

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv donoru sulfanu na průběh meiotického zrání
prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Kasalová

Vedoucí práce: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "*Vliv donoru sulfanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů*" 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

Bc. Veronika Kasalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D., za odborné rady, které mi poskytoval během tvorby této práce a především za jeho ochotu a nesmírně trpělivé vedení.

Poděkování patří také paní Ing. Mgr. Tereze Krejčové, Ph.D., za její přátelský a obětavý přístup k výuce a vedení mé praxe v laboratoři.

Nemohu opomenout svou rodinu a blízké přátele, kteří mě během mého studia neúnavně podporovali.

Vliv donoru sulfanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů

Effect of hydrogen sulfide donor on meiotic maturation of porcine oocytes

Souhrn

S rostoucím zájmem o využití biotechnologických metod v reprodukci narůstá také potřeba stále většího množství kvalitního biologického materiálu. Oocyty jsou nenahraditelným materiálem pro metody asistované reprodukce. Ve snaze zvýšit efektivitu potřebných metod je v současné době věnována velká pozornost výzkumu zaměřenému na optimalizaci různých aspektů práce s oocyty. Jedním z těchto aspektů je kultivace oocytů *in vitro* za účelem získání zralých, oplozeníšchopných gamet. Proces meiotického zrání savčích oocytů je komplexním dějem, jehož regulace zatím nebyla plně objasněna. Na zrání oocytů se podílí široká škála regulačních faktorů včetně gasotransmiterů – plynných signálních molekul. Zatím posledním objeveným gasotransmiterem je sulfan (H_2S), o jehož funkci v oocytech je dostupné jen omezené množství informací.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že sulfan je zapojen do regulace meiotického zrání prasečích oocytů. Tato hypotéza byla ověřena prostřednictvím zvýšení hladiny sulfanu během meiotického zrání oocytů *in vitro*, a to za použití donoru sulfanu, Na_2S , který byl v různých koncentracích přidáván do kultivačního media.

Z výsledků této práce vyplývá, že vhodné koncentrace použitého donoru sulfanu (Na_2S) v kultivačním mediu urychlují proces zrání oocytů *in vitro* oproti kultivaci v čistém mediu. To se projevuje dřívějším vstupem oocytů experimentálních skupin do jednotlivých fází zrání a kratší dobou trvání těchto fází.

Tato zjištění mohou být využita ve snaze optimalizovat biotechnologické postupy při práci se savčími oocyty a zvýšit efektivitu metod asistované reprodukce. Je však nezbytné provést další experimenty, které by pomohly popsat a vysvětlit konkrétní buněčné regulační mechanismy, kterých se sulfan jako signální molekula účastní.

Klíčová slova: oocyt, meiotické zrání, gasotransmiter, sulfan

Summary

With the growing interest in the use of biotechnological methods in reproduction there is also an increased need for increasing amounts of high-quality biological material. Oocytes are an irreplaceable commodity for assisted reproduction methods. In order to increase the efficiency of the required methods great attention is currently paid to research aimed at optimizing various aspects of working with oocytes. One of these aspects is to culture oocytes *in vitro* to obtain mature gametes. Meiotic maturation of mammalian oocytes is a complex process, the regulation has not been fully elucidated yet. The oocyte maturation involved a wide range of regulatory factors including gasotransmitters - gaseous signaling molecules. Hydrogen sulfide (H₂S) is the most recently discovered gasotransmitter, for whose functions in oocytes are available only limited information.

The aim of this thesis was to verify the hypothesis that hydrogen sulfide is involved in the regulation of the meiotic maturation of porcine oocytes. This hypothesis was verified through application of increasing levels of hydrogen sulfide during meiotic maturation of oocytes *in vitro* with using a donor of hydrogen sulfide (Na₂S), which were added in various concentrations to the medium.

The results of this study show that a suitable concentration of the hydrogen sulfide donor in the culture medium accelerates the process of oocyte maturation *in vitro* in comparison to cultivation in the pure medium. This will be reflected in early entry of Experimental groups of oocytes exhibit an earlier entry to the particular stages of maturation and a shorter duration of these stages.

These findings can be used in order to optimize the biotechnological procedures when working with mammalian oocytes and improve the effectiveness of assisted reproductive techniques. However, it is necessary to make further experiments, which would help to describe and explain the specific cellular regulatory mechanisms, where hydrogen sulfide participates as a signaling molecule.

Keywords: oocyte, meiotic maturation, gasotransmitter, hydrogen sulfide

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Hypotéza a cíl práce	3
3 Literární přehled	4
3.1 Oogeneze	4
3.1.1 Primordiální zárodečné buňky	4
3.1.2 Oogonie.....	5
3.1.3 Oocyty	7
3.2 Folikulogeneze	10
3.2.1 Primární folikuly	10
3.2.2 Sekundární folikuly	11
3.2.3 Terciální folikuly	12
3.3 Získání meiotické kompetence oocytů	13
3.4 Meiotické zrání oocytů	15
3.4.1 Jaderné zrání.....	16
3.4.2 Ultrastrukturální cytoplazmatické změny.....	17
3.4.3 Expanze kumulu	18
3.5 Regulace meiotického zrání oocytů.....	19
3.5.1 Cyklické nukleotidy – cAMP, cGMP	19
3.5.2 Maturation/M-phase promoting factor (MPF).....	20
3.5.3 Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK).....	20
3.5.4 Vápenaté ionty (Ca ²⁺).....	22
3.6 Gasotransmitery.....	23
3.6.1 NO – oxid dusnatý.....	23
3.6.2 CO – oxid uhelnatý.....	25
3.6.3 H ₂ S – sulfan	26
4 Materiál a metodika.....	29
4.1 Získávání oocytů a jejich selekce.....	29
4.2 Kultivace oocytů a příprava preparátů pro posouzení meiotického zrání	29
4.3 Hodnocení stádií meiotického zrání oocytů.....	30
4.4 Statistické vyhodnocení získaných dat	30
4.5 Experimentální design	31
4.5.1 Experiment č. 1	31
4.5.2 Experiment č. 2	31
4.5.3 Experiment č. 3	31

5	Výsledky	32
5.1	Experiment č. 1	32
5.2	Experiment č. 2	36
5.3	Experiment č. 3	40
6	Diskuse	46
7	Závěr	50
8	Seznam použité literatury.....	51
9	Seznam použitých zkratek	70

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie jsou oborem, který v posledních desetiletích zaznamenal bouřlivý rozvoj. V souvislosti s řadou dalších oborů, jako je zemědělství, veterinární vědy či biomedicínské obory včetně humánní asistované reprodukce, zaujímá toto odvětví biotechnologií ve vědě významné postavení. Výsledky výzkumu v oblasti reprodukčních biotechnologií jsou mnohdy využitelné i v dalších oborech a dobře uplatnitelné v praxi. V současné době však stále existuje velké množství otázek týkajících se fyziologie, buněčné biologie a biochemie, na které je potřeba v souvislosti s reprodukcí a jejím řízením ještě odpovědět.

S rozmáhajícím se využíváním biotechnologických metod v reprodukci narůstá také potřeba stále většího množství kvalitního biologického materiálu. Oocyty jsou nenahraditelnou komoditou pro metody asistované reprodukce a jejich získávání je proces provázený řadou problémů, ať už praktických, které se týkají samotného odběru dárkyně, nebo logistických a v neposlední řadě také etických. Navíc je obvykle poměrně velké množství získaných oocytů k vybranému účelu z různých důvodů nepoužitelné. Kromě toho jsou současné sofistikované biotechnologické metody v oblasti reprodukce stále poměrně nákladnou záležitostí, což také představuje příklad omezení dalšího rozšíření těchto metod do běžné praxe.

Vzhledem k poměrně velké míře podobnosti v anatomii a fyziologii s člověkem a ostatními hospodářskými zvířaty je prase významným modelovým druhem pro účely biomedicínského výzkumu (Vodička *et al.*, 2005; Gün *et al.*, 2014). Výhoda využití prasnic pro studium reprodukce spočívá v možnosti snadno získat velké množství oocytů. Mimoto má pochopení mechanismů ovlivňujících reprodukční ukazatele prasnic význam také pro optimalizaci zemědělské prvovýroby v oblasti živočišné produkce. Z těchto důvodů byly experimenty prezentované v této práci provedeny na prasečích oocytech.

V současné době je výzkum oogeneze zaměřen především na optimalizaci všech aspektů práce s oocyty, kam lze kromě jiného zahrnout i jejich kultivaci *in vitro* za účelem získání zralých, oplození schopných gamet. Proces meiotického zrání savčích oocytů je komplexním dějem, jehož regulace zatím nebyla plně objasněna. Pro zlepšení efektivity metod asistované reprodukce je však porozumění všem aspektům získání meiotické a vývojové kompetence oocytů zásadní.

Na procesu meiotického zrání oocytů se podílí široká škála regulačních faktorů, od proteinů přes ionty až po plyny. U některých plynů byla v relativně nedávné době prokázána schopnost ovlivňovat průběh vývoje oocyty, kde zastávají úlohu důležitých signálních molekul. Tyto plyny se označují jako gasotransmittery a patří mezi ně oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sulfan (Šmelcová *et* Tichovská, 2011). Jelikož bylo zjištěno, že oxid dusnatý se významně podílí na regulaci zrání oocyty, je zvýšená pozornost v tomto ohledu věnována i ostatním dvěma plynům. Vzhledem k tomu, že sulfan je zatím posledním objeveným gasotransmitterem, jsou nyní dostupné jen omezené informace o tom, zda a jakým způsobem je do regulace meiotického zrání oocytů zapojen. Účelem této práce je zjistit, jak sulfan ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách.

2 Hypotéza a cíl práce

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, podle které je sulfan zapojen do regulace meiotického zrání prasečích oocytů. Pro ověření stanovené hypotézy byly vetyčeny následující dílčí cíle práce:

Zhodnotit vliv různé koncentrace donoru sulfanu na znovuzahájení meiotické zrání oocytů po 20 hod. *in vitro* kultivace.

Zhodnotit vliv různé koncentrace donoru sulfanu na přechod oocytů z meiózy I do meiózy II po 30 hod. *in vitro* kultivace.

Zhodnotit vliv donoru sulfanu na průběh meiotického zrání prasečích oocytů kultivovaných *in vitro*.

3 Literární přehled

3.1 Oogeneze

3.1.1 Primordiální zárodečné buňky

Vznik savčích gamet je komplexní proces, který začíná již během raného embryonálního vývoje jedince. Pohlavní buňky savců, ať už se jedná o samce nebo o samici, mají svůj původ v epiblastu, primárním ektodermu raného embrya. Zde se v časně fázi vývoje zárodku objevují takzvané primordiální zárodečné buňky (PGCs - Primordial Germ Cells) (Wassarman *et al.*, 1994; Vanderhyden, 2002; Alberts *et al.*, 2008; Sadler, 2011).

