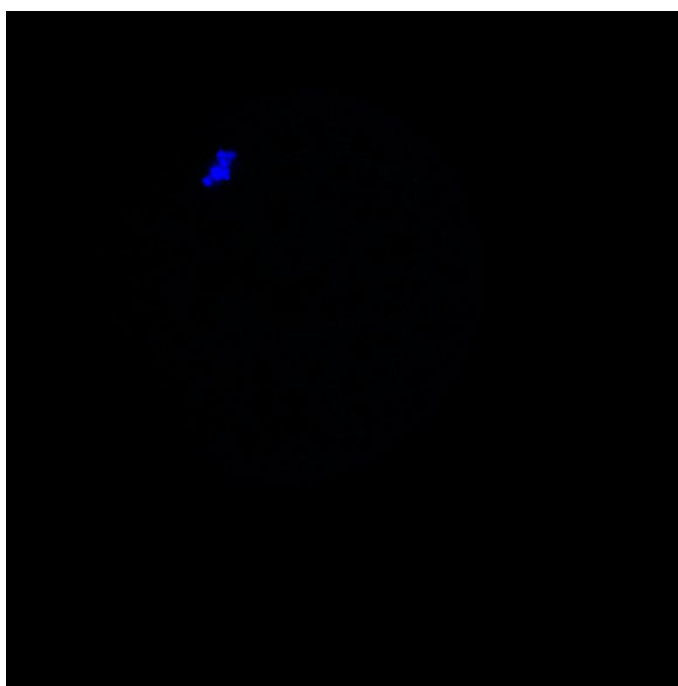
Získané hodnoty v daných stádiích stárnutí byly vzájemně porovnávány statistickou metodou ANOVA.

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde kontrolní skupina oocytů byla inkubována pouze se sekundární protilátkou, aby bylo možné vyloučit nespecifickou vazbu v oocytech. Pro hodnocení byly použity experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál.

5. Výsledky

Experiment č. 1: Lokalizace HO-1 během stárnutí prasečích oocytů

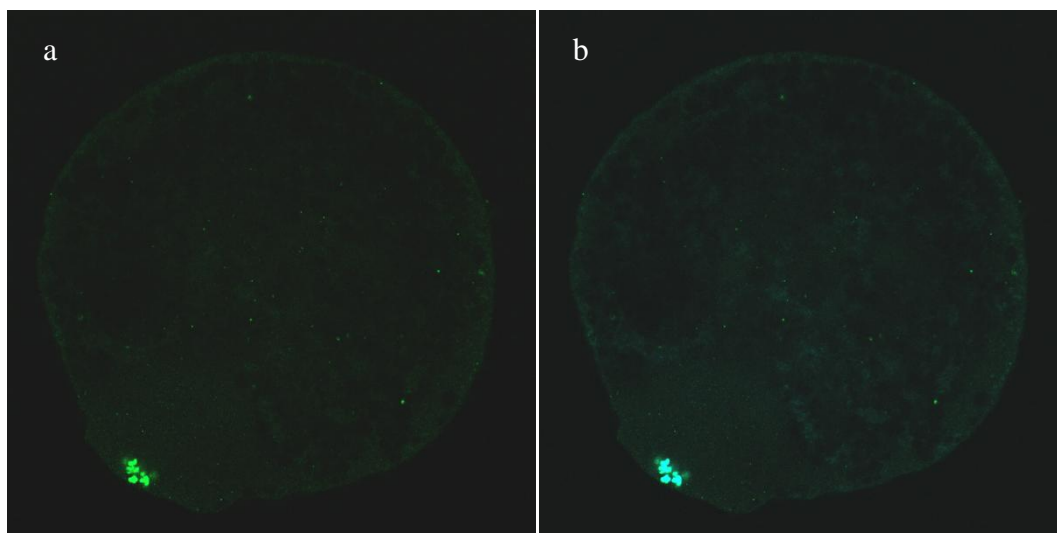
K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde byla kontrolní skupina oocytů inkubována pouze se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC), aby bylo možné vyloučit nespecifickou vazbu v oocytech. Pro konečné hodnocení byly použity experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál. Příklad negativní kontroly je uveden na obr. č. 1 (MII).



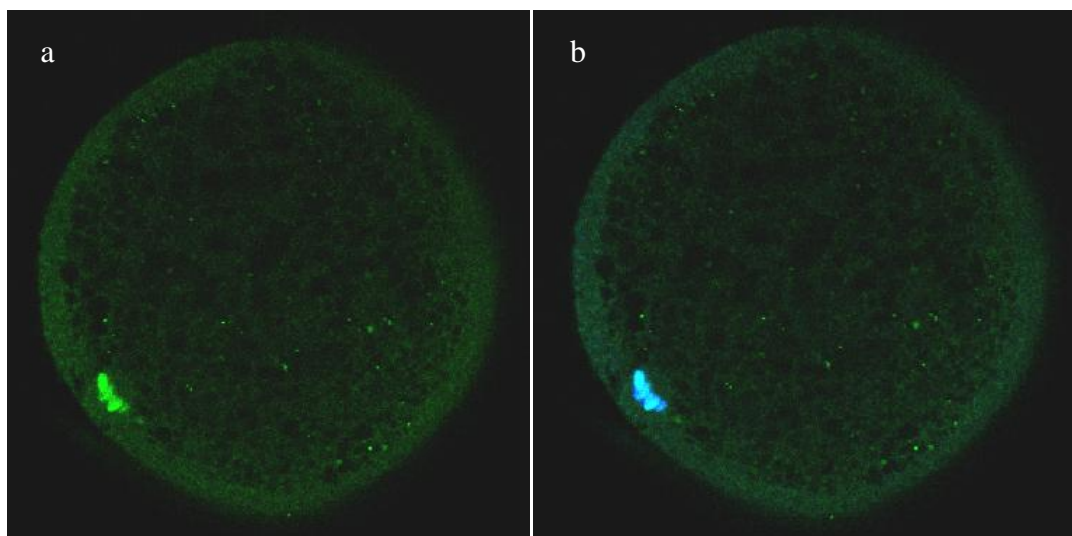
Obr. č. 1: Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.

Detekce a intracelulární lokalizace HO-1 během stárnutí prasečích oocytů.

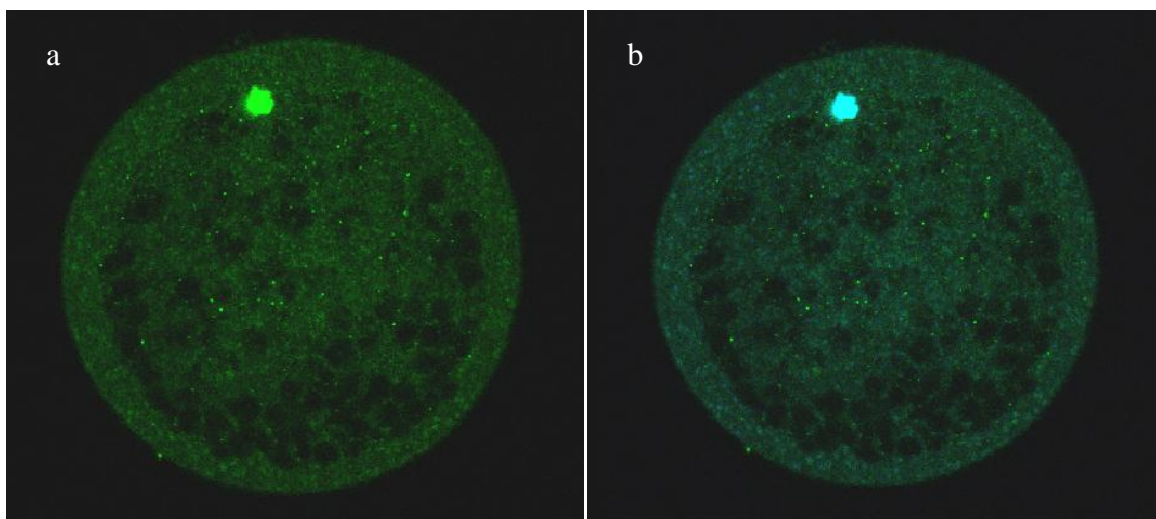
HO-1 byla detekována ve všech stádiích stárnutí a ve všech hodnocených oblastech. Vyhodnocením intenzity signálu bylo zjištěno, že intracelulární lokalizace převládá v perichromozomální oblasti oocytů. Výsledky detekce a intracelulární lokalizace HO-1 jsou uvedeny na obr. č. 2–5.



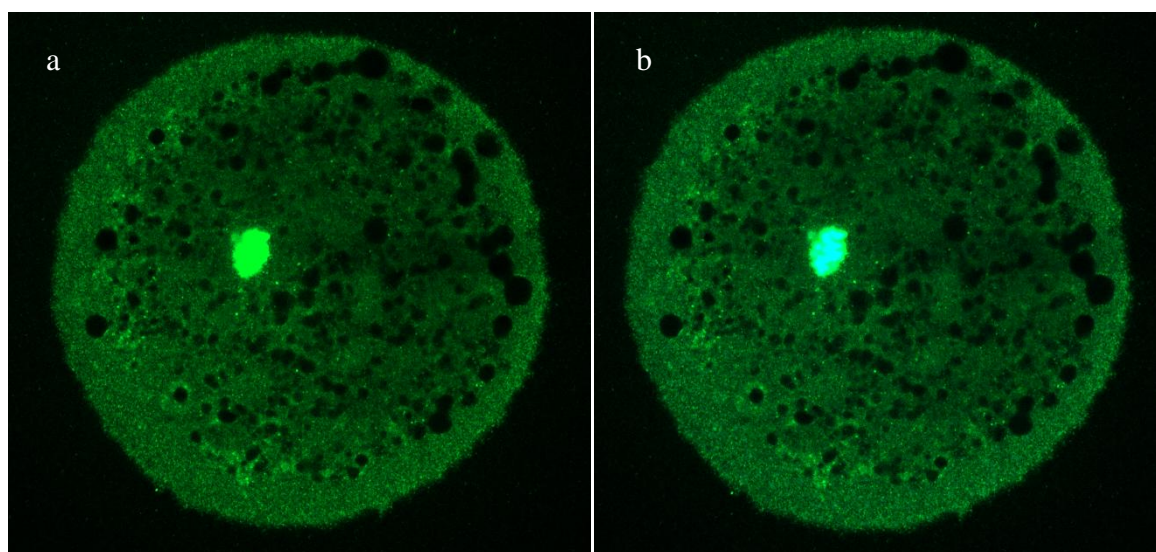
Obr. č. 2: Detekce a lokalizace HO-1 v oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení: a) enzym HO-1 značen zeleně (FITC); b) enzym HO-1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



Obr. č. 3: Detekce a lokalizace HO-1 v oocyty po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin: a) enzym HO-1 značen zeleně (FITC); b) enzym HO-1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



Obr. č. 4: Detekce a lokalizace HO-1 v oocytu po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin: a) enzym HO-1 značen zeleně (FITC); b) enzym HO-1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



Obr. č. 5: Detekce a lokalizace HO-1 v oocytu po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin: a) enzym HO-1 značen zeleně (FITC); b) enzym HO-1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.