První primordiální zárodečné buňky se např. u myši objevují v epiblastu kolem 6. – 7. dne vývoje (Tam *et al.*, 1981), u člověka je to v 2. týdnu (Sadler, 2011). Diferenciace buněk epiblastu v PGC je zabezpečena blokováním nebo naopak aktivací exprese specifických genů, jako je *Stra8* (Yokobayashi *et al.*, 2013) či *Bmp4* (Ying *et al.*, 2002), v důsledku čehož se tyto buňky vývojově odchylí od buněk somatických a postupně se přemění na buňky zárodečné. Signální molekuly indukující tyto změny jsou u savců produkovány okolními somatickými buňkami (Alberts *et al.*, 2008). Mimoto byl prokázán významný vliv skupiny kostních morfogenetických proteinů (BMP - Bone Morphogenetic Protein) na vznik PGCs z buněk epiblastu (Ying *et al.*, 2001; Molyneaux *et al.*, 2010).

Savčí PGCs migrují z ektodermu embrya do stěny žloutkového váčku a během vzniku prvotní trávicí trubice zárodku se přesouvají do kaudální části tohoto primitivního střeva. Ze zadního střeva poté prostupují embryonálním mesenchymem do dorzální stěny zárodku a dále putují směrem k pohlavním lištám, místu vzniku budoucích gonád na ventrální straně mesonefros (Molyneaux *et al.*, 2001). Zde se zanořují do zesíleného epitelu embryonální tělní dutiny. Osídlení pohlavních lišt primordiálními zárodečnými buňkami u myši nastává již kolem 10. dne embryonálního vývoje (Tam *et al.*, 1981), u člověka v 6. týdnu (Sadler, 2011) a u prasete jsou zde přítomny již 24. den (Bielanska – Osuchowska, 2006).

Faktory ovlivňující migraci primordiálních zárodečných buněk na místo pozdější přeměny v gamety zatím nebyly zcela objasněny. Současné poznatky naznačují, že pohyb primordiálních zárodečných buněk je řízen signálními molekulami, chemoatraktanty neboli chemokiny, které jsou produkovány somatickými buňkami nacházejícími se podél migrační dráhy PGCs (Alberts *et al.*, 2008). Zda se jedná o pohyb aktivní či pasivní, je stále diskutováno (Freeman, 2003).

Za jeden z významných chemokinů zodpovědných za migraci primordiálních zárodečných buněk je považován takzvaný faktor kmenových buněk (SCF – stem cell factor), který je ligandem receptoru c-kit na membráně primordiálních zárodečných buněk (Høyer *et al.* 2005; De Felici *et al.* 2007). Jako další významný faktor migrace PGCs je zmiňován transformační růstový faktor (TGF β – Transforming Growth Factor β), který podporuje jejich migraci k pohlavním lištám (Mummery *et al.* 2005).

Během své migrace se primordiální zárodečné buňky intenzivně mitoticky dělí a jejich počet se tak několikanásobně zvýší. Ve stadiu kolonizace pohlavních lišt se jich v myším embryu nachází kolem 25 000 (Tam *et* Snow, 1981). Během svého růstu, dělení i migrace jsou primordiální zárodečné buňky podporovány okolními somatickými buňkami, které prostřednictvím přímého kontaktu dodávají zárodečným buňkám potřebné růstové faktory a další látky důležité pro jejich zachování. Takovými růstovými faktory jsou např. již zmíněný kit ligand (KL, SCF – Stem Cell Factor), leukémii inhibující faktor (LIF - Leukemia-Inhibiting Factor), fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2 - Fibroblast Growth Factor 2), interleukin 4 (IL-4 - Interleukin 4) a řada dalších (van den Hurk *et* Zhao, 2005).

Po kolonizaci embryonálních pohlavních lišt primordiálními buňkami je zahájena přeměna těchto předchůdců gonád ve funkční pohlavní žlázy. V této fázi se mimo jiné významně uplatňuje funkce genu *Sry* (Sex-determining Region Y), který se nachází na krátkém raménku Y chromozomu, a který, je-li přítomen, způsobuje přeměnu genitální lišty ve varle. Není-li tento gen přítomen nebo je-li blokován, embryo se vyvíjí v samici a pohlavní lišta se začne přeměňovat na ovárium (Gubbay, *et al.* 1990; Sinclair *et al.*, 1990).

U samic savců se v této fázi primordiální zárodečné buňky ještě několikrát mitoticky rozdělí, zatímco se přesouvají do kůry budoucího ovária, kde tvoří shluky (Pepling *et* Spradling, 1998). Vchlípující se epitel coelomové dutiny mezi nimi tvoří síť podpůrných pre-granulózních buněk a postupně tak vznikají jednotlivé segmenty ovária. Zárodečné buňky ukončí svou mitotickou aktivitu a za působení transkripčních faktorů zahájí meiotické dělení. Vstupem do meiózy se PGCs mění v oogonie a tento jev je provázen vznikem takzvaných primordiálních folikulů (Motta *et al.*, 1997).

3.1.2 Oogonie

Poté, co primordiální zárodečné buňky osídlí zárodečné lišty a zanoří se do kůry vyvíjejícího se ovária, nastane jejich přeměna v oogonie. Ztratí svoji dosavadní pohyblivost a začnou vykazovat charakteristické morfologické znaky. Jsou znatelně větší než primordiální

zárodečné buňky a mají pravidelný tvar. Typický je pro ně výskyt kulovitých mitochondrií s úzkými kristami, které jsou spolu s volnými polyribosómy v blízkosti endoplazmatického retikula poměrně pravidelně rozmístěny kolem jádra. Jádro oogonií má charakter váčku kulovitého tvaru a lze v něm pozorovat množství nukleoplazmy s drobnými segmenty heterochromatinu. Na rozdíl od oocytů jsou v cytoplazmě oogonií přítomny funkční centrozomy, které jsou zapojeny do cytokineze během mitotického dělení buněk (Baker *et al.*, 1967, Sathananthan *et al.*, 2000; Bielańska – Osuchowska, 2006).

Oogonie vykazují vysokou mitotickou aktivitu – neustále se dělí a postupně tak vytvářejí početnou ovariální zásobu budoucích gamet (Marvan a kol., 2007; Picton *et al.*, 1998). Oogonie mají tendenci ve tkáni vyvíjejícího se ovaria vytvářet četné shluky. Mitotické dělení oogonií je neúplné a buňky v těchto zárodečných shlucích zůstávají mezi sebou propojeny poměrně pevnými mezibuněčnými spoji typu *macula adherens* - desmozomy. Tím je zajištěna úzká vzájemná komunikace mezi buňkami příslušného segmentu ovaria a synchronizace biologických pochodů včetně buněčného cyklu – u oogonií v jednom shluku lze například pozorovat identickou chromozomální konfiguraci (Gondos, 1984; Pepling *et al.*, 1998; Pepling *et al.*, 2001). U prasete lze shluky propojených oogonií v embryonálním vaječníku pozorovat od 39. dne embryonálního vývoje (Bielańska – Osuchowska, 2006).

Po posledním mitotickém rozdělení oogonií následuje dlouhá interfáze buněčného cyklu, zvaná pre-leptotene. V tomto stadiu nastává konečná replikace DNA v přípravě na vstup buněk do meiózy a tedy přeměnu v oocyty (Wassarman *et al.*, 1994; Gosden *et al.*, 1995; Baltus *et al.*, 2006). Je obtížné morfologicky odlišit oogonie ve fázi pre-leptotene od oocytů ve fázi leptotene prvního meiotického dělení. U mnohých z nich však lze pozorovat silně kondenzované segmenty jaderného chromatinu (Bielańska – Osuchowska, 2006).

Vstup oogonií do meiózy je pravděpodobně indukován faktory produkovanými okolními buňkami ovariální tkáně. Oogonie jsou postupně obkloповány podpůrnými pre-granulózními buňkami a následně dojde k uzavření mezibuněčných spojů, čímž je narušen synchronní vývoj buněk v daném ovariálním shluku (Sathananthan *et al.*, 2000; Pepling *et al.*, 2001). Dále se již buňky vyvíjí samostatně jako primární oocyty, jejichž další osud závisí na komunikaci s podpůrnými buňkami v jejich bezprostředním okolí. Útvar, jehož součástí je primární oocyt obklopený jednou vrstvou plochých čtvercových buněk

epiteliálního nebo mesonefrálního původu, se nazývá primordiální folikul (Byskov, 1986; Merchant-Larios *et* Chimal-Monroy, 1989; Wassarman *et* Albertini, 1994; Motta *et al.*, 1997).

3.1.3 Oocyty

Přeměna oogonie v oocyt je charakterizována ukončením mitotické aktivity a vstupem dané buňky do meiózy. V průběhu tohoto typu buněčného dělení dochází k rozdělení diploidní sady dědičné informace mateřské buňky mezi buňky dceřinné. Každá z nich poté obsahuje rekombinovanou haploidní sadu chromozomů a stane se gametou. V případě vzniku samičích gamet je výsledkem tohoto procesu jeden oocyt s jednou sadou chromozomů a dvě pólová tělíska, která se na vzniku nového jedince po oplození nepodílejí. Po vstupu do meiotického cyklu jsou samičí gamety dále označovány jako oocyty.

Meióza zahrnuje dvě po sobě jdoucí dělení, z nichž první se označuje jako heterotypické (redukční) a druhé homotypické (ekvační). První meiotické dělení se od mitózy liší průběhem profáze, která je prodloužená a lze ji rozdělit do 5 stádií – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze.

Wassarman *et* Albertini (1994) uvádějí, že fáze leptotene u savců trvá 3 - 6 hodin, zygotene pak následujících 12 - 40 hodin. Fázi leptotene charakterizuje kondenzace a párování homologních chromozomů. Už v této době u nich začíná docházet k rekombinacím DNA. Během fáze zygotene pokračuje přibližování homologů, které se spojují specifickým molekulárním (synaptickým) komplexem (Yang *et al.*, 2008) a následně tvoří tzv. bivalenty, zdvojené útvary se 4 chromatidami. Poté nastupuje asi 60-ti hodinová fáze pachytene, pro kterou je typickým jevem již dokončený synaptický komplex, kterým je zajištěno pevné podélné spojení homologních párů chromozomů. V této fázi obvykle probíhá crossing-over, během něhož dochází k rekombinacím DNA (Romanienko *et* Camerini-Otero, 2000). Tímto mechanismem je zajištěna genetická variabilita pohlavních buněk, z nichž se tedy v tomto ohledu každá stává unikátem.