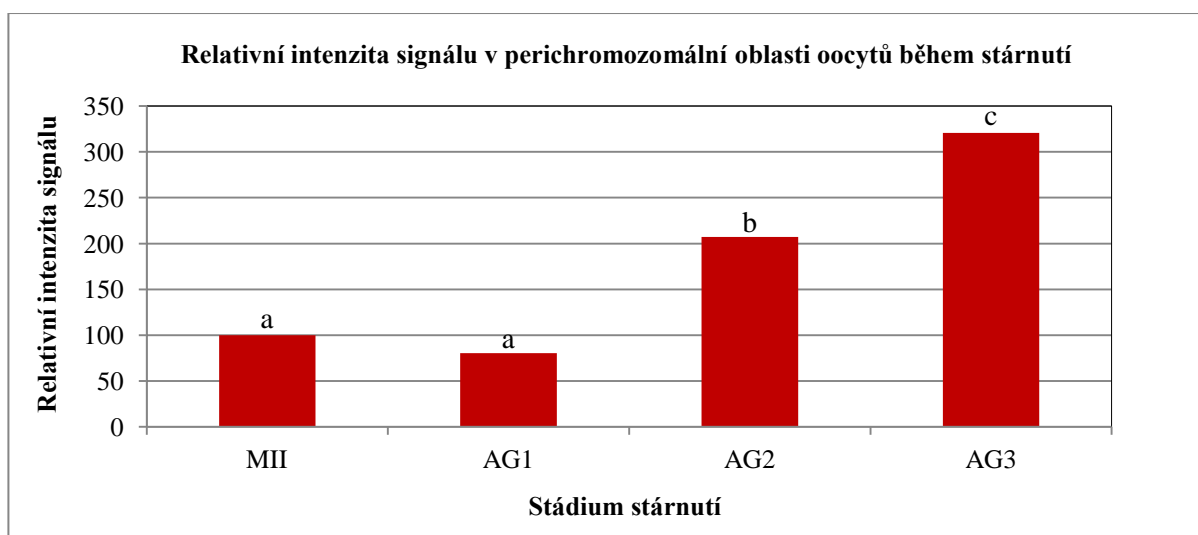
Statistické vyhodnocení lokalizace HO-1 během stárnutí prasečích oocytů.

Analýzou relativní intenzity signálu v perichromozomální oblasti během stárnutí prasečích oocytů bylo vyhodnoceno statisticky významné zvýšení relativní intenzity signálu mezi skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin (AG1) a 48 hodin (AG2) a dále mezi skupinou AG2 a oocyty stárnoucími 72 hodin (AG3). Změna v relativní intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MII a skupinou AG1 nebyla statisticky významná (graf č. 1).

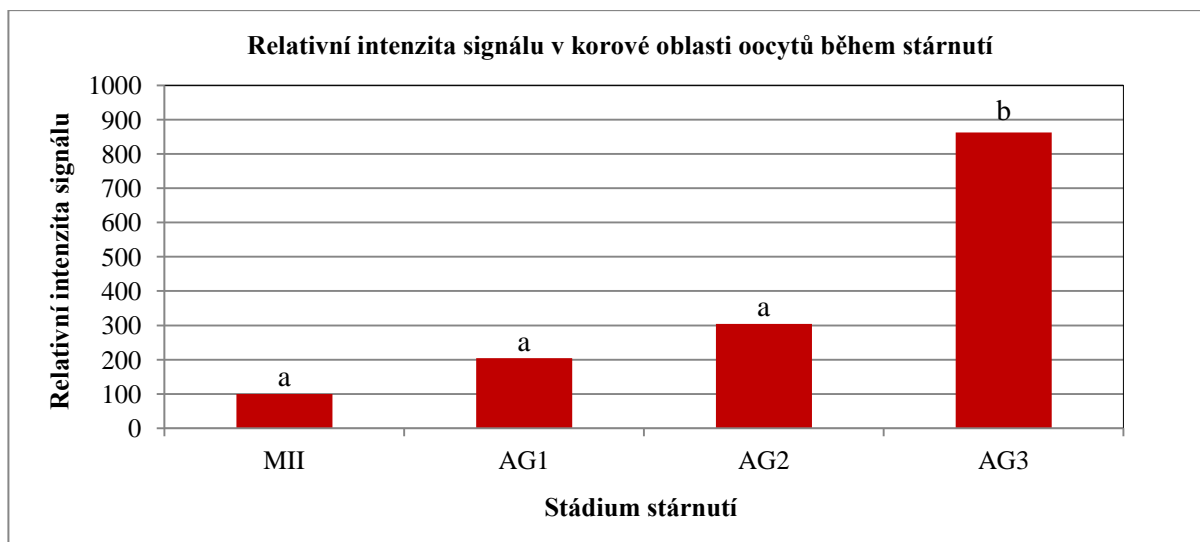
V korové oblasti docházelo k největšímu nárůstu relativní intenzity signálu u skupiny AG3. Statisticky významný rozdíl byl vyhodnocen mezi hodnotou intenzity signálu v korové oblasti těchto oocytů a skupinou AG1 a MII (graf č. 2).

V oblasti cytoplazmy bylo vyhodnoceno statisticky významné zvýšení relativní intenzity signálu pouze mezi MII a AG3 (graf č. 3).

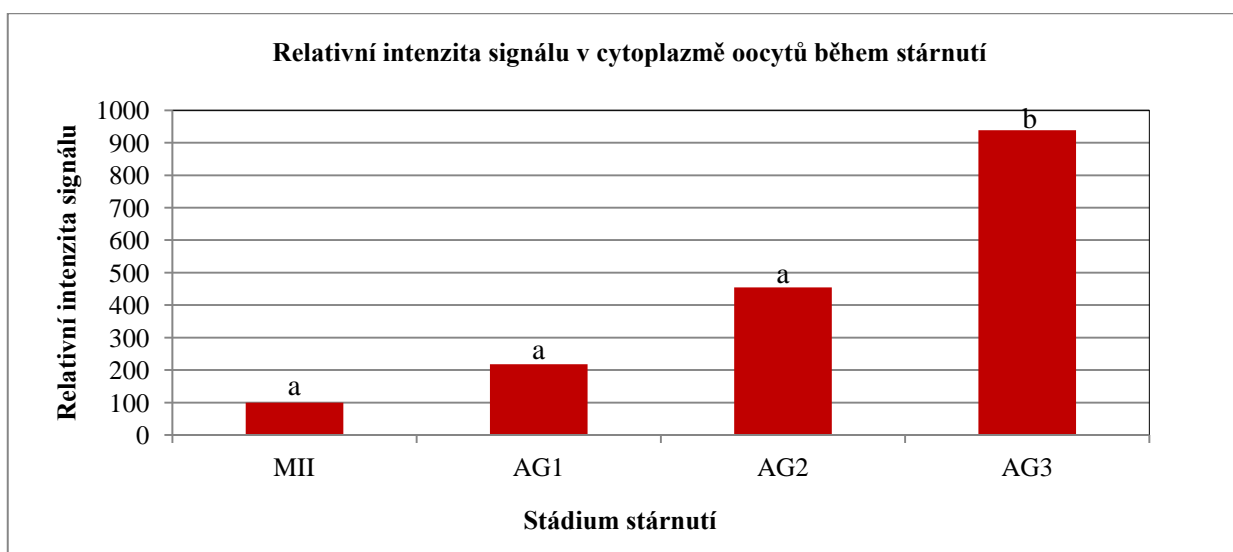
Vyhodnocením průměrné relativní intenzity signálu HO-1 během stárnutí prasečích oocytů bylo zjištěno statisticky významné zvýšení intenzity signálu mezi skupinou AG1 a AG2 a dále mezi skupinou AG2 a AG3. Změna v relativní intenzitě signálu mezi stádiem MII a skupinou AG1 nebyla statisticky významná (graf č. 4).



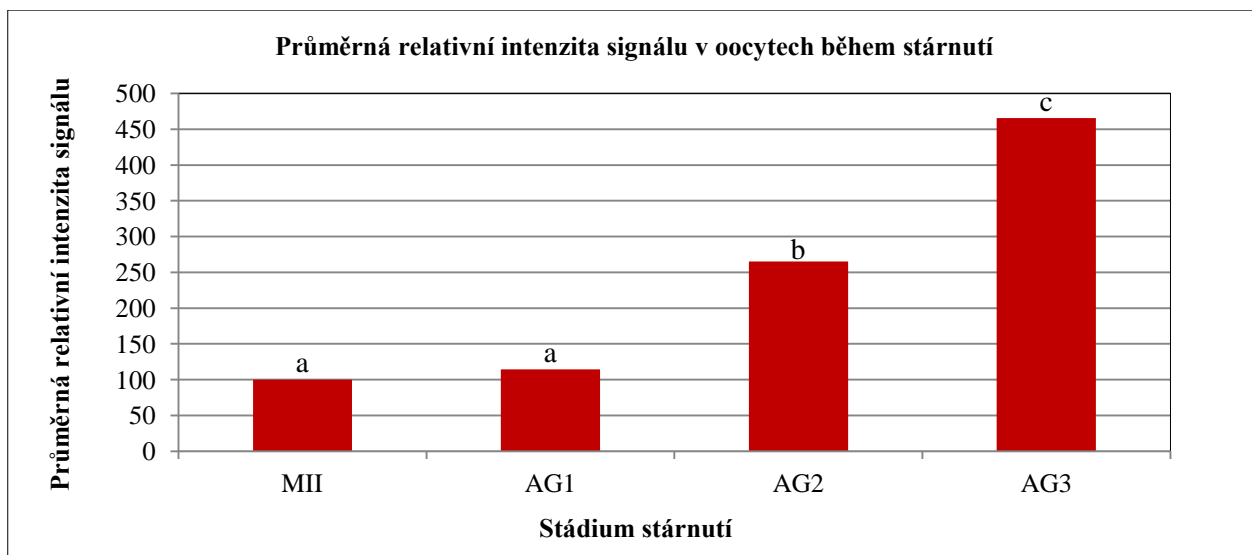
Graf č. 1: Hodnoty relativní intenzity signálu HO-1 v perichromozomální oblasti během stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaženy k intenzitě signálu v perichromozomální oblasti oocytů ve stádiu MII. ^{abc}Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii stárnutí.



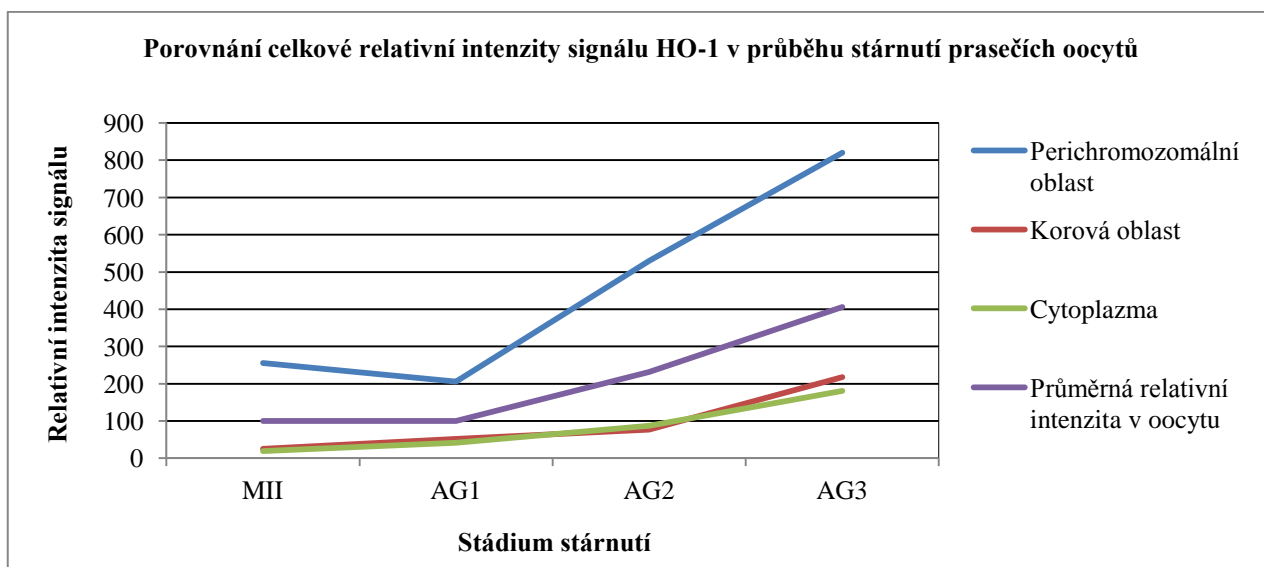
Graf č. 2: Hodnoty relativní intenzity signálu HO-1 v korové oblasti během stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaheny k intenzitě signálu v korové oblasti oocytů ve stádiu MII. ^{abc} Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii stárnutí.



Graf č. 3: Hodnoty relativní intenzity signálu HO-1 v cytoplazmě během stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaheny k intenzitě signálu v cytoplazmě oocytů ve stádiu MII. ^{abc} Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii stárnutí.



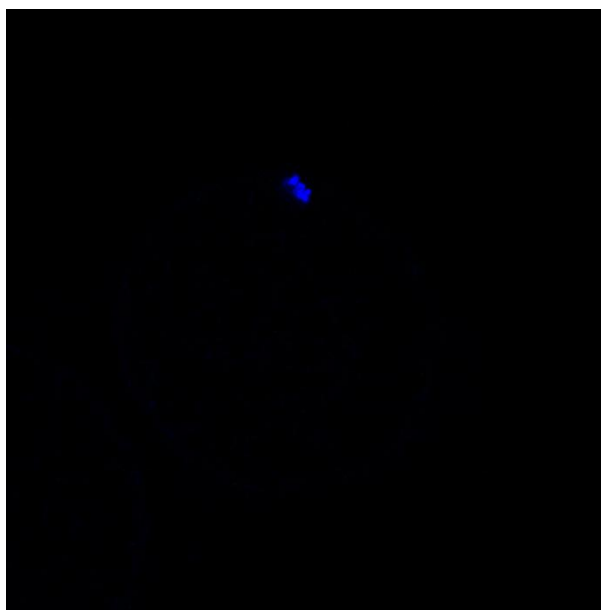
Graf č. 4: Hodnoty průměrné relativní intenzity signálu HO-1 v oocytech během stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaženy k průměrné relativní intenzitě signálu v oocytech ve stádiu MII. ^{abc} Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii stárnutí.



Graf č. 5: Porovnání průměrné relativní intenzity signálu HO-1 v perichromozomální oblasti, korové oblasti a cytoplazmě a v oocytech celkem v průběhu stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaženy k průměrné relativní intenzitě signálu v oocytech ve stádiu MII.

Experiment č. 2: Lokalizace HO-2 během stárnutí prasečích oocytů

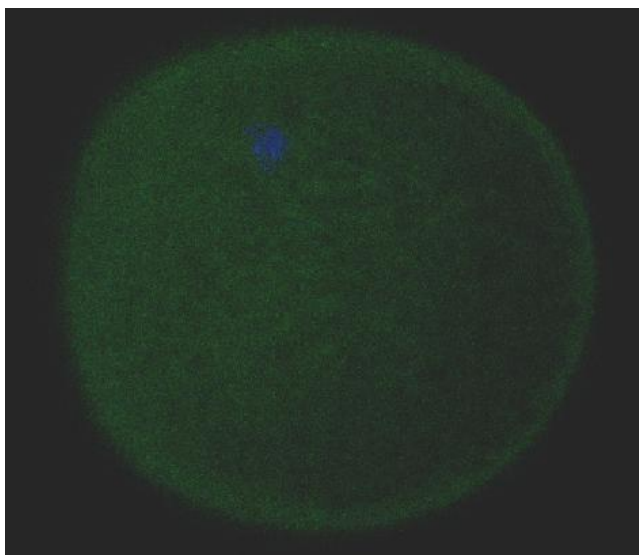
K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde byla kontrolní skupina oocytů inkubována pouze se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC), aby bylo možné vyloučit nespecifickou vazbu v oocytech. Pro konečné hodnocení byly použity experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál. Příklad negativní kontroly je uveden na obr. č. 6 (MII).



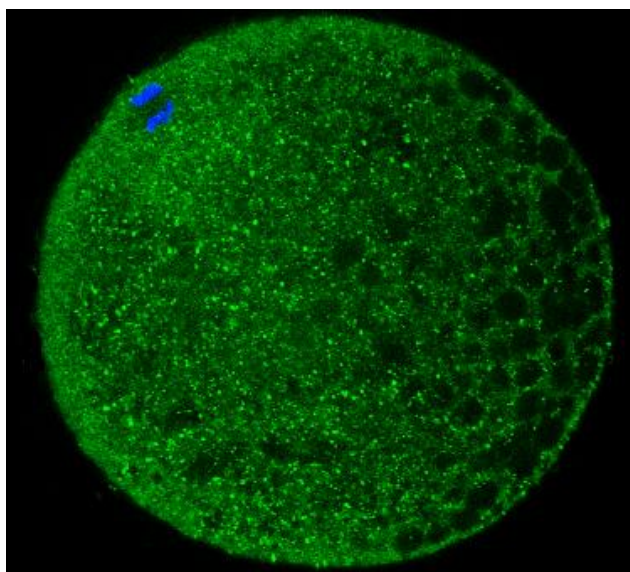
Obr. č. 6: Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti-mouse IgG konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.

Detekce a intracelulární lokalizace HO-2 během stárnutí prasečích oocytů.

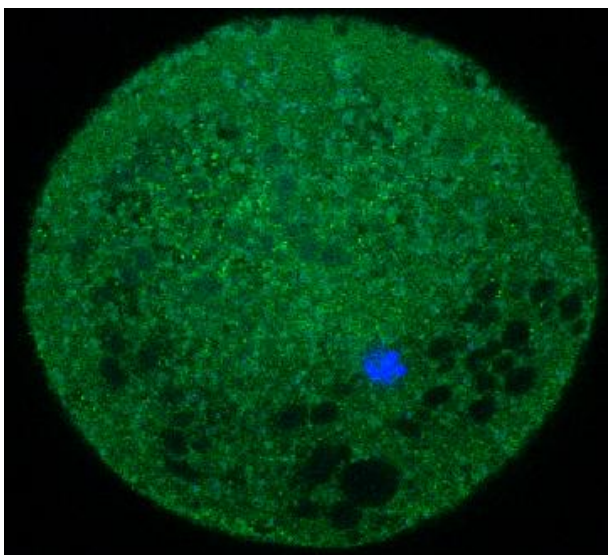
HO-2 byla lokalizována ve všech stádiích stárnutí. V porovnání s HO-1 byl detekován výrazně silnější signál, který je rovnoměrně rozmístěn po celém oocytu. Výsledky detekce a intracelulární lokalizace HO-2 jsou uvedeny na obr. č. 7–10.



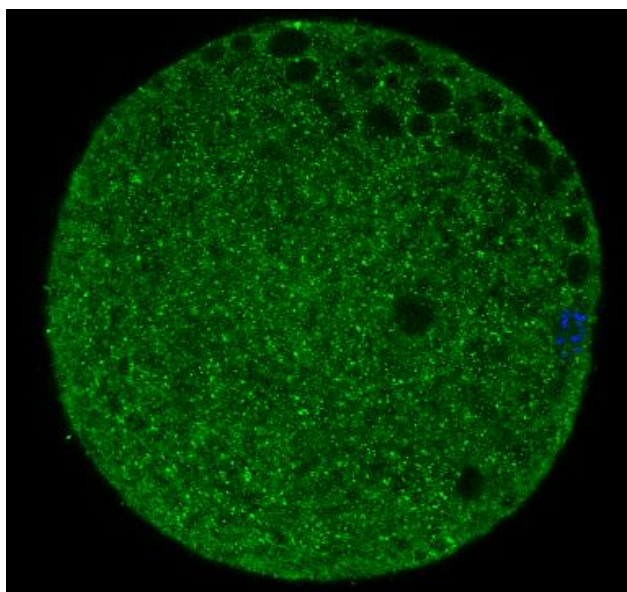
Obr. č. 7: Detekce a lokalizace HO-2 v oocytu ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení: enzym HO-2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



Obr. č. 8: Detekce a lokalizace HO-2 v oocytu po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin: enzym HO-2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



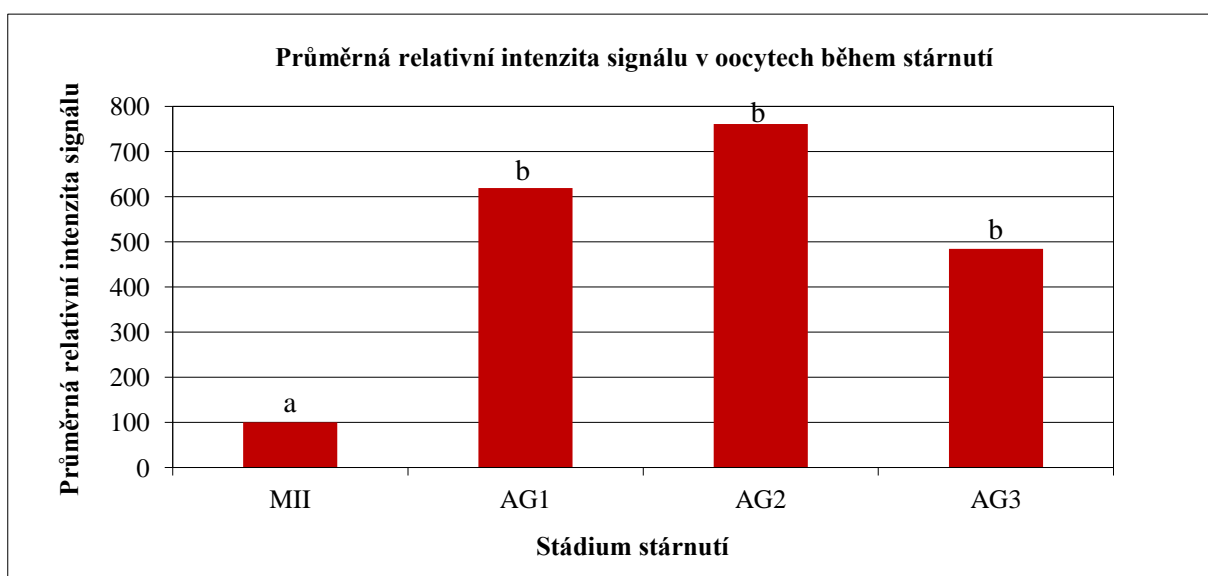
Obr. č. 9: Detekce a lokalizace HO-2 v oocytu po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 48 hodin: enzym HO-2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.