Chiasmata jako stopy po uskutečněném crossing-overu je možné na chromozomech pozorovat ještě ve fázi diplotene, kdy se postupně rozpadá synaptický komplex a vzájemné spojení homologů povoluje. Tato fáze je však významná především tím, že během ní nastává tzv. první meiotický blok – meióza je před vstupem do metafáze zastavena a k diakinezi prozatím nedochází (Wassarman *et* Albertini, 1994; Picton *et al.*, 1998; Alberts, 2007).

Zmíněný první blok meiózy nastává v pozdním stadiu fáze diplotene, které rovněž bývá označováno jako fáze dictyate a ve kterém se u savců nachází většina oocytů v období kolem

narození samice. Obecně se uvádí, že prvním zastavením meiózy je ukončena takzvaná fáze množení zárodečných buněk, po které nastupuje fáze jejich růstu.

V roce 1951 shrnul S. Zuckerman dosavadní poznatky z oblasti reprodukční biologie v přehledu, který se stal obecně uznávaným dogmatem v této problematice. Základní myšlenkou je, že ovariální zásoba zárodečných buněk, která vystačí na celou reprodukční periodu samice, vzniká právě během fáze množení těchto buněk během fetálního vývoje. Po narození samice je již počet oocytů v ovariu striktně určený a během jejího života se může pouze postupně snižovat.

V současné době lze však citovat řadu studií, které platnost této doktríny závažným způsobem zpochybňují. Již dříve bylo prokázáno, že existují výjimky – u některých druhů dochází ke vzniku nových oocytů ve vaječnících samic i během postnatálního období života. Tento jev byl popsán např. u lemuru (Greenwald *et Terranova*, 1988). Bukovský *et al.* již v roce 1995 přišel s tvrzením, že v dospělých lidských ovarích mohou vznikat nové zárodečné buňky z epiteliálních kmenových buněk. Ostatně ještě před vznikem Zuckermanovy práce existovaly zmínky o nově vzniklých oocytech v dospělých myších ovarích (Allen, 1923). Johnson *et al.* (2004) prokázali vznik nových primordiálních zárodečných buněk v ovarích dospělých myší, a následně provedli sérii experimentů, z jejichž závěrů vyplývá, že tyto nové zárodečné buňky mohou mít původ také v krvi nebo kostní dřeni. Kromě toho Dyce *et al.* (2006) popisují, že potenciál stát se ovariálními zárodečnými buňkami mají i kmenové buňky z kůže prasat. Práce Tillyho týmu, která otevřela bouřlivou diskusi na téma postnatální oogeneze u savců, sklidila mezi odbornou veřejností vlnu kritiky a přestože se v posledních letech k novému pohledu na zmíněný problém přiklání čím dál více odborníků, stále nelze říci, že by tato teorie byla plně akceptována (Tilly *et al.*, 2009).

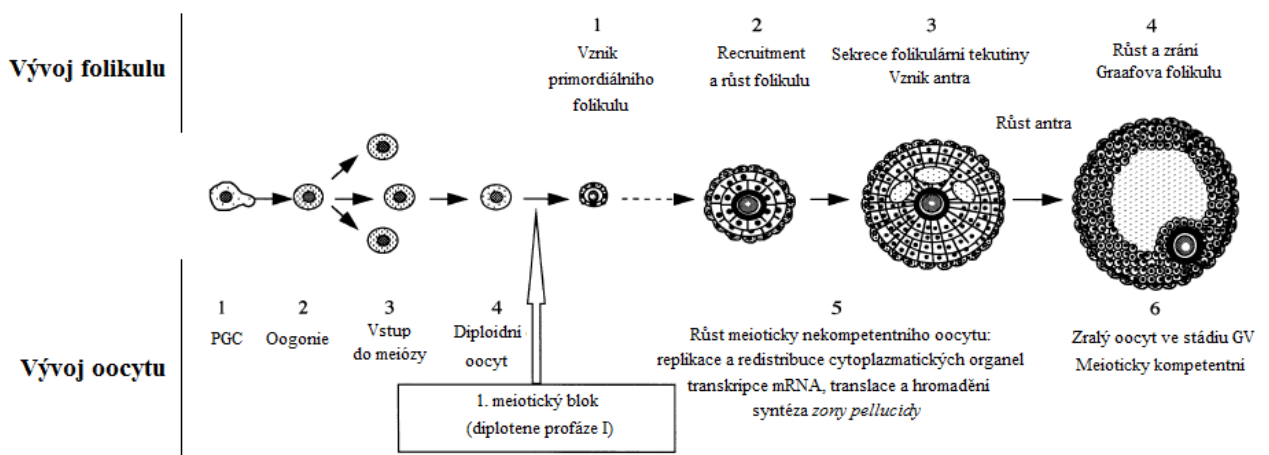
První oocyty zablokované v diplotene profáze I lze u myši pozorovat od 17,5. dne embryonálního vývoje (Borum, 1961), u člověka v 16. týdnu (Baker, 1963), u prasete lze oocyty v profázi I pozorovat od 47. dne embryonálního vývoje (Bielańska-Osuchowska, 2006). Tyto buňky jsou větší než oogonie a mají více cytoplazmatických organel. První meiotický blok oocytů trvá až do jejich aktivace po dosažení pohlavní dospělosti samice, kdy na základě stimulace zvýšenými hladinami gonadotropních hormonů začínají růst a získávají tak kompetenci k dokončení meiotického cyklu (van den Hurk *et Zhao*, 2005).

Primární nerostoucí oocyty jsou ve tkáni vaječníku volně obklopeny jednou vrstvou plochých pre-granulozních buněk. Tento útvar je označován jako primordiální folikul (Peters,

1969; Gosden *et Bownes*, 1995). První primordiální folikuly se u prasete začínají objevovat od 56. dne embryonálního vývoje (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Oocyt může na změny prostředí ovaria reagovat pouze prostřednictvím přiléhajících folikulárních buněk. Právě tyto buňky jsou mimo jiné zodpovědné za udržení oocyty v prvním meiotickém bloku (Pincus *et Enzmann*, 1935). Pro vzájemnou komunikaci mezi oocytem a folikulárními buňkami jsou důležité specifické mezibuněčné kanály typu gap junction, tzv. mezerové spoje, které umožňují přímou a rychlou mezibuněčnou výměnu molekul obsažených v cytoplazmě do velikosti asi 1kDa (Gershon *et al.*, 2008). Tato výměna se v případě oocyty týká například oligonukleotidů, inositol-fosfátů, iontů a signálních molekul včetně těch, které jsou zodpovědné za blokování dalšího dělení buňky (Hervé *et al.*, 2005).

Po zformování primordiálních folikulů kontinuálně během života samice vstupují do fáze růstu. Oocyt i folikul začínají nabývat na objemu, roste metabolická aktivita, folikulární buňky proliferují a začínají produkovat látky důležité pro další vývoj folikulu i oocyty. Např. myší oocyt během růstové fáze zvětší svůj objem až 300-krát a stejný nárůst byl zaznamenán, pokud jde o syntézu RNA v rostoucích oocytech (Wassarman *et Albertini*, 1994).



Obr. 1 Schématické znázornění průběhu oogeneze a folikulogeneze u savců podle Picton *et al.*, 1998.

3.2 Folikulogeneze

3.2.1 Primární folikuly

Moment, kdy folikuly začínají růst, mnozí autoři označují jako aktivaci folikulu, též recruitment. Z populace primordiálních folikulů vaječníku je k růstu rekrutována vždy jen poměrně malá skupina (Hsueh *et* McGee, 2000; van den Hurk *et* Zhao 2005; Monget *et al.*, 2012). Oocyty v rostoucích folikulech kromě zvětšování objemu prodělávají i kvalitativní změny, přičemž se stále nacházejí v prvním meiotickém bloku. Vaječníky savců v průběhu reprodukční periody života samice vždy obsahují jak rostoucí folikuly, tak i primordiální folikuly s oocyty zastavené ve stádiu dictyate.

Mechanismus určení, které folikuly porostou a které nikoliv, prozatím není zcela objasněn. Obecně, vstup folikulu do rostoucí skupiny je výsledkem změny poměru mezi inhibičními a stimulačními faktory. Adhikari *et* Liu (2009) uvádějí, že k udržení nerostoucí ovariální populace primordiálních folikulů slouží komplexní inhibiční molekulární mechanismus, který brání spontánnímu spuštění růstu.

Na druhou stranu, mezi lokálně syntetizované faktory podporující aktivaci folikulů patří neurotropiny (Dissen *et al.*, 2009), cytokiny (KIT a KL, LIF) a růstové faktory jako keratinocytový růstový faktor (KGF – Keratinocyte Growth Factor), fibroblastový růstový faktor (bFGF – basic Fibroblast Growth Factor) a skupina faktorů BMP (Skinner, 2005). van den Hurk *et* Zhao (2005) uvádějí další molekuly pozitivně zapojené do regulace recruitmentu, jako např. insulin (Kezele *et al.*, 2002) nebo růstový diferenciační faktor 9 (GDF-9 – Growth Differentiation Factor 9) a epidermální růstový faktor (EGF – Epidermal Growth Factor), které regulují proliferaci folikulárních buněk. Inhibiční efekt na růst oocyty/folikulu má retinoblastoma-protein (Bukovsky *et al.*, 1995), onkogen *Myc* (Li *et al.*, 1994) a částečně také antimülleriánský hormon (AMH – Anti-Müllerian Hormone) (Durlinger *et al.* 2002).

Přeměna primordiálního folikulu na aktivovaný, primární folikul, je mimo jiné provázena také změnami na folikulárních buňkách, které mění svůj tvar z plochých, dlaždicovitých, na kubické. Na stavu a počtu granulózních buněk závisí, jestli a kdy začne růst oocyt. Bylo zjištěno, že oocyt skotu v primárním folikulu začíná růst, pokud jej v místě nejdelšího obvodu obklopuje alespoň 40 granulózních buněk (Braw-Tal *et* Yossefi, 1997), u

myši je potřeba kolem 10 (Lintern Moore *et Moore*, 1979) a u člověka a ovce kolem 15 granulóznic buněk (Cahill *et Mauleon*, 1981; Gougeon *et Chainy*, 1987).

3.2.2 Sekundární folikuly

Během růstu folikuly postupně procházejí primárním stadiem a stávají se folikuly sekundárními, pre-antrálními. Utváření sekundárního folikulu zahrnuje rostoucí oocyt a několik vrstev folikulárních buněk, které nadále intenzivně proliferují. Na vnější stěně folikulu se začíná formovat vrstva buněk théky (Zamboni, 1974), která se dělí na *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. *Theca folliculi interna* je do dalšího vývoje folikulu zapojena tak, že produkuje androgeny v závislosti na hladině luteinizačního hormonu (LH – Luteinizing Hormone). Androgeny poté vstupují do granulóznic buněk folikulu, kde jsou enzymem aromatázou metabolizovány na estradiol. Hlavní funkce estrogenů v organismu samic je stimulace reprodukčního traktu prostřednictvím příslušných receptorů, ve folikulu však lokálně podporuje proliferaci a diferenciaci granulózy (Vanderhyden, 2002).