Obr. č. 10: Detekce a lokalizace HO-2 v oocytu po vystavení prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin: enzym HO-2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany), zvětšeno 400×.

Statistické vyhodnocení lokalizace HO-2 během stárnutí prasečích oocytů.

Analýzou relativní intenzity signálu během stárnutí prasečích oocytů bylo vyhodnoceno statisticky významné zvýšení relativní intenzity signálu mezi MII a oocyty vystavenými prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin. V následujících fázích stárnutí pak již nedochází ke statisticky významným změnám v relativní intenzitě signálu, tj. nejsou zde významné rozdíly mezi oocyty stárnoucími 24, 48 a 72 hodin. Vzhledem k rovnoměrnému rozmístění signálu HO-2 v oocytech nebyly statisticky hodnoceny jednotlivé oblasti zvlášť, ale pouze průměrná intenzita signálu v celých oocytech (graf č. 6).



Graf č. 6: Hodnoty průměrné relativní intenzity signálu HO-2 v oocytech během stárnutí prasečích oocytů. Relativní hodnoty jsou vztaženy k průměrné relativní intenzitě signálu v oocytech ve stádiu MII. ^{abc}Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii stárnutí.

6. Diskuze

System HO/CO se uplatňuje v regulaci důležitých reprodukčních funkcí. V samčí reprodukční soustavě je nejlépe prostudována úloha CO při erekci. HO-2 byla identifikována v kavernózním tělese penisu u krys (Ushiyama et al., 2004) i lidí (Hedlund et al., 2000). CO je nezbytný také při ejakulaci, kde se podílí na relaxaci svaloviny močové trubice (Werkström et al., 1997). CO se dále účastní produkce gonadotropních hormonů (Lamar et al., 1996) a pohlavních steroidů (Maines, 1992) a regulace spermatogeneze. HO-1 se nachází zejména v Sertoliho buňkách, zatímco v pohlavních buňkách je lokalizována především HO-2 (Ewing a Maines, 1995). Hlavní úlohou CO během spermatogeneze je ochrana spermií před volnými radikály (Ozawa et al., 2002). U člověka byl prokázán pozitivní vliv HO na motilitu spermií a správný průběh spermatogeneze. Nedostatečná syntéza CO ve varlatech je tak spojována s neplodností (Aziz et al., 2008).

U samic je CO nezbytný pro normální funkci estrálního cyklu, porod a laktaci. CO produkovaný v hypothalamu tlumí syntézu oxytocinu a stimuluje produkci ovariálních steroidů a tím se podílí na regulaci sekrece progesteronu a androstendionu (Alexandreaanu a Lawson, 2003). HO-1 je pak důležitá pro vývoj oocytů, ovulaci, vznik žlutého tělíska a oplozovací schopnost oocytu (Zenclussen et al., 2012). HO-1 i HO-2 jsou exprimovány i v děloze a jejich aktivita během gravidity stoupá. CO zde potlačuje kontrakce hladké svaloviny a reguluje průtok krve placentou. Při snížené produkci CO v děloze dochází v důsledku hromadění volných radikálů k zánětlivým procesům (Bainbridge a Smith, 2005).

Cílem práce bylo lokalizovat HO-1 a HO-2 v prasečích oocytech během jejich prodloužené kultivace v *in vitro* podmínkách a prokázat změny v expresi obou izoform. Vyhodnocením experimentů týkajících se detekce a intracelulární lokalizace HO-1 a HO-2 byla ve stárnoucích oocytech prokázána přítomnost obou izoform a také změny v jejich expresi. HO-1 i HO-2 se exprimují ve všech zkoumaných oblastech, tj. v perichromozomální oblasti, korové oblasti a v cytoplasmě.

V případě HO-1 převažovala intracelulární lokalizace v perichromozomální oblasti oocytů. Signál HO-2 byl rovnoměrně rozmístěn po celém oocytu a oproti HO-1 byla intenzita signálu výrazně silnější. Lze tedy předpokládat, že izoforma HO-1 se v oocytech během stárnutí nachází v menším množství než HO-2.

Oocyty byly rozděleny do tří skupin dle délky prodloužené kultivace, tj. 24, 48 a 72 hodin. Vyhodnocením průměrné relativní intenzity signálu HO-1 během stárnutí oocytů bylo zjištěno statisticky významné zvýšení intenzity signálu mezi oocyty vystavenými prodloužené

kultivaci po dobu 24 hodin a oocyty stárnoucími 48 hodin. K dalšímu statisticky významnému navýšení signálu pak docházelo mezi oocyty stárnoucími 48 hodin a skupinou oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin. Změna v relativní intenzitě signálu mezi oocyty ve stádiu MII a oocyty stárnoucími 24 hodin nebyla statisticky významná. K postupnému zvyšování intenzity signálu docházelo zejména v perichromozomální oblasti. V korové oblasti a cytoplazmě byl detekován statisticky významný nárůst intenzity signálu pouze u oocytů vystavených prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin a intenzita signálu byla v těchto oblastech slabší. Z uvedených výsledků lze usuzovat, že HO-1 působí zejména v perichromozomální oblasti a její množství v oocytu se během procesu stárnutí zvyšuje.

V případě HO-2 bylo detekováno statisticky významné zvýšení relativní intenzity signálu mezi oocyty ve stádiu MII a oocyty vystavenými prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin. V dalších stádiích stárnutí nedocházelo ke statisticky významným změnám intenzity signálu. Z rovnoměrného rozmístění signálu HO-2 lze usuzovat, že se uplatňuje stejnou měrou ve všech oblastech oocytu.

Vzhledem k lokalizaci HO-1 a HO-2 v oocytech lze předpokládat, že se zde nachází také produkty jejich enzymatické činnosti, včetně CO.

Během stárnutí oocytů dochází ke zvyšování produkce a hromadění ROS, vyčerpání antioxidantní ochrany a v důsledku toho zde vzniká oxidační stres, který dále negativně ovlivňuje biochemické děje a spouští další procesy spojené se stárnutím oocytů (Lord et al., 2013). Exprese HO-1 v buňkách je za normálních okolností nízká, ale je výrazně stimulována nejrůznějšími stresovými faktory (Ryter et al., 2006). Oxidační stres stimuluje expresi antioxidantních enzymů, včetně HO-1, která metabolizuje hem na biliverdin, CO a železo. Přebytek hemu vzhledem k jeho prooxidačním a prozánětlivým vlastnostem přispívá ke zvyšování tvorby ROS a je nutné ho metabolizovat (Abraham a Kappas, 2008).

Cytoprotektivní efekt HO-1 vychází zejména z produkce CO, který se účastní antiapoptotických, protizánětlivých a antiproliferativních mechanismů (Ryter et al., 2006). CO je dále zodpovědný za stimulaci antioxidantních enzymů a protektivních genů a podílí se tak na úpravě oxidační rovnováhy v buňce (Lutter et al., 1985). Cytoprotektivní vlastnosti HO-1 vyplývají také z produkce bilirubinu a biliverdinu, které působí jako antioxidanty (Stocker et al., 1987).

Významnou funkcí HO-1 je její antiapoptotická aktivita. Autoři Petrache et al. (2000) sledovali vliv HO-1 na apoptózu myších fibroblastů. Zvýšená exprese HO-1 zde měla za následek inhibici apoptózy fibroblastů a stejného efektu bylo dosaženo rovněž nízkými koncentracemi CO. Autoři Brouard et al. (2000) pak prokázali antiapoptotický efekt CO

na myších endotelových buňkách. Mechanismus, kterým HO-1 a CO zabraňují apoptóze, je zřejmě specifický pro dané buňky. V případě myších endotelových buněk autoři popisují, že antiapoptotické účinky CO jsou zprostředkovány pomocí aktivace MAPK, zatímco ve fibroblastech je nutná aktivita sGC.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem a lokalizaci HO-1 ve stárnoucích oocytech lze předpokládat, že systém HO-1/CO zde může působit jako cytoprotektivní faktor, oddalovat proces stárnutí a pozitivně tak ovlivňovat kvalitu oocytů. Zásadní význam by zde mohla mít zejména antiapoptotická aktivita HO-1 a CO.

V případě HO-1 bylo vyhodnoceno, že intracelulární lokalizace převládá v perichromozomální oblasti oocytů. HO-1 byla již lokalizována v jádrech různých typů buněk, jako jsou tukové buňky (Giordano et al., 2000), astrocyty (Li Volti et al., 2004), dendritické buňky (Ghoreschi et al., 2011) nebo neurony mozkové kůry (Morikawa et al., 2012). Autoři Lin et al. (2007) zkoumali vliv stresových faktorů na lokalizaci HO-1 v myších fibroblastech. Po vystavení buněk hemu a hypoxii docházelo k migraci HO-1 do jádra. Přítomnost HO-1 v jádře byla spojena s aktivací transkripčních faktorů, které se uplatňují v antioxidačních mechanismech a při proliferaci buněk.

Autoři Otterbein et al. (2011) pak prokázali, že systém HO-1/CO se účastní procesu reparace DNA a působí proti apoptóze a hromadění mutací v DNA buněk vystavených oxidačnímu stresu nebo působení chemoterapeutik. U HO-1 deficientních myší byla pozorována vyšší míra poškození DNA. Po aktivaci HO-1 pak docházelo ke stimulaci reparačních mechanismů DNA a menšímu poškození tkání. Stejných výsledků bylo rovněž dosaženo v případě, kdy byly myši vystaveny přímo účinkům CO.

Z výše uvedených prací vyplývá, že cytoprotektivní efekt systému HO-1/CO by mohl být zprostředkován také pomocí reparace DNA a aktivace příslušných transkripčních faktorů účastnících se antioxidační ochrany buněk. Vzhledem k lokalizaci HO-1 v oocytech a její vazbě na perichromozomální oblast lze předpokládat uplatnění těchto mechanismů během postovulačního stárnutí oocytů.

V případě HO-2 byl detekován statisticky významný nárůst relativní intenzity signálu pouze mezi oocyty ve stádiu MII a oocyty vystavenými prodloužené kultivaci po dobu 24 hodin. Intenzita signálu HO-2 byla v porovnání s HO-1 výrazně silnější.