V této fázi pak oocyt uvnitř folikulu stále zvětšuje svůj objem i úroveň proteosyntézy, za trvajícího prvního meiotického bloku. Rychlost růstu oocytů závisí na počtu folikulárních buněk, které v tomto procesu plní podpůrnou funkci (Herlands *et Schultz*, 1984). Sekundární folikuly u prasete dorůstají do průměru kolem 300 μM , zatímco oocyty nabývají cca 90 μM v průměru (van den Hurk *et al.*, 1997).

Nejnápadnějším projevem metabolické aktivity oocytu v tomto stadiu je tvorba *zony pellucidy*. Jedná se o extracelulární glykoproteinový obal oocytu, který plní především ochrannou funkci. Mezi tímto obalem a cytoplazmatickou membránou oocytu pak vzniká tzv. periviteliní prostor. Savčí zona pellucida se skládá ze tří typů glykoproteinů označovaných jako ZP1, ZP2 a ZP3 (Bleil *et Wassarman*, 1980). *Zona pellucida* u myši obsahuje asi 20 % ZP1 a 80 % ZP2 a ZP3 (Boja *et al.*, 2003). Zonální polypeptidy jsou u většiny druhů savců velmi podobné (Wassarman, 2008). Myší oocyty syntetizují tyto glykoproteiny ve 2. – 3. týdnu jejich růstové fáze (Wassarman *et Litscher*, 2012), u skotu lze plně zformovanou zonu pelucidu pozorovat až v pozdně pre-antrálních folikulech (Braw-Tal *et Yossefi*, 1997). Lidská *zona pellucida* se skládá minimálně ze 4 typů zonálních glykoproteinů (Tapanainen *et al.*, 2008) a lze ji na oocytech pozorovat už ve fázi primárního folikulu (Himmelstein-Braw *et al.*, 1976). *Zona pellucida* je tak nejprve patrná jako izolované shluky filament, které postupně vytváří komplexní síť, čímž vzniká poměrně pevné, ale elastické pouzdro, jehož tloušťka se

zvětšuje s pokračujícím vývojem oocytu (Wassarman *et* Mortillo, 1991; Keefe *et al.*, 1997). Struktura *zony pellucidy* umožňuje komunikaci oocytu s bezprostředním okolím díky množství pórů, kterými prochází výběžky oocyt obklopujících buněk *corona radiata*, jejichž cytoplazmatická membrána je vybavena mezibuněčnými spoji typu gap junction (Keefe *et al.*, 1997).

3.2.3 Terciální folikuly

Terciální, antrální, folikuly jsou charakteristické vznikem tekutinou naplněné dutiny, neboli antra. Folikulární tekutina nejprve vytváří mezery mezi buňkami granulózy a s pokračujícím vývojem folikulu se produkce tekutiny zvyšuje, až vytvoří uvnitř folikulu dutinu (Eppig, 2001). U prasat je dutina patrná u folikulů o 0,4 – 0,8 mm v průměru (Crozet *et al.*, 1981; Morbeck *et al.* 1992), u skotu u 0,12 – 0,16 mm velkých folikulů (Dufour *et al.*, 1987) a v případě ovce u 0,3 mm velkých folikulů (Turnbull *et al.*, 1977).

Antrální folikuly se vyznačují poměrně rychlým růstem, při kterém jsou schopny několikanásobně zvětšit svůj původní objem. V lidských folikulech přítomné oocyty rostou z 35 na 120 μM v průměru, což představuje cca 100-násobné zvětšení objemu (Gosden *et* Bownes, 1995; Gougeon, 1996). Terciální folikuly mají potenciál dorůst až do předovulačního stadia a ty, u kterých tento proces proběhne úspěšně, jsou poté označovány jako Graafovy folikuly. Ty mohou na vaječníku vznikat až v době pohlavní dospělosti samice v rámci pravidelného opakování říjových cyklů pod vlivem působení hypofyzárních gonadotropních hormonů (Soede *et al.*, 2011). Oocyt v Graafově folikulu leží umístěn acentricky na vejconosném hrbolku, tvořeném buňkami *cumulus oophorus*, kumulárními buňkami, jejichž nejvnitřnější vrstva se nazývá *corona radiata*. Velké antrum je lemované tzv. granulózními, též murálními, buňkami a celý folikul je uzavřen ve dvou vrstvách théky. Také oocyty dále rostou a po dosažení svého maximálního a druhově specifického objemu získávají takzvanou meiotickou kompetenci. Meiotickou kompetencí se rozumí schopnost oocytu vystoupit z meiotického bloku a dokončit meiotické dělení. Obvykle je možné z velikosti folikulu orientačně odhadnout, zda se v daném folikulu nachází meioticky kompetentní oocyt či nikoliv, kdy se u prasete jedná o folikuly velikosti 3 – 5 mm (van den Hurk *et* Zhao, 2005).

3.3 Získání meiotické kompetence oocytů

Pro pokračování meiózy je nutný rozpad jaderné membrány (GVBD - Germinal Vesicle Breakdown), aby se mohla polovina dědičné informace oocytu přesunout do vyděleného 1. pólového tělíska. Schopnost podstoupit GVBD však mají pouze oocyty s ukončeným růstem, ve kterém správně proběhly všechny potřebné změny v jádře i v cytoplazmě a organelách v ní rozptýlených.

U prasat získávají částečnou meiotickou kompetenci, tedy schopnost zahájit GVBD, pouze oocyty z folikulů velkých alespoň 1 mm. Dokončit 1. meiotické dělení *in vitro* a dosáhnout metafáze II však mají až oocyty s plnou meiotickou kompetencí, uložené v antrálních folikulech velkých cca 2 mm a více (Motlík *et al.*, 1984). Takové oocyty mají průměr 115 – 120 μm a jsou považovány za plně dospělé (McGaughtey *et al.*, 1979). Meioticky kompetentní prasečí oocyty mají oproti období růstu výrazně nižší úroveň transkripční aktivity v jádře (Motlík *et al.*, 1984).

Pokud jde o kvalitativní změny v oocytu, které prodělává během růstu, ty zahrnují jak vznik nových genových produktů a organel, tak především přeorganizování těch původních nebo jejich modifikace (Picton *et Gosden*, 1998). Zmnožení cytoplasmických organel se týká zejména mitochondrií a jejich DNA či ribozómů, s kterými souvisí zvýšená syntéza RNA). Mnohé organely poměrně výrazně mění svůj tvar, jako např. mitochondrie, které jsou původně téměř kulovité a postupně se prodlužují, přičemž morfologické změny lze pozorovat i na jejich vnitřním členění - kristách. Dále jsou patrné změny na endoplazmatickém retikulu nebo Golgiho aparátu, kde se jedná především o postupné rozšiřování cisteren a celý komplex se s pokračujícím vývojem oocytu stává složitějším. Většina organel vykazuje tendenci posouvat se směrem k periférii buňky. Tím je například usnadněn transport glykoproteinů z Golgiho aparátu do zony pellucidy nebo vznik a rozmístění kortikálních granulí, která hrají důležitou roli později při fertilizaci (Mehlmann *et al.* 1995; Liu, 2011). V ooplazmě se pak hromadí četné membránou ohraničené váčky, glykogenová granula, lipidové kapénky apod. jako zásoba energie a substrátů pro tvorbu nových membrán po fertilizaci.

Jádro rostoucího prasečího oocytu má vláknitě granulózní strukturu a je zvětšené. Jaderná membrána tvoří dobře pozorovatelný prstenec a obsahuje množství pórů (Crozet *et al.*, 1981). Dekondenzovaný chromatin zůstává v konfiguraci typické pro stadium prvního

meiotického bloku, fázi dictyate. Toto uspořádání se označuje jako zárodečný váček (GV – Germinal Vesicle).

Na udržení prvního meiotického bloku se podílí řada specifických molekul zapojených do komplexních signálních kaskád. Charakteristice nejvýznamnějších z nich je věnována samostatná kapitola (3.5).

3.4 Meiotické zrání oocytů

Meioticky kompetentní oocyt je připraven vystoupit z prvního meiotického bloku a pokračovat v dělení až do dalšího spontánního zastavení, a to v metafázi II. Ke znovuzahájení meiózy dochází u samice poprvé s nástupem puberty. V tomto období se mění způsob, jakým je do organismu vyplavován gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH - Gonadotropin Releasing Hormone) z hypotalamu, což přímo ovlivňuje hladiny gonadotropních hormonů, LH a FSH, v krvi. Cyklické změny v koncentracích gonadotropních hormonů mají za následek odpovídající změny na vaječnicku. Říjový (estrální) cyklus samic savců je charakterizován střídáním takzvané luteální a folikulární fáze. Během luteální fáze je organismus převážně pod vlivem hormonu progesteronu, zatímco pro folikulární fázi jsou typické zvýšené hladiny LH, FSH a estrogenů.

Délka estrálního cyklu u prasnic se pohybuje v rozpětí 18 – 24 dní. Folikulární fáze estrálního cyklu prasnice trvá 5 - 7 dní a nastupuje po odeznění luteální fáze. Na jejím počátku se na vaječnicku vyskytuje množství antrálních folikulů, z nichž jsou ty největší na základě změn charakteru pulsního uvolňování GnRH a potažmo LH a FSH rekrutovány k dalšímu vývoji. Některé z těchto vybraných folikulů později dorostou v Graafovy folikuly schopné ovulace. V každém estrálním cyklu prasnice ovuluje 15 - 30 folikulů v závislosti na věku, výživném stavu samice a dalších faktorech (Soede *et al.*, 2011).

Pro zahájení fáze zrání oocytu je v podmínkách *in vivo* potřebná pre-ovulační vlna gonadotropinů, která stimuluje folikul k dalšímu růstu a vývoji. Oocyt sám o sobě nemá receptory pro gonadotropní hormony, proto je během zrání odkázán na komunikaci s thékálními a granulózními buňkami, které disponují receptory pro LH (Channing *et al.*, 1981; Meduri *et al.*, 1996; Eckery *et al.*, 1997). Bylo zjištěno, že izolované oocyty kultivované *in vitro* zrají spontánně i v médiu bez obsahu steroidních hormonů a pod vlivem růstových faktorů jako inzulínu podobný růstový faktor (IGF – Insuline-like Growth Factor) nebo epidermální růstový faktor (EGF – Epidermal Growth Factor) (Singh *et al.*, 1997; Uhm *et al.*, 1998). Nicméně, LH vlna v *in vivo* podmínkách eliminuje faktory inhibující zrání a oocyt uvnitř rekrutovaného folikulu pak prodělává řadu změn v přípravě na fertilizaci. Tyto změny lze pozorovat v jádře i v cytoplazmě.

3.4.1 Jaderné zrání

Jaderné zrání je charakterizováno především změnami konfigurace chromatinu a stavu jaderné membrány. Zahájení meiotického zrání GV oocyty vyžaduje GVBD. Samotný proces rozpadu jaderné membrány je možné rozdělit do čtyř (Motlík *et Fulka*, 1976; Motlík *et al.*, 1978) nebo pěti (Sun *et al.*, 2004) stadií, pojmenovaných podle morfologického stavu GV. První stadia, GV-0 a GV-I, představují u prasat neporušený zárodečný váček, jen s mírnými rozdíly ve stupni kondenzace chromatinu. Jaderná membrána i jadérko jsou v GV-I dobře pozorovatelné, chromatin tvoří kolem jadérka prsteneček nebo je uspořádán do tvaru podkovy. Ve fázi GV-II lze na zvláště jaderné membráně pozorovat struktury heterochromatinu. GV-III znamená výskyt slabě barvitelných shluků chromatinu zejména v okolí jadérka, které začíná získávat vláknitou strukturu a jaderná membrána se dále deformuje. V posledním stadiu, GV-IV, již membrána není zřetelná a jadérko je rozptýleno (Motlík *et Fulka*, 1976). Podobně probíhá GVBD také u jiných savců (Motlík *et al.*, 1978; Hyttel *et al.*, 1997, Tan *et al.*, 2009). U prasete celý proces trvá cca 14 – 16 hodin (Thibault *et al.*, 1987). Po rozpadu jaderné membrány vytvoří kondenzovaný chromatin v cytoplazmě oocyty kompaktní shluk. Tato fáze je označována jako pozdní diakineze (LD - late diakinesis).

Následuje metafáze I, kdy se vytvoří 1. meiotické dělicí vřeténko a chromozomy se v něm uspořádají do typické metafázní figury, jež se vyznačuje seřazením chromozomů v jeho ekvatoriální rovině. Poté dochází k rozdělení bivalentů. Jednotlivé chromozomy se dvěma chromatidami se za postupného zkracování mikrotubulů dělicího vřeténka posouvají směrem k jeho pólům, čímž je charakterizován přechod do anafáze I.

Během telofáze I pak dochází k vydělení prvního pólového tělíska, do kterého odchází jedna sada chromozomů. Pólové tělísko se poté nachází v perivitellinním prostoru mezi oolemou a *zonou pellucidou*. Je několikanásobně menší než oocyt, protože obsahuje jen malé množství cytoplazmy. Chromozomy prvního pólového tělíska obvykle v průběhu dalšího vývoje oocyty degenerují (Wassarman, 1988). Asymetrické rozdělení buňky při extruzi pólového tělíska je důsledkem acentrického umístění dělicího vřeténka, které je v cytosolu výrazně posunuto k periférii oocyty.

Během přechodu z meiózy I do meiózy II je chromatin oocyty udržován v kondenzovaném stavu (Williams, 2002; Kishimoto, 2003). Oocyt pokračuje v procesu zrání přes profázi II až do metafáze II, kdy dochází ke druhému zastavení meiózy. Chromozomy oocyty, které v něm zbyly po vydělení pólového tělíska, opět utvoří metafázní figuru a nastává 2. meiotický blok v metafázi II, ve kterém oocyt setrvává až do oplození.

3.4.2 Ultrastrukturální cytoplazmatické změny

Cytoplazmatické zrání představuje komplexní změny vedoucí k tvorbě redukované a oplození schopné samičí gamety. Tyto změny předurčují také úspěšnost oplození a kvalitu dalšího embryonálního vývoje. Cytoplazmatické zrání oocyty zahrnuje především změnu rozmístění určitých cytoplazmatických organel, případně jejich modifikaci. Na přesunech organel, ale i na změnách konfigurace chromatinu v průběhu meiotického zrání oocyty, se podílí dynamická cytoskeletální síť buňky, jejíž součástí jsou mikrotubuly, aktinová vlákna a intermediální filamenta (Schatten *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2014). Volně jsou v cytosolu rozptýleny substráty pro energetický metabolismus v podobě lipidových kapének nebo např. jako drobný krystalický materiál (Wassarman *et al.*, 1994).

Mitochondrie se ve stadiu GV shlukují kolem jádra, aby se po vydělení pólového tělíska znovu rozptýlily v cytoplazmě a následně se opět shromáždily kolem metafázní figury v M II. K mitochondriím se během zrání oocyty připojují zploštělé struktury hladkého endoplazmatického retikula (Szöllösi, 1972). V cytoplazmě zrajícího oocyty lze pozorovat množství membránových váčků, které se často spojují s malými skupinami volných ribozomů (Szöllösi, 1981). Endoplazmatické retikulum mimo jiné hraje významnou roli při aktivaci oocyty během oplození, kdy jako největší zásobárna vápenatých iontů v buňce uvolní velké množství Ca^{2+} do cytoplazmy (Mehlmann *et al.*, 1995; Mehlmann *et al.*, 2010).

Golgiho aparát (GA – golgi apparatus) nejprve obklopuje zárodečný váček a s pokračujícím zráním oocyty se jeho cisterny zplošťují a prodlužují, zatímco se celý komplex posouvá k povrchu buňky. V souvislosti s tím se periferie buňky postupně zaplňuje také kortikálními granuly, které jsou z GA odvozené (Thibault *et al.*, 1987) a jejichž úloha při oplození spočívá v uvolnění svého obsahu do perivitellinního prostoru. To má pak za následek nevratné změny ve struktuře *zóny pellucidy*, přičemž tento mechanismus působí jako prevence polyspermie (Moricard *et al.*, 1975).

Substráty sloužící jako zásoba energie jsou v cytoplazmě oocyty uloženy např. jako lipidové kapénky, případně drobný krystalický materiál. Redistribuce a modifikace cytoplazmatických organel oocyty je nutná pro následnou aktivaci transkripční aktivity v přípravě na oplození a následný embryonální vývoj. Pouze zralý oocyt, u kterého tyto pochody správně proběhly, získává takzvanou vývojovou kompetenci, tj. schopnost dokončit

2. meiotické dělení, správně projít fertilizací a úspěšně zahájit embryogenezi (Marchal *et al.*, 2001; Sardet *et al.*, 2002).

Úroveň transkripční aktivity v průběhu oogeneze kolísá a postupně se snižuje. Nejintenzivněji je RNA syntetizována během růstové fáze oocyty, u myši zejména v jejím 2. a 3. týdnu věku. U plně vzrostlých oocytů úroveň transkripce významně klesá a s nástupem zrání, potažmo ovulace, prakticky úplně ustává. Plně vzrostlý myší oocyt obsahuje asi 200krát více RNA než běžná somatická buňka. Pokud jde o proteosyntézu, její úroveň se v průběhu růstu a zrání oocyty také mění, v různých stadiích růstu oocyty jsou proteiny syntetizovány v odlišných množstvích. Vzhledem k tomu, jak oocyt zvětšuje svůj objem, koncentrace celkového proteinu zůstává víceméně stejná i při zvýšené úrovni proteosyntézy. Při ovulaci obsahuje myší oocyt přibližně 40 pg DNA, 500 pg RNA, 20 – 25 ng proteinu (bez zóny *pellucida*), 150 pg glykogenu, 100.000 mitochondrií, 1 mil. ribozomů a 4.500 kortikálních granul (Wasarman *et al.*, 1994).

3.4.3 Expanze kumulu

Kumulární buňky obklopující oocyt reagují na předovulační vlnu LH rozsáhlou reorganizací cytoskeletu a syntézou hyaluronové kyseliny (Nagyova, 2012). To má za následek rozvolnění původně kompaktního kumulu, přičemž extracelulární matrix kumulárních buněk získává mukózní charakter a celý kumulo-oocytární komplex nabývá na objemu. Význam tohoto jevu zvaného kumulární expanze zřejmě spočívá v usnadnění průběhu ovulace, selekci spermií na základě kvality jejich akrozómů (nutnost funkčního enzymu hyaluronidázy) a zabránit polyspermii (Vanderhyden, 2002; Nagyova, 2012).

V průběhu expanze kumulu dochází k přerušení buněčných spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami, čímž je zastavena oboustranná komunikace mezi nimi. Vzájemné propojení kumulárních buněk však zůstává nadále zachováno (Suzuki *et al.*, 2000). S přerušením kumulo – oocytárních mezibuněčných spojů typu gap junction mimo jiné ustává zásobení oocyty faktorem cAMP, faktoru odpovědného za 1. meiotický blok, čímž je stimulován proces zrání oocyty. Důsledkem poklesu oocytárního cAMP je aktivace MPF, který hraje klíčovou roli ve vystoupení oocyty z fáze dictyate a při jeho pokračování v meióze (Dekel, 1988; Sherizly *et al.*, 1988).

3.5 Regulace meiotického zrání oocytů

Na regulaci meiotického zrání savčích oocytů se podílí množství faktorů, přičemž úloha velké části z nich zatím nebyla plně objasněna. Na tomto místě bude zmíněna charakteristika nejvýznamnějších z těchto faktorů, jejichž funkci v procesu zrání oocytů se prozatím podařilo porozumět nejlépe.