U samců dochází k vysoké úrovni exprese HO-2 ve varlatech, kde se HO-2 exprimuje zejména v zárodečných buňkách a hraje důležitou roli během spermatogeneze (Abraham a Kappas, 2008). Autoři Ewing a Maines (1995) pozorovali distribuci HO-2 ve varlatech krys a prokázali přítomnost mRNA pro HO-2 ve spermatogoniích, spermatocytech i spermatidách.

Prostřednictvím různé míry translace mRNA během spermatogeneze může HO-2 regulovat vývoj spermií. Vzhledem k lokalizaci HO-2 v oocytech a její funkci během spermatogeneze lze uvažovat uplatnění HO-2 také ve vývoji samičích pohlavních buněk.

Na rozdíl od HO-1, která se exprimuje zejména v reakci na stres, je HO-2 zodpovědná za bazální produkci CO spojenou s fyziologickými procesy probíhajícími v tkáních. K nejvyšší míře exprese HO-2 dochází ve varlatech, nervové soustavě, játrech, endotelu a hladké svalovině, ale exprimuje se i v ostatních tkáních (Wu a Wang, 2005). Z lokalizace HO-2 v oocytech lze usuzovat, že i zde je hlavní funkcí HO-2 bazální produkce CO.

HO-2 se však může podobně jako HO-1 uplatňovat při oxidačním stresu prostřednictvím regulace antioxidantů, jako je superoxid dismutáza (SOD – superoxide dismutase). Antioxidačních mechanismů se HO-2 účastní např. v mozku, kde reaguje na poškození buněk ještě dříve než HO-1 (Turkseven et al., 2007).

Autoři Doré et al. (1999) zkoumali vliv delece genu pro HO-2 na neuroprotektivní mechanismy v krysích neuronech vystavených účinkům H_2O_2 . V HO-2 deficientních neuronech byla pozorována inhibice neuroprotektivních mechanismů a s tím spojená vyšší míra poškození neuronů vlivem neurotoxických účinků H_2O_2 . Stejného efektu bylo dosaženo působením inhibitorů HO-2 na neurony s normální expresí HO-2.

Z výše uvedených poznatků a z výsledků lokalizace HO-2 v oocytech, kdy bylo pozorováno statisticky významné zvýšení intenzity signálu mezi oocyty ve stádiu MII a oocyty stárnoucími 24 hodin, lze usuzovat, že také HO-2 by mohla reagovat na oxidační stres ve stárnoucích oocytech. Nicméně v dalších fázích stárnutí již k významným změnám nedocházelo. Získaná data pro HO-2 je tak potřeba prověřit dalšími experimenty zaměřenými na lokalizaci a redistribuci HO-2 v oocytech.

V oocytech byly již dříve lokalizovány enzymy zodpovědné za produkci dalších gasotransmiterů, jako je NO a H_2S . Mezi CO, NO a H_2S dochází k četným interakcím a jejich účinky jsou provázané. NO je zde produkován pomocí NOS (Takesue et al., 2003) a za produkci H_2S jsou zodpovědné enzymy cystathionin γ -lyáza (CSE – cystathionine γ -lyase) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3MPST – 3-mercapto-pyruvate sulfurtransferase) (Šmelcová a Tichovská, 2011).

NO je v malém množství důležitý pro růst a meiotické zrání oocytů, ale ve vysokých koncentracích může oocyty naopak poškozovat a narušovat jejich vývoj (Bu et al., 2003). NO může působit rovněž jako spouštěč partenogenetické aktivace zralých oocytů (Petr et al., 2005). Bylo zjištěno, že aktivace prasečích oocytů donory NO je závislá na signalizaci cGMP stejně jako vazodilatace cév (Petr et al., 2006).

NO se účastní také procesu stárnutí oocytů. Autoři Goud et al. (2005) zkoumali vliv NO donoru S-nitroso acetyl penicilaminu (SNAP – S-nitroso acetyl penicillamine) na stárnutí myších oocytů. Vlivem působení SNAP docházelo k výraznému zpomalení procesů spojených se stárnutím oocytů, jako je tvrzení *zony pellucidy*, exocytóza kortikálních granul a rozpad mikrotubulů. Oocyty vystavené účinku NO dále vykazovaly nižší míru abnormalit dělicího vřeténka. NO se tak podílí na oddálení stárnutí oocytů a pozitivně působí na integritu mikrotubulů dělicího vřeténka. Pozitivní vliv NO byl však zaznamenán pouze do koncentrace 0,23 $\mu\text{M}/\text{min}$. Poté již účinky NO slábnou a postupně úplně mizí. Jedná se tedy o podobný trend, který pozorovali autoři Bu et al. (2003) během meiotického zrání oocytů.

Vliv na meiotické zrání a stárnutí oocytů byl prokázán i v případě H_2S . V prasečích oocytech byla lokalizována CSE a 3MPST (Šmelcová a Tichovská, 2011). Dalším enzymem produkujícím H_2S je cystathionin β -syntáza (CBS – cystathionine β -synthase). Expres CBS a CSE byla prokázána v reprodukčním systému myši, krysa (Patel et al., 2009) i lidí (Srilatha et al., 2009). Autoři Liang et al. (2007) prokázali vysokou míru exprese CBS v myších folikulárních buňkách. V oocytech se CBS nenachází, nicméně se významně podílí na meiotickém zrání. U myši s potlačenou expresí CBS v granulózních buňkách dochází k inhibici meiotického zrání oocytů. Úlohu H_2S v meiotickém zrání prasečích oocytů prokázali také autoři Nevoral et al. (2014).

Vlivem donoru H_2S na stárnutí prasečích oocytů se zabývali autoři Krejčová et al. (2015). Během stárnutí oocytů dochází k výraznému poklesu endogenní produkce H_2S . V důsledku toho dochází k rychlejšímu nástupu projevů stárnutí a vyšší míře fragmentace oocytů. Přítomnost donoru H_2S významně tlumí známky stárnutí a dochází k úplnému potlačení fragmentace. Kultivace oocytů v přítomnosti donoru H_2S pak pozitivně ovlivňuje následný embryonální vývoj partenogeneticky aktivovaných oocytů.

Účinky CO, NO a H_2S spolu vzájemně souvisí. CO se váže na hemovou skupinu NOS a tím může stimulovat nebo potlačovat její aktivitu (Motterlini et al., 1997). NO zvyšuje expresi HO-1 a tím i produkci CO (Foresti a Motterlini, 1999). HO-1 naopak potlačuje expresi NOS (Sawle et al., 2005). H_2S stejně jako NO zvyšuje expresi HO-1 (Qingyou et al., 2004). Vyšší exprese HO-1 má poté za následek menší produkci NOS a NO (Oh et al., 2006). H_2S reguluje produkci HO-1 a CO rovněž prostřednictvím inhibice NOS (Kubo et al., 2007).

Vzhledem k výše uvedeným interakcím mezi CO, NO a H_2S a skutečnosti, že v případě NO a H_2S již byla prokázána jejich úloha v regulaci stárnutí oocytů, lze předpokládat, že by významnou roli v procesu stárnutí mohl hrát také CO. CO se může prostřednictvím regulace NOS podílet na tvorbě odpovědi buňky na oxidační stres,

ke kterému během stárnutí v oocytech dochází. Vzhledem k cytoprotektivním vlastnostem HO-1 zde může být důležitý vztah mezi HO-1 a NO a H₂S, které zvyšují její expresi.

Vlivem HO-1 na oocyty se zabývali autoři Zenclussen et al. (2011). U HO-1 deficientních myší byl zaznamenán menší počet ovulovaných oocytů a jejich horší oplozovací schopnost v porovnání s myšmi s normální expresí HO-1.

Autoři Loredana et al. (2014) zkoumali expresi NOS a HO-1 v kumulárních buňkách lidských oocytů. Zvýšená exprese NOS a HO-1 zde negativně korelovala s oplozovací schopností oocytů. Vzhledem k tomu, že HO-1 se v buňkách exprimuje zejména v reakci na působení různých stresorů a NO se prokazatelně podílí na regulaci stárnutí oocytů, lze předpokládat, že zvýšená exprese NOS a HO-1 zde vzniká jako odpověď na působení stresových faktorů.

Expresí HO-1 se zabývali také Harada et al. (2004), kteří zkoumali vztah mezi HO-1 a kvalitou folikulu. Granulózní buňky z atretických folikulů vykazovaly vyšší míru exprese HO-1 než buňky pocházející z kvalitních folikulů. I zde můžeme předpokládat, že oocyty pocházející z folikulů s vyšší mírou exprese HO-1 mohly mít horší oplozovací schopnost.

HO-1 v buňkách funguje jako ochranný faktor, nicméně v některých případech může mít proapoptotický efekt (Peyton et al., 2002) nebo ztrácet své cytoprotektivní vlastnosti (Untereiner et al., 2012). V těchto případech by se na špatné kvalitě oocytů mohla podílet i samotná HO-1.

Funkce HO-1 a HO-2 v oocytech není v současné době plně objasněna a získané výsledky je nutné prověřit dalšími experimenty zaměřenými na lokalizaci a redistribuci HO-1 a HO-2 během stárnutí oocytů. Další výzkumy je třeba provádět v oblasti mechanismu účinku HO-1 a HO-2 a určit tak konkrétní funkci těchto enzymů v oocytech.

7. Závěr

Proces stárnutí oocytů je významným faktorem, který negativně působí na jejich oplozovací schopnost a kvalitu, což má zásadní vliv také na následný embryonální a fetální vývoj. Poznatky týkající se mechanismu stárnutí oocytů a faktorů, které se zde uplatňují, by mohly být využitelné v reprodukčních biotechnologiích zvířat a v lidské asistované reprodukci.

Systém HO/CO byl identifikován jako důležitý regulační faktor v reprodukční soustavě samců i samic, nicméně jeho význam v oocytech není v současné době plně objasněn.

Cílem práce bylo lokalizovat HO-1 a HO-2 v prasečích oocytech během jejich prodloužené kultivace a popsat změny v expresi obou izoform. Enzymy byly lokalizovány v oocytech ve stádiu MII a dále ve třech stádiích stárnutí dle délky prodloužené kultivace, tj. 24, 48 a 72 hodin. Hodnoceny byly tři oblasti oocytů, tj. perichromozomální oblast, korová oblast a cytoplazma.

Vyhodnocením experimentů bylo zjištěno, že v průběhu stárnutí oocytů dochází k expresi obou izoform. HO-1 je lokalizována zejména v perichromozomální oblasti a během stárnutí dochází ke statisticky významnému zvyšování signálu. V korové oblasti a cytoplazmě byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi HO-1 pouze u oocytů stárnoucích 72 hodin a intenzita signálu je v těchto oblastech slabší.