3.5.1 Cyklické nukleotidy – cAMP, cGMP

Vysoké hladiny cAMP udržují oocyt v 1. meiotickém bloku (fáze dictyate). Je syntetizován granulózními buňkami za účasti enzymu adenylát-cyklázy (AC – Adenylate Cyclase) a do oocytu vstupuje prostřednictvím spojů gap junction. Pokles intracelulární hladiny cAMP je provázen zahájením meiotického zrání oocytu (Conti *et al.*, 2012). Mechanismus jeho působení spočívá v regulaci aktivity cAMP-dependentní protein kinázy (PKA – protein kinase A), která přímo reguluje další faktory podílející se na udržení nízké aktivity MPF. Těmito faktory jsou 1) kináza WEE1, jejíž fosforylace kinázou PKA zvyšuje její aktivitu, čímž je blokován MPF v jádře oocytu (Han *et al.*, 2005) a 2) CDC25 fosfatáza, jejíž fosforylace zprostředkovaná kinázou PKA má na její funkci negativní účinek (Oh, *et al.*, 2010). Aktivní CDC25 fosfatáza je důležitá pro defosforylaci (tedy aktivaci) katalytické podjednotky komplexu MPF, kinázy CDK1 (CDK1 – Cyclin-dependent kinase 1).

cGMP vzniká ve folikulárních buňkách účinkem enzymu guanylát-cyklázy (GC - Guanylate Cyclase) z guanosin trifosfátu (GTP – Guanosine-5'-triphosphate). Aktivita GC je regulována oxidem dusnatým (LaPolt *et Hong*, 1995). cGMP pravděpodobně inhibuje hydrolýzu cAMP, čímž pomáhá udržovat oocyt v meiotickém bloku (Adhikari *et Liu*, 2014). Zdá se, že tato jeho funkce může být důsledkem jeho inhibičního účinku na endogenní fosfodiesterázu oocytu (PDE3A – Phosphodiesterase 3A), která v aktivní formě hydrolyzuje cAMP. Omezením jejího působení tedy pomáhá udržovat vysokou hladinu cAMP a brání tak zahájení zrání oocytu (Conti *et al.*, 2012). Na regulaci hladiny cGMP v oocytu se podílí rovněž gonadotropní hormony, jako je FSH a LH (Zhang *et al.*, 2009).

3.5.2 Maturation/M-phase promoting factor (MPF)

MPF je heterodimer, který se skládá z regulační podjednotky tvořené cyklinem B, a katalytické podjednotky tvořené CDK1 (Ito *et Kashiwazaki*, 2012). Aktivní MPF způsobuje degradaci cAMP a znovuzahájení meiózy. Pokud je CDK1 inhibičně fosforylována na Thr14 a Tyr15, jedná se o neaktivní komplex zvaný pre-MPF (Wassarman *et Albertini*, 1994; Vanderhyden, 2002; van den Hurk *et Zhao*, 2005). Tyto inhibiční fosforylace jsou katalyzovány kinázami WEE1 a MYT1, defosforylace je pak závislá na CDC25 fosfatáze. Aktivitu obou zmíněných kináz i fosfatázy přímo reguluje PKA (Han *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2010). PKA zprostředkovává fosforylaci kinázy WEE1, čímž zvyšuje její aktivitu. Zvýšená aktivita WEE1 kinázy pak inhibuje aktivitu MPF. Tento mechanismus udržuje aktivitu MPF během meiotického bloku na nízké úrovni. Aktivita MPF narůstá při GVBD a vysoká je zachována při MI a při MII. Cyklin B jako regulační podjednotka MPF je v oocytu během meiotického bloku průběžně degradován pomocí anafázi podporujícího komplexu a cyklozómu (APC/C - Anaphase Promoting Complex/Cyclosome). Tento komplex svou aktivitou zprostředkovává navázání ubiquitinu na cyklin B, který je posléze degradován v proteasomu. Dojde-li ke snížení aktivity APC/C, vzroste obsah cyklinu B v oocytu, což je jeden z mechanismů podílejících se na spuštění spontánního zrání oocytu (Holt *et al.*, 2011).

3.5.3 Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK)

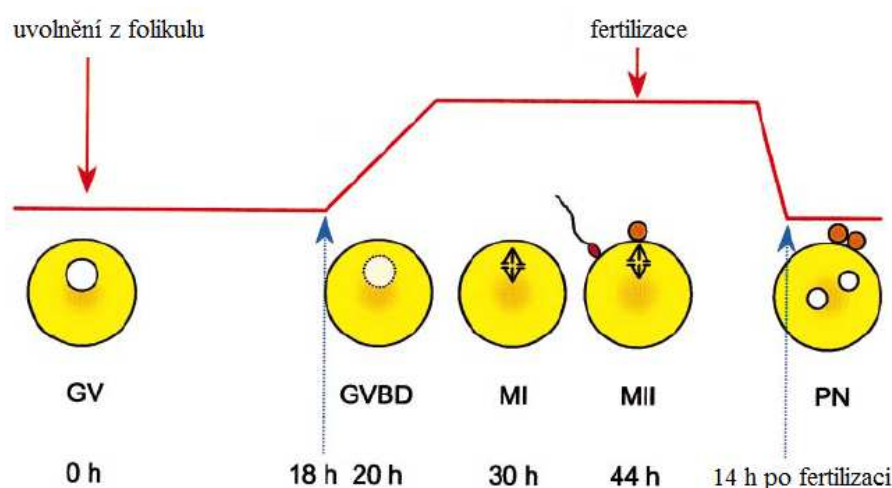
Jako mitogeny aktivované protein kinázy (MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinases) se označuje poměrně početná skupina enzymů, které jsou typické tím, že jejich aktivita je regulována extracelulárními signály (odtud také další označení ERK – Extracellular Signal-Regulated Kinase). Jedná se o serin/threoninové kinázy, které pro svou aktivaci potřebují být fosforylovány na threoninových a tyrosinových zbytcích (Fan *et Sun*, 2004).

U savčích oocytů byly popsány 2 isoformy MAP kinázy: ERK1 a ERK2 (Fan *et Sun*, 2004). Obě jsou v proteinové funkční kaskádě fosforylačně aktivovány specifickou MAP kinázou kinázou (MAPKK), často označovanou MEK. Aktivita MEK je regulována její vlastní kinázou (MAPKKK), též Mos. Jedná se o produkt protoonkogenu *c-Mos* - kinázu specifickou pro zárodečné buňky (Posada *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 2007). Ta fosforyluje komplex APC/C, který v buňkách zajišťuje degradaci cyklinů, včetně cyklinu B, který je součástí MPF.

Inhibičním faktorem APC/C je Erp1/Emi2. Pro udržení oocyty v metafázi II je nutná fosforylace Erp1/Emi2 kinázou p90RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase). Tato složitá fosforylační kaskáda je někdy označována jako cytostatický faktor - CSF (Paronetto *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2007; Nishiyama, *et al.*, 2007).

MAPK se podílí na udržení aktivity MPF, dále fosforylací proteinů cytoskeletu a mikrotubulů umožňuje vznik dělicího vřeténka a podílí se na zastavení meiózy v metafázi II (Fan *et Sun*, 2004; van den Hur *et Zhao*, 2005). Načasování aktivace MAPK se druhově specificky liší. Zatímco u většiny hospodářských zvířat je MAPK aktivována v prakticky zároveň se zahájením GVBD (Fissore *et al.* 1996), u prasete k tomu dochází dříve (Wehrend *et Meinecke*, 2001) a u myši naopak později (Stojkovic *et al.* 1999).

V savčích oocytech je MAPK zodpovědná za fosforylaci proteinů, které pomáhají udržet chromozomy v kondenzovaném stavu během přechodu z první meiózy do druhé a zabráňuje tak vstupu do interfáze. Aktivita MAPK přetrvává i v okamžiku, kdy poklesne aktivita MPF (Dekel *et al.*, 1995). Kromě toho MAPK pravděpodobně fosforylací jaderných lamin brání vzniku jaderného obalu, případně podporuje rozpad jaderné membrány (Moos *et al.*, 1995). Spustit fosforylační kaskádu MAPK jsou schopny jen meioticky kompetentní oocyty, které mohou aktivovat cdc2 (CDK1) kinázu jako součást MPF. Rostoucím oocytům tato schopnost chybí (Harrouk *et Clarke*, 1995).



Obr. 2 Schéma aktivity MAPK v průběhu meiotického zrání u prasete. PN – stádium prvojader (pronucleus). Převzato z: Fan *et Sun*, 2004.

3.5.4 Vápenaté ionty (Ca^{2+})

Vápenaté ionty slouží v organismu jako důležitá signální molekula ovlivňující celou řadu biologických procesů v buňkách a tkáních. Signalizace zahrnující vápník je stěžejní například pro funkci kosterního svalstva (Chin, 2005) či nervové soustavy (Egorova *et al.*, 2015) a v případě reprodukce pak hraje důležitou roli při aktivaci oocyty během fertilizace (Williams, 2002).

Vápník se do buněk dostává prostřednictvím inositol-1,4,5-trifosfátových receptorů (IP_3R) nebo přes ryanodinové receptory (RyR) (Petr *et al.*, 2002). Přímo do cílových organel se pak dostává přes membránu ve formě Ca^{2+} za pomoci adenosin trifosfátových SERCA pump (Wakai *et al.*, 2013). Hlavní zásobárnou Ca^{2+} v oocyty je endoplazmatické retikulum, v prasečích oocytech se dále nejvíce vápníkových iontů nachází v karyoplazmě, vakuolách, mitochondriích a na povrchu lipidových váčků (Petr *et al.*, 2001). Vápníkové ionty působí na cílové proteiny nepřímo přes protein kalmodulin, na který se váže.

Signalizace vápenatými ionty má z hlediska zrání oocyty význam především při zahájení výstupu z 1. meiotického bloku (Rozinek *et al.*, 2003; Wassaman, 1988). Pokud je blokován vstup Ca^{2+} nedochází ke GVBD (Wassarman *et al.*, 1994). Pro zahájení aktivity MPF je nutná stimulace folikulu vlnou LH Tato vlna aktivuje fosfolipázu C, čímž je spuštěno přechodné zvýšení hladiny Ca^{2+} v cytosolu (Anderson *et al.* 1996; Flores *et al.*, 1998). Tento impuls má za následek syntézu inositol trifosfátu (IP_3), který moduluje funkci membránových iontových kanálů. Cílem celého mechanismu je aktivace kalmodulin-dependentní protein kinázy II (CaMKII), která je ve své funkci závislá na oscilaci Ca^{2+} . Její úlohou v oocytech rodu *Xenopus* je pak aktivační fosforylace MPF (Lorca *et al.*, 1993). Fosfolipáza C ζ je pravděpodobně také faktorem spermie, který při oplození spouští uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (Swann *et al.*, 2013). Po oplození dochází k rapidnímu zvýšení hladiny Ca^{2+} v oocyty. Ionty se uvolňují z ER otevřenými iontovými kanály. Tento jev je signálem pro znovuzahájení meiózy v MII a následnou formaci prvojader (Miyazaki *et al.*, 2006). Signál se šíří celým oocytem od místa průniku spermie (Williams, 2002). Vzestup hladiny Ca^{2+} v cytosolu po fertilizaci je důležitý pro exocytózu kortikálních granul, která zabráňuje polyspermii (Kline *et al.*, 1992).