V případě HO-2 je signál rovnoměrně rozmístěn v celém oocytu a signál je oproti HO-1 podstatně silnější. Statisticky významné zvýšení intenzity signálu bylo detekováno mezi oocyty ve stádiu MII a skupinou oocytů stárnoucích 24 hodin. Během prodloužené kultivace tedy dochází ke statisticky významnému zvýšení exprese HO-2 v porovnání s dozralými oocyty. V dalších fázích stárnutí již ke statisticky významným změnám v expresi HO-2 nedochází.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že byla potvrzena vědecká hypotéza, tj. obě izoformy HO byly lokalizovány ve stárnoucích prasečích oocytech a během prodloužené kultivace dochází ke změnám v jejich expresi. Z lokalizace HO-1 a HO-2 lze předpokládat, že se v oocytech nachází také CO, tj. hlavní produkt jejich enzymatické činnosti. Systém HO/CO se tak pravděpodobně účastní regulace procesu stárnutí v oocytech. Předpokladem je, že HO-1 zde funguje zejména jako cytoprotektivní faktor, který by mohl pozitivně působit na kvalitu oocytů. HO-2 je pak zodpovědná zejména za bazální produkci CO, nicméně nelze vyloučit také její uplatnění v regulaci oxidačního stresu v oocytech.

8. Seznam literatury

Abdel-Hamid, I. A. 2004. Phosphodiesterase 5 inhibitors in rapid ejaculation: Potential use and possible mechanisms of action. *Drugs*. 64 (1). 13–26.

Abraham, N. G., Kappas, A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of hemeoxygenase. *Pharmacological Reviews*. 60 (1). 79–127.

Acevedo, C. H., Ahmed, A. 1998. Heme oxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *The Journal of Clinical Investigation*. 101 (5). 949–955.

Adashi, E. Y., Leung, P. C. K. 1993. *The Ovary*. Raven Press. New York. p. 664. ISBN: 9780124445628.

Adhikari, D., Liu, K. 2010. mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles. *Cell Cycle*. 9 (9). 1673–1674.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2005. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing. Praha. s. 740. ISBN: 8090290620.

Alexandrescu, I. C., Lawson, D. M. 2003. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. 228 (1). 59–63.

Anderson, R., Heasman, J., Wylie, C. 2001. Early events in the mammalian germ line. *International Review of Cytology*. 203. 215–230.

Appleton, S. D., Lash, G. E., Marks, G. S., Nakatsu, K., Brien, J. F., Smith, G. N., Graham, C. H. 2003. Effect of glucose and oxygen deprivation on heme oxygenase expression in human chorionic villi explants and immortalized trophoblast cells. *American Journal of Physiology*. 285 (6). 1453–1460.

Appleton, S. D., Marks, G. S., Nakatsu, K., Brien, J. F., Smith, G. N., Graham, C. H. 2002. Heme oxygenase activity in placenta: direct dependence on oxygen availability. *American Journal of Physiology*. 282 (6). 2055–2059.

Assey, R. J., Hyttel, P., Greve, T., Purwantara, B. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 37 (3). 335–344.

Aziz, M. T., Mostafa, T., Atta, H., Wassef, M. A., Fouad, H. H., Rashed, L. A., Sabry, D. 2008. Putative role of carbon monoxide signaling pathway in penile erectile function. *Journal of Sexual Medicine*. 6 (1). 49–60.

Badenas, J., Santalo, J., Calafell, J. M., Estop, A. M., Egozcue, J. 1989. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Research*. 24 (2). 205–218.

Bainbridge, S. A., Smith, G. N. 2005. HO in pregnancy. *Free Radical Biology and Medicine*. 38 (8). 979–988.

Blandau, R. J. 1952. The female factor in fertility and infertility. Effects of delayed fertilization on the development of the pronuclei in rat ova. *Fertility and Sterility*. 3 (5). 349–365.

Boerjan, M. L., de Boer, P. 1990. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Molecular Reproduction and Development*. 25 (2). 155–163.

Bos-Mikich, A., Swann, K., Whittingham, D. G. 1995. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 41 (1). 84–90.

Botros, F. T., Navar, L. G. 2006. Interaction between endogenously produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *American Journal of Physiology*. 291 (6). 2772–2778.

Boura, A. L., Walters, W. A. 1991. Autacoids and the control of vascular tone in the human umbilical-placental circulation. *Placenta*. 12 (5). 453–477.

Brisson, M., Foster, C., Wipf, P., Joo, B., Tomko, R. J. J., Nguyen, T., Lazo, J. S. 2007. Independent mechanistic inhibition of cdc25 phosphatases by natural product caulibugulone. *Molecular Pharmacology*. 71 (1). 184–192.

Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Cook, R. W., Kipp, J. L., Shea, L. D., Mayo, K. E., Woodruff, T. K. 2006. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology*. 298 (1). 132–148.

Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M., Soares, M. P. 2000. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 192 (7). 1015–1026.

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207 (1–2). 21–30.

Burnett, A. L., Johns, D. G., Kriegsfeld, L. J., Klein, S. L., Calvin, D. C., Demas, G. E., Schramm, L. P., Tonegawa, S., Nelson, R. J., Snyder, S. H., Poss, K. D. 1998. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nature Medicine*. 4 (1). 84–87.

Byskov, A. G., Skakkebaek, N. E., Stafanger, G., Peters, H. 1977. Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *Journal of Anatomy*. 123 (1). 77–86.

Cantley, L. C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296 (5573). 1655–1657.

Chan, T. M., Chen, E., Tatoyan, A., Shargill, N. S., Pleta, M., Hochstein, P. 1986. Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 139 (2). 439–445.

Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., Shirastav, T. G. 2007. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis*. 10 (4). 863–874.

Chi, M., Manchester, J. K., Yang, V. C., Curato, A. D., Strickler, R. C., Lowry, O. H. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biology of Reproduction*. 39 (2). 295–307.

Choi, B. M., Pae, H. O., Kim, Y. M., Chung, H. T. 2003. Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology*. 37 (4). 810–823.

Clark, J. E., Naughton, P., Shurey, S., Green, C. J., Johnson, T. R., Mann, B. E., Foresti, R., Motterlini, R. 2003. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circulation Research*. 93 (2). 2–8.

Doré, S., Takahashi, M., Ferris, C. D., Zakhary, R., Hester, L. D., Guastella, D., Snyder, S. H. 1999. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (5). 2445–2450.

Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 (6). 1211–1239.

Dubuis, E., Potier, M., Wang, R., Vandier, C. 2005. Continuous inhalation of carbon monoxide attenuates hypoxic pulmonary hypertension development presumably through activation of BK_{Ca} channels. *Cardiovascular Research*. 65 (3). 751–761.

Dumollard, R., Duchen, M., Sardet, C. 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 17 (2). 314–323.

Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., Newport, J. 1988. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. 54 (3). 423–431.

Durante, W., Johnson, F. K., Johnson, R. A. 2006. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10 (3). 672–686.

Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen, A. P. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 140 (12). 5789–5796.

Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O., Tews, G. 2000. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 15 (2). 427–430.

Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, M. N., Matzuk, M. M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*. 13 (6). 1035–1048.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122 (6). 829–838.

Ewing, J. F., Maines, M. D. 1995. Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. *Endocrinology*. 136 (5). 2294–2302.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3–4). 203–216.

Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195 (4). 327–336.

Farley, A. E., Graham, C. H., Smith, G. N. 2004. Contractile Properties of Human Placental Anchoring Villi. *American Journal of Physiology*. 287 (3). 680–685.

Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124 (6). 745–754.

FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell*. 14 (1). 288–301.

Fleischmann, R. A. 1993. From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. *Trends in Genetics*. 9 (8). 285–290.

Foresti, R., Hammad, J., Clark, J. E., Johnson, T. R., Mann, B. E., Friebe, A., Green, C. J., Motterlini, R. 2004. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *British Journal of Pharmacology*. 142 (3). 453–460.

Foresti, R., Motterlini, R. 1999. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radical Research*. 31 (6). 459–475.

Freeman, B. 2003. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction*. 125 (5). 635–643.

Fujimoto, Y., Yoshinaga, K., Kono, I. 1985. Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *The Anatomical Record*. 211 (3). 271–278.

Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S., Ito, F., Matsuoka, I., Hayashi, E., Nakamura, H., Ogita, S., Sato, E., Inoue, M. 1996. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction*. 11 (7). 1480–1483.

Fujita, T., Toda, K., Karimova, A., Yan, S. F., Naka, Y., Yet, S. F., Pinsky, D.J. 2001. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. *Nature Medicine*. 7 (5). 598–604.

Fukuto, J. M., Carrington, S. J., Tantillo, D. J., Harrison, J. G., Ignarro, L. J., Freeman, B. A., Chen, A., Wink, D. A. 2012. Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. *Chemical Research in Toxicology*. 25 (4). 769–793.

Gao, S., Zhiming, H., Kihara, M., Adashi, E., Latham, K. E. 2005. Protease inhibitor MG132 in cloning: no end to the nightmare. *Trends in Biotechnology*. 23 (2). 66–68.

Garrido, C., Saule, S., Gospodarowicz, D. 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in bovine granulosa cells. *Growth Factors*. 8 (2). 109–117.

George, M. A., Pickering, S. J., Braude, P. R., Johnson, M. H. 1996. The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molecular Human Reproduction*. 2 (6). 445–456.

Ghoreschi, K., Bruck, J., Kellerer, C., Deng, C., Peng, H., Rothfuss, O., Hussain, R. Z., Gocke, A. R., Respa, A., Glocova, I., Valtcheva, N., Alexander, E., Feil, S., Feil, R., Schulze-Osthoff, K., Rupec, R. A., Lovett-Racke, A. E., Dringen, R., Racke, M. K., Rocken, M. 2011. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 208 (11). 2291–2303.

Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. Sinauer Associates. Sunderland. p. 709. ISBN: 0878932437.

Ginsburg, M., Snow, M. H., McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 110 (2). 521–528.

Giordano, A., Nisoli, E., Tonello, C., Canello, R., Carruba, M. O., Cinti, S. 2000. Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system. *FEBS Letters*. 487 (2). 171–175.

Godin, I., Wylie, C., Heasman, J. 1990. Genital ridges exert longrange effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*. 108 (2). 357–363.

Goldbaum, L. R., Ramirez, R. G., Absalon, K. B. 1975. What is the mechanism of carbon monoxide toxicity? *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 46 (10). 1289–1291.

Gosden, R. G., Telfer, E. 1987. Number of follicles and oocytes in mamalian ovaries and their allometric relationship. *Journal of Zoology*. 211 (1). 169–175.

Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Abu-Soud, H. M. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry*. 44 (34). 11361–11368.

Hall, V. J., Compton, D., Stojkovic, P., Nesbitt, M., Herbert, M., Murdoch, A., Stojkovic, M. 2007. Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Human Reproduction*. 22 (1). 52–62.

Harada, T., Koi, H., Kubota, T., Aso, T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis *in vitro*. *The Journal of Endocrinology*. 181 (1). 191–205.

Hartshorne, G. M. 1997. In vitro culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*. 2 (2). 94–104.

Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., Noguchi, M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*. 336 (2). 241–250.