3.6 Gasotransmitery

Biologické procesy probíhající v savčích buňkách jsou velmi často výsledkem složitých signálních kaskád, kterých se účastní řada molekul se specifickými funkcemi. Těmito molekulami mohou být nejen různé proteiny či ionty, ale také malé plynné molekuly, jejichž vliv na organismus ve smyslu intracelulární signalizace je v současné době předmětem intenzivního výzkumu. Mezi molekuly s touto schopností patří malé plynné molekuly zvané gasotransmitery. Gasotransmitery představují zatím dosud tříčlennou skupinu plynů, které byly již dříve v medicíně zkoumány pro svou toxicitu vůči organismům, pokud se v nich vyskytovaly ve vysokých koncentracích. Těmito plyny jsou oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S). Teprve relativně nedávno bylo zjištěno, že v nízkých koncentracích naopak tyto plyny zastávají v organismu důležité autokrinní, endokrinní a parakrinní funkce (Šmelcová *et Tichovská*, 2011; Wang, 2014).

Gasotransmitery endogenního původu vznikají v buňkách ze specifických substrátů za katalýzy příslušnými enzymy a organismus je schopen jejich funkci regulovat. Pro tyto molekuly je typické, že snadno procházejí cytoplazmatickou membránou a podle místa svého vzniku se pak podílejí na fyziologických procesech, jako je přenos nervového vzruchu, vazodilatace a svalová relaxace nebo imunitní reakce organismu (Wang, 2014).

V současné době je předmětem výzkumu také úloha gasotransmitterů v reprodukční soustavě savců. Bylo prokázáno, že ovlivňují plodnost samců i samic. U samic skrze působení v cévním systému například ovlivňují erekci penisu (Shamloul, 2009), v samičí reprodukční soustavě pak napomáhají zejména udržení březosti zamezením kontrakcí děložní svaloviny (Patel *et al.*, 2009). U obou pohlaví jsou gasotransmitery zapojeny do tvorby a zrání pohlavních buněk – spermií a oocytů (Machado-Oliviera *et al.*, 2008; Chmelíková *et al.*, 2011).

3.6.1 NO – oxid dusnatý

Prvním popsáním gasotransmitterem byl oxid dusnatý (NO), u kterého byla v roce 1987 potvrzena schopnost rozšiřovat cévy, tj. vazodilatace (Ingarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Pro tento objev byla autorům daných průlomových studií v roce 1998 udělena

Nobelova cena za fyziologii. Poté byly postupně objevovány další oblasti vlivu NO jako signální molekuly v organismu.

NO vzniká jako vedlejší produkt přeměny aminokyseliny L-argininu na L-citrulin, která je katalyzována enzymem NO-syntázou (NOS – Nitric Oxide Synthase) (Stuehr *et al.*, 1999). Tento enzym se v organismu vyskytuje ve třech isoformách, které lze detekovat v různých orgánových soustavách a tkáních (Alderton *et al.*, 2001).

Jedná se o nervovou NOS (nNOS), identifikovanou v nervové tkáni, dále endotelovou NOS (eNOS), která byla poprvé objevena v cévním endotelu a takzvaná indukibilní NOS (iNOS), vyskytující se zejména v prostředí imunitního systému, kde se uplatňuje jako faktor spouštějící apoptózu (Karpuzoglu *et Ahmed*, 2006).

eNOS a nNOS obvykle produkují malé množství NO a jejich funkce je závislá na vazbě na kalmodulin. Navázání kalmodulinu do molekuly NOS je potřebné pro aktivační změnu konformace enzymu (Stuehr, 1999). V případě iNOS je však kalmodulin již přímo součástí molekuly, její aktivita tedy jeho případným nedostatkem není tlumena. Proto iNOS produkuje větší množství NO, a to také po delší dobu než předchozí dva zmíněné enzymy (Chung *et al.*, 2001).

Nově vzniklé molekuly NO mají charakter volného radikálu a v této formě zůstávají pouze velmi krátkou dobu. Krátce po svém vzniku totiž obvykle reagují s jinými molekulami za vzniku různých funkčních, ale i škodlivých sloučenin. Příkladem je reakce NO s kyslíkem za NO_2 , který dimerizuje ve formu N_2O_4 . Pokud však prostý NO_2 bude reagovat s NO, vzniká N_2O_3 se schopností post-translačně modifikovat proteiny na jejich cysteinových zbytcích (Tannenbaum *et White*, 2006). Tato modifikace se nazývá S-nitrosylace, která je aktuálně často porovnávána s podobnou modifikací, a to sulfanem zprostředkovanou S-sulhydratací (Lu *et al.*, 2013).

Vazodilatační efekt NO má základ v jeho schopnosti indukovat relaxaci hladkosvalových buněk, což se týká nejen cévního systému, ale také např. myometria (Duckitt *et al.*, 2011). NO se dále podílí na uvolnění srdeční i příčně pruhované svaloviny, a to aktivací enzymu guanylát cyklázy, která poté začne tvořit cGMP (Denninger *et Marletta*, 1999). cGMP je schopen aktivovat proteinkinázu G (PKG – Protein Kinase G), což má za následek snížení koncentrace Ca^{2+} ve svalových buňkách a v důsledku toho pak poklesne svalové napětí.

Úloha NO v reprodukci spočívá u samců především v regulaci uvolňování hormonů, stimulačním vlivu na erekci, podpoře spermatogeneze a ve vlivu na motilitu spermií (Machado-Oliviera *et al.*, 2008). U samic pak NO působí podobně, pokud jde o hormonální

regulaci pohlavních funkcí a dále se významně podílí na udržení březosti zamezením kontrakcí děložní svaloviny. Kontrakce buněk hladkého svalstva jsou NO ovlivňovány také ve vejcovodech. NOS byla detekována v myších ováriích, a to jak přímo v oocytech, tak v granulóznicích i thékálních buňkách (Zhang *et al.*, 2011). Podobná zjištění naznačují, že NO je zapojen do vývoje oocytů u savců a ovlivňuje jejich růst i meiotické zrání (Chmelíková *et al.*, 2011; Šmelcová *et Tichovská*, 2011). Úloha NO v oocytu během zrání zahrnuje regulaci signální kaskády, která spouští přechod oocytů z fáze MI do MII, ale přesný mechanismus jeho působení v této oblasti ještě není znám (Jablonka-Shariff *et Olson* 1998, 2000).

3.6.2 CO – oxid uhelnatý

Druhým objeveným gasotransmitterem je oxid uhelnatý (CO), který byl, stejně jako ostatní molekuly gasotransmiterů, nejprve považován jen za toxický plyn s nepříznivým dopadem na organismus (Weaver, 1999). Podobně jako NO, oxid uhelnatý může působit jako signální molekula v nízkých koncentracích a plnit dokonce ochrannou funkci (Ryter *et al.*, 2002). Při vysokých koncentracích funguje jako jed (Ryter *et Otterbein*, 2004). CO vzniká jako produkt reakce, při které je degradován hem specifickým enzymem zvaným hem oxygenáza (HO – Heme Oxygenase) (Tenhunen *et al.*, 1968). Ta se v organismu vyskytuje ve třech izoformách – HO-1, HO-2 a HO-3 (Ryter *et al.*, 2002). HO-1 je buňkami syntetizována v odpovědi na stres (Ryter *et Otterbein*, 2004) nebo například v makrofázích jako reakce na bakteriální infekci (Wegiel *et al.*, 2014). HO-2 je lokalizována především v cévním endotelu (Zakhary *et al.*, 1996) a HO-3 je zejména přenašečem kyslíku (Šmelcová *et Tichovská*, 2011).

CO se váže na hemoproteiny (Ryter, 2004) jako je např. myoglobin ve svalech či cytochrom-c oxidázu v mitochondriích (Brown *et Piantadosi*, 1990). Pokud je organismus vystaven vysokým koncentracím CO, dochází k saturaci hemoglobinu a tkáňové hypoxii (Weaver, 1999). Jako signální molekula však v buňkách ovlivňuje některé důležité funkční kaskády. Reguluje například aktivitu guanylát cyklázy, která vytváří cGMP, nebo MAPK (Otterbein, *et al.*, 2000; Furchgott *et Jothianandan*, 1991). Je dalším plynem, který přímo moduluje funkci membránových draslíkových kanálů (Peers, 2011). S tím je spojen jeho vazodilatační účinek, podobně jako je tomu u NO.

V oblasti reprodukce savců se uplatňuje právě zejména schopnost CO uvolňovat svalové napětí a zvyšovat průtok cév. Tím působí pozitivně na erekci penisu a ejakulaci u samců (Burnett *et al.*, 1998; Shamloul, 2009). V případě samic se pak podílí na udržení

březosti např. tím, že tlumí kontrakce děložní svaloviny (Acevedo *et* Ahmed, 1998; Cella *et al.*, 2006). Mimo to byla HO1 detekována v kumulárních buňkách folikulu u člověka (Bergandi *et al.*, 2014). Další zajímavou funkcí CO ve vztahu k reprodukci je jeho účast na hormonálním řízení organismu (Horváth, *et al.*, 2008; Errico *et al.*, 2010).

3.6.3 H₂S – sulfan

H₂S je bezbarvý plyn, jehož molekula je tvořena dvěma atomy vodíku a jedním atomem síry. Je známý svým charakteristickým zápachem, který se projevuje již při koncentracích nižších než 1 ppm, při 4 ppm způsobuje u člověka bolesti hlavy a ve vysokých koncentracích může mít H₂S letální efekt (Reiffenstein *et al.*, 1992).

H₂S byl v biologii a medicíně dlouho považován za plyn pouze toxický. Teprve v roce 1996 Abe *et* Kimura popsali neuromodulační funkci nízkých koncentrací H₂S v mozku. Tím byl iniciován rozsáhlý výzkum H₂S a jeho působení jako třetího neurotransmiteru (Wang, 2002). V současné době je H₂S v popředí zájmu především pro svůj terapeutický potenciál využitelný v medicíně (Szabó, 2007).

H₂S endogenního původu vzniká v buňkách z aminokyseliny L-cyteinu za katalýzy třemi specifickými enzymy: cystathionine β-syntáza (CBS - Jhee *et* Kruger, 2005), cystathionine γ-lyáza (CSE – Snyder *et* Gadalla, 2010) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3MPST – Shibuya *et al.*, 2009). Poslední zmiňovaný enzym byl nalezen v centrální nervové soustavě, CBS a CSE pak pokrývají potřebu H₂S ve většině ostatních systémů a tkání.

CBS je enzym, který katalyzuje konverzi serinu a homocysteinu na cystathionin a vodu. Jeho struktura zahrnuje tři funkční domény, z nichž jedna tvoří katalytické jádro a ostatní dvě obsahují regulační oblasti. Na C-konci enzymu se nachází negativně regulační oblast a na N-konci je přítomen hem. Tato druhá doména reguluje aktivitu enzymu v závislosti na redoxních podmínkách (Jhee *et* Kruger, 2005). Aktivita CBS může být inhibována CO, hydroxylaminy a aminooxyoctovou kyselinou (Abe *et* Kimura, 1996; Snyder *et* Gadalla, 2010).