Hedlund, P., Ny, L., Alm, P., Andersson, K. E. 2000. Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *The Journal of Urology*. 164 (3). 868–875.

Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (1). 122–134.

Hu, H. L., Han, R. F. 2006. The concentration of HO-2 and CO in rat penile tissue of different ages. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 12 (5). 424–427.

Huhtinen, M., Koskinen, E., Skidmore, J. A., Allen, W. R. 1996. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. *Theriogenology*. 45 (4). 719–726.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47 (1). 23–32.

Igarashi, H., Takahashi, E., Hiroi, M., Doi, K. 1997. Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 48 (3). 383–390.

Johnson, M. L., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T. 1999. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32 and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine*. 10 (1). 43–51.

Joy, K. P., Krishna, A., Haldar, C. 1999. *Comparative Endocrinology and Reproduction*. Narosa Publishing House. New Delhi. p. 612. ISBN: 9783540636915.

Kanitz, W., Brüssow, K., Becker, F., Torner, H., Schneider, F., Kubelka, M., Tomek, W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archives Animal Breeding*. 44. 9–23.

Kanki, J. P., Donoghue, D. J. 1991. Progression from meiosis I to meiosis II in *Xenopus* oocytes requires de novo translation of the mouse protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (13). 5794–5798.

Kiely, M., Morrissey, P. A., Cogan, P. F., Kearney, P. J. 1999. Low molecular weight plasma antioxidants and lipid peroxidation in maternal and cord blood. *European Journal of Clinical Nutrition*. 53 (11). 861–864.

Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furukawa, T., Daen, F. P., Naito, K., Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105 (2). 325–330.

Kikuchi, K., 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, H. S., Loughran, P. A., Rao, J., Billiar, T. R., Zuckerbraun, B. S. 2008. Carbon monoxide activates NF- κ B via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 295 (1). 146–152.

Kol, S., Adashi, E. Y. 1995. Intraovarian factors regulating ovarian function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 7 (3). 209–213.

Kreck, T. C., Shade, E. D., Lamm, W. J., McKinney, S. E., Hlastala, M. P. 2001. Isocapnic hyperventilation increases carbon monoxide elimination and oxygen delivery. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 163 (2). 458–462.

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

Krisher, R. L., Bavister, B. D. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. 49 (1). 103–114.

Kubo, S., Kurokawa, Y., Doe, I., Masuko, T., Sekiguchi, F., Kawabata, A. 2007. Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. *Toxicology*. 241 (1–2). 92–97.

Kutty, R. K., Daniel, R. F., Ryan, D. E., Levin, W., Maines, M. D. 1988. Rat liver cytochrome P-450b, P-420b, and P-420c are degraded to biliverdin by heme oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 260 (2). 638–644.

Lamar, C. A., Mahesh, V. B., Brann, D. W. 1996. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: A regulatory role for carbon monoxide? *Endocrinology*. 137 (2). 790–793.

Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., Vandenabeele, P. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation*. 9 (4). 358–361.

Lamon, B. D., Zhang, F. F., Puri, N., Brodsky, S. V., Goligorsky, M. S., Nasjletti, A. 2009. Dual pathways of carbon monoxide-mediated vasoregulation: modulation by redox mechanisms. *Circulation Research*. 105 (8). 775–783.

Lanman, J. T. 1968. Delays during reproduction and their effects on the embryo and fetus. 2. Aging of eggs. *The New England Journal of Medicine*. 278 (18). 993–999.

Lash, J., Whittaker, J. R. 1974. *Concepts of Development*. Sinauer Associates. Sunderland. p. 480. ISBN: 0878934502.

Li Volti, G., Ientile, R., Abraham, N. G., Vanella, A., Cannavo, G., Mazza, F., Curro, M., Raciti, G., Avola, R., Campisi, A. 2004. Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315 (2). 517–524.

Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Shang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89–96.

Liang, X. W., Zhu, J. Q., Miao, Y. L., Liu, J. H., Wei, L., Lu, S. S., Hou, Y., Schatten, H., Lu, K. H., Sun, Q. Y. 2008. Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371 (1). 16–21.

Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y. H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., Dennerly, P. A. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 282 (28). 20621–20633.

Liu, X. M., Chapman, G. B., Peyton, K. J., Schafer, A. I., Durante, W. 2002. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*. 55 (2). 396–405.

Liu, L., Trimarchi, J. R., Keefe, D. L. 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction*. 62 (6). 1745–1753.

Liu, H., Wang, T., Huang, K. 2009. Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*. 179 (2–3). 81–87.

Longo, F. J. 1974. Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biology of Reproduction*. 11 (1). 22–39.

Longo, F. J. 1981. Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 25 (2). 399–411.

Lord, T., Aitken, R. J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*. 146 (6). 217–227.

Lord, T., Nixon, B., Jones, K. T., Aitken, R. J. 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 88 (3). 1–9.

Loredana, B., Gemma, B., Francesca, E., Stefano, C., Paola, D., Elisabetta, A., Alberto, R., Chiara, B., Dario, G. 2014. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reproductive Sciences*. 21 (11). 1370–1377.

Lutter, R., van Schaik, M. L., van Zwieten, R., Wever, R., Roos, D., Hamers, M. N. 1985. Purification and partial characterization of the b-type cytochrome from human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 260 (4). 2237–2244.

Lyall, F., Barber, A., Myatt, L., Bulmer, J. N., Robson, S.C. 2000. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB Journal*. 14 (1). 208–219.

Mahan, V. L. 2012. Neuroprotective, neurotherapeutic, and neurometabolic effects of carbon monoxide. *Medical Gas Research*. 2 (1). 32.

Mailhes, J. B., Young, D., London, S. N. 1998. Postovulatory ageing of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biology of Reproduction*. 58 (5). 1206–1210.

Maines, M. D. 1992. *Heme Oxygenase: Clinical Applications and Function*. CRC Press. Boca Raton. p. 267. ISBN: 0849354080.

Maines, M. D., Ewing, J. F. 1996. Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biology of Reproduction*. 54 (5). 1070–1079.

Maines, M. D., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal hemeoxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 261 (1). 411–419.

Marston, J. H., Chang, M. C. 1964. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *Journal of Experimental Zoology*. 155 (2). 237–251.

Mastroianni, L., Jones, R. 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *Journal of Reproduction and Fertility*. 9. 99–102.

Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. L., Barboni, B. 1991. Changes in maturation-promoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 30 (2). 119–125.

Mayer, W., Nivelelai, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 403. 501–502.

McGhee, E. A., Hsueh, A. J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21 (2). 200–214.

Miao, Y., Liu, X., Qiao, T., Miao, D., Luo, M., Tan, J. 2005. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 73 (5). 1025–1031.

Miao, Y., Ma, S., Liu, X., Miao, D., Chang, Z., Luo, M., Tan, J. 2004. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (1). 66–76.

Middendorff, R., Kumm, M., Davidoff, M., Holstein, A., Müller, D. 2000. Generation of cyclic guanosine monophosphate by heme oxygenases in the human testis – a regulatory role for carbon monoxide in Sertoli cells? *Biology of Reproduction*. 63 (2). 651–657.

Morikawa, T., Kajimura, M., Nakamura, T., Hishiki, T., Nakanishi, T., Yukutake, Y., Nagahata, Y., Ishikawa, M., Hattori, K., Takenouchi, T., Takahashi, T., Ishii, I., Matsubara, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., Nagata, E., Gadalla, M. M., Snyder, S. H., Suematsu, M. 2012. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (4). 1293–1298.

Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M., Winslow, R. M. 1997. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *The American Journal of Physiology*. 270 (1). 107–114.

Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J., Kučerová-Chrpová, V., Sedmíková, M., Krejčová, T., Kolbabová, T., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Křivohlávková, L., Žalmanová, T., Jílek, F. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PloS One*. 9 (7).

Nikberg, I. I., Murashko, V. A., Leonenko, I. N. 1972. Carbon monoxide concentration in the air exhaled by the healthy and the ill. *Vrachebnoe delo*. 12. 112–114.

Nilsson, E. E., Skinner, M. K. 2004. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 214 (1–2). 19–25.

Nizamutdinova, I. T., Kim, Y. M., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C. 2009. Carbon monoxide (from CORM-2) inhibits high glucose-induced ICAM-1 expression via AMP-activated protein kinase and PPAR-gamma activations in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 207 (2). 405–411.

Oh, G. S., Pae, H. O., Lee, B. S., Kim, B. N., Kim, J. M., Kim, H. R., Jeon, S. B., Jeon, W. K., Chae, H. J., Chung, H. T. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via hemeoxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine*. 41 (1). 106–119.

Otsuka, F., Shimasaki, S. 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (12). 8060–8065.

Otterbein, L. E., Choi, A. M. K. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 279 (6). 1029–1037.

Otterbein, L. E., Hedblom, A., Harris, C., Csizmadia, E., Gallo, D., Wegiel, B. 2011. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (35). 14491–14496.

Ozawa, N., Goda, N., Makino, N., Yamaguchi, T., Yoshimura, Y., Suematsu, M. 2002. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *The Journal of Clinical Investigation*. 109 (4). 457–467.

Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R., Chung, H. T. 2004. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *Journal of Immunology*. 172 (8). 4744–4751.

Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303 (5658). 682–684.

Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulfide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7 (10). 1–9.

Pepling, M. E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle. *Genesis*. 44 (12). 622–632.

Pesce, M., Klinger, F. G., De Felici, M. 2002. Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling. *Mechanisms of Development*. 112 (1–2). 15–24.

Petr, J., Rajmon, R., Chmelíková, E., Tománek, M., Lánská, V., Pribánová, M., Jílek, F. 2006. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*. 14 (1). 9–16.

Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71 (1). 115–122.

Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W., Choi, A. M. 2000. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 278 (2). 312–319.

Peyton, K. J., Reyna, S. V., Chapman, G. B., Ensenat, D., Liu, X. M., Wang, H., Schafer, A. I., Durante, W. 2002. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood*. 99 (12). 4443–4448.

Piantadosi, C. A. 2002. *Biological Chemistry of Carbon Monoxide. Antioxidants & Redox Signaling*. 4 (2). 259–270.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145 (1–2). 27–37.

Qiao, T., Liu, N., Miao, D., Zhang, X., Han, D., Ge, L., Tan, J. 2007. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). *Molecular Reproduction and Development*. 75 (3). 521–528.

Qingyou, Z., Junbao, D., Weijin, Z., Hui, Y., Chaoshu, T., Chunyu, Z. 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.

Raju, V. S., McCoubrey Jr., W. K., Maines, M. D., 1997. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1351 (1–2). 89–104.

Ramos, K. S., Lin, H., McGrath, J. J. 1989. Modulation of cyclic guanosine monophosphate levels in cultured aortic smooth muscle cells by carbon monoxide. *Biochemical Pharmacology*. 38 (8). 1368–1370.

Ratts, V. S., Flaws, J. A., Kolp, R., Sorenson, C. M., Tilly, J. L. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*. 136 (8). 3665–3668.

Reilly, F. D., Russell, P. T. 1977. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *The Anatomical Record*. 188 (3). 277–286.

Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Espey, L. L. 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual Review of Physiology*. 64. 69–92.

Rodman, T. C. 1971. Chromatid disjunction in unfertilized ageing oocytes. *Nature*. 233 (5316). 191–193.

Rohn, T. T., Hinds, T. R., Vincenzi, F. F. 1993. Ion transport ATPases as targets for free radical damage. Protection by an aminosteroid of the Ca²⁺ pump ATPase and Na⁺/K⁺ pump ATPase of human red blood cell membranes. *Biochemical Pharmacology*. 46 (3). 525–534.

Ryter, S. W., Alam, J., Choi, A. M. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*. 86 (2). 583–650.

Sawle, P., Foresti, R., Mann, B. E., Johnson, T. R., Green, C. J., Motterlini, R. 2005. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *British Journal of Pharmacology*. 145 (6). 800–810.

Sawyer, H. T., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., Wakefield, S. J., McNatty, K. P. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*. 66 (4). 1134–1150.

Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., Ames, B. N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (23). 10771–10778.

Silva, J. R., Figueiredo, J. R., van den Hurk, R. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 71 (8). 1193–1208.

Sohal, R. S., Dubey, A. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*. 16 (5). 621–626.

Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. *Development*. 127 (21). 4645–4654.

Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, G. P., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6 (7). 1875–1884.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 235 (4792). 1043–1046.

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.

Sun, Q. Y., Miao, Y. L., Schatten, H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiotic resumption. *Cell Cycle*. 8 (17). 2741–2747.

Sun, Q. Y., Schatten, H. 2007. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 591. 58–71.

Szollosi, D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *American Journal of Anatomy*. 130 (2). 209–225.

Šmelcová, M., Tichovská, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: A review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 42 (4). 188–198.

Takagi, Y., Talbot, N. C., Rexroad Jr., C. E., Pursel, V. G. 1997. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Molecular Reproduction and Development*. 46 (4). 567–580.

Takahashi, E., Igarashi, H., Kawagoe, J., Amita, M., Hara, S., Kurachi, H. 2009. Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biology of Reproduction*. 80 (3). 493–502.

Takahashi, T., Saito, H., Hiroi, M., Doi, K., Takahashi, E. 2000. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 55 (3). 299–306.

Takahashi, T., Takahashi, E., Igarashi, H., Tezuka, N., Kurachi, H. 2003. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 66 (2). 143–152.

Takai, Y., Matikainen, T., Juriscova, A., Kim, M. R., Trbovich, A. M., Fujita, E., Nakagawa, T., Lemmers, B., Flavell, R.A., Hakem, R., Momoi, T., Yuan, J., Tilly, J. L., Perez, G. I. 2007. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis*. 12 (4). 791–800.

Takesue, K., Tabata, S., Sato, F., Hattori, M. 2003. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *The Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 136–140.

Talbot, P., Shur, B. D., Myles, D. G. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm–zona pellucida interactions, and sperm–egg fusion. *Biology of Reproduction*. 68 (1). 1–9.

Tarin, J. J., Perez-Albala, S., Aguilar, A., Minarro, J., Hermenegildo, C., Cano, A. 1999. Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biology of Reproduction*. 61 (5). 1347–1355.

Tarin, J. J., Perez-Albala, S., Cano, A. 2000. Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Human Reproduction Update*. 6 (6). 532–549.

Tarin, J. J., Perez-Albala, S., Perez-Hoyos, S., Cano, A. 2002. Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biology of Reproduction*. 66 (2). 495–499.

Tatone, C., Amicarelli, F., Carbone, M. C., Monteleone, P., Caserta, D., Marci, R., Artini, P. G., Piomboni, P., Focarelli, R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*. 14 (2). 131–142.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (23). 6388–6394.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1970. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 75 (3). 410–421.

Tonetta, S. A., diZerega, G. S. 1990. Local regulatory factors controlling folliculogenesis in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 40. 151–161.

Torner, H., Brüssow, K. P., Alm, H., Ratky, J., Kanitz, W. 1998. Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes depends on the stage of preovulatory maturation. *Theriogenology*. 50 (1). 39–48.

Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytosstatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17 (6). 683–710.

Turkseven, S., Drummond, G., Rezzani, R., Rodella, L., Quan, S., Ikehara, S., Abraham, N. G. 2007. Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 100 (4). 815–823.

Untereiner, A. A., Wu, L., Wang, R. 2012. The role of carbon monoxide as a gasotransmitter in cardiovascular and metabolic regulation. In: Hermann, A., Sitdikova, G. F., Weiger, T. M. (eds.). *Gasotransmitters: physiology and pathophysiology*. Springer. Heidelberg. p. 37–70. ISBN: 9783642303371.

Ushiyama, M., Morita, T., Kuramochi, T., Yagi, S., Katayama, S. 2004. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertension Research*. 27 (4). 253–261.

Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Beckers, J. F. 1997. In vivo and in vitro development of preantral follicles. . 47 (1). 73–82.

Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. 63 (6). 1717–1751.

Van Landeghem, L., Laleman, W., Vander Elst, I., Zeegers, M., Van Pelt, J., Cassiman, D., Nevens, F. 2009. Carbon monoxide produced by intrasinusoidally located haem-oxygenase-1 regulates the vascular tone in cirrhotic rat liver. *Liver International*. 29 (5). 650–660.

Vreman, H. J., Wong, R. J., Stevenson, D. K. 2000. Carbon monoxide in breath, blood, and other tissues. In: Penney, D. G. (ed.). *Carbon monoxide toxicity*. CRC Press. Boca Raton. p. 19–60. ISBN: 9780849320651.

Wagner, C. T., Durante, W., Christodoulides, N., Hellums, J. D., Schafer, A. I. 1997. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinic Investigation*. 100 (3). 589–596.

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., Wu, L., Wang, Z. 1997. The direct effect of carbon monoxide on K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 434 (3). 285–291.

Wassarman, P. M. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York. p. 69–102. ISBN: 9780781700863.

Webb, R., Campbell, B. K., Garverick, H. A., Gong, J. G., Gutierrez, C. G., Armstrong, D. G. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 54. 33–48.

Wehrend, A., Meinecke, B. 1998. The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 33 (3–4). 289–297.

Werkström, V., Ny, L., Persson, K., Andersson, K. E. 1997. Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *British Journal of Pharmacology*. 120 (2). 312–318.

Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., Baird, D. D. 1998. Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Human Reproduction*. 13 (2). 394–397.

Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L., Lombardi, L., De Placido, G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 16 (5). 909–917.

Williams, S. E., Wootton, P., Mason, H. S., Bould, J., Iles, D. E., Riccardi, D., Peers, C., Kemp, P. J. 2004. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*. 306. 2093–2097.

Wright, C., Becker, D. L., Lin, J. S., Warner, A. E. K. H. 2001. Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction*. 121 (1). 77–88.

Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*. 57 (4). 585–630.

Wu, Y., Wang, X., Liu, J., Bao, Z., Tang, D., Wu, Y., Zeng, S.M. 2011. BIM EL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged oocytes via a paracrine action. *Theriogenology*. 76 (8). 1487–1495.

Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G. S., Schultz, R. M., Ducibella, T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction*. 57 (4). 743–750.

Xu, Z., Gaverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A., Youngquist, R. S. 1995. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*. 53 (4). 951–957.

Yamamoto, T. M., Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Kishimoto, T. 2005. APC/C-Cdc20-mediated degradation of cyclin B participates in CSF arrest in unfertilized *Xenopus* eggs. *Developmental Biology*. 279 (2). 345–355.

Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J., Matzuk, M. M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*. 15 (6). 854–66.

Yanagida, K., Yazawa, H., Katayose, H., Suzuki, K., Hoshi, K., Sato, A. 1998. Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 13 (8). 2223–2226.

Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., Zhao, G. Q. 2000. Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Molecular Endocrinology*. 14 (7). 1053–1063.

Yoon, S. Y., Jellerette, T., Salicioni, A. M., Lee, H. C., Yoo, M. S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J. B., Visconti, P. E., Mager, J., Fissore, R. A. 2008. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development. *Journal of Clinical Investigation*. 118 (11). 3671–3681.

Yoshida, M., Cran, D. G., Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 36 (4). 462–468.

Yoshiki, N., Kubota, T., Aso, T. 2000. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276 (3). 1136–1142.

Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., El-Mouseleh, T., Rebelo, S., Langwisch, S., Linzke, N., Volk, H. D., Fest, S., Soares, M. P., Zenclussen, A. C. 2011. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The Journal of Pathology*. 225 (2). 293–304.

Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., Jensen, F., Woidacki, K., Zenclussen, A. C. 2014. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in Endocrinology*. 5 (32).

Zenclussen, M. L., Jensen, F., Rebelo, S., El-Mouseleh, T., Casalis, P. A., Zenclussen, A. C. 2012. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology*. 67 (5). 376–382.

Zhou, Z., Song, R., Fattman, C.L., Greenhill, S., Alber, S., Oury, T. D., Choi, A. M., Morse, D. 2005. Carbon monoxide suppresses bleomycin-induced lung fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 166 (1). 27–37.

9. Seznam použitých zkratek a symbolů

3MPST	3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3-mercapto-pyruvate sulfurtransferase)
AMH	anti-Müllerian hormon
APC/C	anafázi podporující komplex (anaphase-promoting complex)
Bcl	lymfom B-buněk (B-cell lymphoma)
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CBS	cystathionin β -syntáza (cystathionine β -synthase)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
CSE	cystathionin γ -lyáza (cystathionine γ -lyase)
CSF	cytostatický faktor (cytostatic factor)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
FIG- α	factor in the germline-alpha
FSH	folikulostimulační hormon (follicle-stimulating hormone)
GDF-9	růstový diferenační faktor-9 (growth differentiation factor-9)
GH	růstový hormon (growth hormone)
GV	zárodečný váček (germinal vesicle)
GVBD	rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor-1 (hypoxia-inducible factor-1)
HO	hemoxygenáza (heme oxygenase)
IGF	inzulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)
IGFBP	protein vázající IGF (insulin-like growth factor-binding protein)
IP3	inositoltrifosfát (inositoltriphosphate)
LH	luteinizační hormon (luteinizing hormone)
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)
MPF	M-fázi podporující faktor (M-phase-promoting factor)
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NOS	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)
PDE3A	fosfodiesteráza 3A (phosphodiesterase 3A)
PGCs	primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)

PKA	protein kináza A (protein kinase A)
PLC	fosfolipáza C (phospholipase C)
PTEN/PI3K	phosphatase and tensin homolog / phosphatidylinositol 3-kinase
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SCF	faktor kmenových buněk (stem cell factor)
sGC	rozpustná guanylátcykláza (soluble guanylate cyclase)
SNAP	S-nitroso acetyl penicilamin (S-nitroso acetyl penicillamine)
SOD	superoxid dismutáza (superoxide dismutase)
TGF- β	transformující růstový faktor-beta (transforming growth factor-beta)
TSC1/mTORC1	tuberous sclerosis complex 1 / mammalian target of rapamycin complex 1
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)