CSE konvertuje cystein na thiocystein, pyruvát a amoniak. Thiocystein poté reaguje s cysteinem nebo jinými thioly, přičemž vznikají mimo jiné také právě molekuly H₂S (Snyder *et* Gadalla, 2010). Aktivita CSE je modulována kalcium-kalmodulinovým komplexem (Yang *et al.*, 2008).

Fyziologická funkce H_2S v organismu byla prokázána řadou experimentů, které pracovaly s inhibicí funkce, případně úplnou delecí těchto enzymů. Myši s knock-outovanou CBS jsou neplodné a vykazují alterace v estrálním cyklu. Patologické změny byly pozorovány také na tkáni jejich dělohy a na placentě u březích samic. V případě březosti pak bylo popsáno nízké procento přeživších embryí (Guzmán *et al.*, 2006). Myši s genetickou delecí enzymu CSE trpí hypertenzí v důsledku snížené schopnosti vazodilatace. Zároveň mají výrazně sníženou hladinu H_2S v krvi a především v tkáních srdce a aorty (Yang *et al.*, 2008).

Konkrétní signální dráhy a funkční mechanismy H_2S však zatím nebyly zcela objasněny a jsou předmětem výzkumu. Nicméně bylo zjištěno, že H_2S funguje prostřednictvím membránových receptorů a zejména iontových kanálů, čímž pomáhá modulovat funkci buněk a tkání. Jedná se o plyn, u kterého byla objevena schopnost zvyšovat prostupnost draslíkových kanálů, které jsou ve své funkci závislé na ATP. Zdá se, že H_2S může modifikovat funkci draslíkových membránových kanálů, které se otevírají při depolarizaci membrány v reakci na změnu koncentrace vnitrobuněčného Ca^{2+} . Přidání donoru H_2S k rakovinným buňkám během jejich kultivace vede k reverzibilnímu otevření těchto iontových kanálů bez ohledu na signalizaci vápníkem (Sitdikova *et al.*, 2010). H_2S dále prostřednictvím draslíkových pump v β -buňkách pankreatu inhibuje sekreci inzulínu nebo se podílí na imunitní reakci organismu, kde uplatňuje své protizánětlivé a anti-apoptotické účinky (Tang *et al.*, 2010). Ochranný vliv má zřejmě i na neurony a synaptické spoje mezi nimi (Abe *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2010).

Způsob, jakým H_2S ovlivňuje strukturu a funkci cílových proteinů, spočívá v jeho schopnosti měnit skupinu $-SH$ v cysteinovém zbytku bílkoviny na skupinu $-SSH$. Tento jev je nazýván S-sulfhydratace, která se zdá být důležitou post-translační modifikací proteinů, zapojenou do řady fyziologických dějů (Snyder *et al.*, 2009; Šmelcová *et al.*, 2011).

H_2S v buňkách S-sulfhydratuje množství proteinů. Je zajímavé, že mnoho proteinů, o kterých je známo, že podléhají S-nitrosylaci, zároveň mohou být S-sulfhydratovány. Zdá se, že S-sulfhydratace zvyšuje reaktivitu cysteinu, zatímco S-nitrosylace má spíše tlumící efekt (Snyder *et al.*, 2009). Wang (2012) pojednává o vzájemné funkční závislosti NO a H_2S , která spočívá v regulaci vnitrobuněčné hladiny cGMP. NO je schopen aktivovat rozpustnou guanylyl cyklázu (sGC – soluble Guanylyl Cyclase), která poté vytváří cGMP. Současně však H_2S inhibuje aktivitu fosfodiesterázy 5 (PDE5 – Phosphodiesterase 5), což má za následek zpomalení degradace již vytvořeného cGMP. H_2S a NO se tedy v tomto případě funkčně doplňují (Coletta *et al.*, 2012). Zvýšená hladina cGMP vede k aktivaci protein kinázy G

(PKG) a ta fosforylací svého cílového proteinu spouští vazodilataci. Kromě toho se H₂S podílí na aktivační fosforylací eNOS (Wang, 2012).

Pokud jde o vliv H₂S na reprodukci savců, bylo prokázáno, že je významně zapojen do řady fyziologických procesů jak v samčím, tak v samičím pohlavním traktu. U samců se podílí zejména na průběhu erekce penisu a funkci varlete. V případě samic pak participuje na folikulárním vývoji, růstu a zrání oocyty a udržení březosti (Zhu *et al.*, 2011; Šmelcová *et Tichovská*, 2011).

V samičím pohlavním traktu H₂S funguje jako relaxant hladkého svalstva. Tato jeho funkce je zprostředkována cAMP, NO/cGMP signalizací a K⁺_{ATP} kanály (Srilatha *et al.*, 2009). S podobnými závěry přišli také Patel *et al.* (2009), kteří reportují endogenní produkci sulfanu v děložní tkáni myši a potkanů, pravděpodobně způsobenou aktivitou enzymů CBS a CSE, kde H₂S uvolňuje děložní hladkou svalovinu. Zároveň zmiňují zvýšenou produkci H₂S ve fetálních obalech u potkana, pokud je přítomen NO. Zhou *et al.* (2013) pak uvádí, že vazodilatace hladké svaloviny dělohy zprostředkovaná H₂S je mimo jiné ovlivňována 17β-estradiolem, který se podílí na regulaci aktivity CSE.

CBS byla lokalizována také v ováriích, konkrétně ve folikulárních buňkách (kumulárních i murálních), a to ve všech stadiích vývoje folikulu. Nebyla však nalezena přímo v oocytech (Liang *et al.*, 2006), ačkoliv její aktivita, tedy produkce H₂S, je důležitá pro zrání oocyty. Pokud je tento enzym funkčně inhibován, oocyty nepokračují v meióze a zůstávají ve stadiu zárodečného váčku (Liang *et al.*, 2007). Naopak přidání donoru H₂S do kultivačního media příznivě ovlivňuje zrání oocytů *in vitro* u prasat. Pod vlivem účinných koncentrací H₂S dochází v oocytech ke zvýšení aktivity MPF v období rozpadu jaderné membrány (GVBD). Oocyty kultivované v mediu obohaceném o donor H₂S zrají rychleji ve srovnání s kontrolními skupinami. Kromě toho se H₂S podílí na regulaci kumulární expanze (Nevoral *et al.*, 2014). Dalším příznivým vlivem H₂S na oocyty je potlačování nepříznivých projevů apoptózy, což bylo prokázáno na prasečích oocytech vystavených prodloužené kultivaci oocytů *in vitro*. Současně H₂S zlepšuje vývojový potenciál takto kultivovaných oocytů (Krejčová *et al.*, 2015).

Úloha H₂S jako signální molekuly v oocytech dosud není zcela objasněna. V somatických buňkách má signalizace H₂S řadu zajímavých účinků, a proto lze předpokládat, že ani v případě oocytů tomu není jinak. Další výzkum H₂S jako gasotransmiteru je potřebný za účelem bližšího poznání mechanismu, kterým na oocyty působí.

4 Materiál a metodika

4.1 Získávání oocytů a jejich selekce

Oocyty byly aspirovány spolu s folikulární tekutinou z ovárií prepubertálních prasniček.

Ovária byla odebrána na jatkách z čerstvě poražených prasniček a uložena do termolahve s fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) o teplotě 39°C. Ihned po odebrání dostatečného množství ovárií byla termolahve transportována do kultivační laboratoře KVD.

Odsávání folikulární tekutiny bylo provedeno za sterilních podmínek pomocí jehly 20G. Pro získání nezralých, meioticky plně kompetentních, oocytů byly aspirovány folikuly o velikosti 2 – 5 mm, bez známek atreze nebo jiného poškození. Ze získané folikulární tekutiny byly pod binokulární lupou vybírány plně dorostlé oocyty s celistvou cytoplazmou, obklopené kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

4.2 Kultivace oocytů a příprava preparátů pro posouzení meiotického zrání

Vybrané oocyty byly kultivovány v 4-jamkových Petriho miskách v 1 ml modifikovaného kultivačního média M199 (Sigma-Aldrich, USA). Kultivační médium bylo modifikováno obohacením o NaHCO₃ (32,5 mM), HEPES (6,3 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamycin (0,025 mg/ml) a 5 % (v/v) fetálního bovinního séra (FBS; Sigma-Aldrich, USA). Krátce před použitím byly do kultivačního média přidány gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5:6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holland). U pokusné skupiny byl do kultivačního média přidán donor sulfanu (Na₂S) v koncentraci 35 – 300 μM. Pro kultivaci kontrolní skupiny bylo použito čisté modifikované médium M199. Kultivace probíhala při teplotě 39°C a 5% CO₂ po dobu 12 – 48 hod.

Po příslušné době kultivace byly oocyty skleněnou kapilárou zbaveny kumulárních buněk a s malým množstvím média přeneseny na podložní sklo. Krycí sklo bylo na preparát připevněno pomocí vazelíny a celý preparát byl umístěn na min. 24 hodin do fixačního roztoku (kyselina octová a ethanol v poměru 1:3). Po vyjmutí z fixačního roztoku byl chromatin oocytů obarven 1% roztokem orceinu.

4.3 Hodnocení stádií meiotického zrání oocytů

Po obarvení byly oocyty pozorovány pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem a na základě uspořádání chromatinu byly rozřazeny do jednotlivých kategorií:

- **GV** – stádium zárodečného váčku (germinal vesicle) – jaderná membrána je zachovalá a kolem jádérka lze pozorovat prstenec chromatinu. Jedná se o nezralý oocyt.

- **LD** – pozdní diakineze (late diakinesis) – došlo k rozpadu jaderné membrány a chromatin se shlukuje do drobného kompaktního útvaru. K tomuto jevu dochází většinou po 16 – 18 hodinách zrání.

- **MI** – metafáze I – po 24 hodinách zrání jsou volné chromozomy uspořádané v ekvatoriální rovině dělicího vřeténka.

- **AI/TI** – přechodové stádium mezi anafází I a telofází I – do této kategorie byly zahrnuty oocyty, u kterých byly pozorovány chromozomy rozdělující se na dvě skupiny a přibližující se k pólům dělicího vřeténka. K tomuto jevu dochází po 32 – 36 hodinách zrání.

- **MII** – metafáze II – zralý oocyt. Jedna skupina chromozomů se nyní nachází ve vyděleném pólovém tělísku a jedna v oocytu. Obě skupiny chromozomů zaujímají metafázní konfiguraci a oocyt se nachází ve druhém meiotickém bloku. Tato situace obvykle nastává po zhruba 44 hodinách zrání.

4.4 Statistické vyhodnocení získaných dat

Pro každý dílčí experiment bylo použito 40 oocytů a byla provedena 3 opakování každého pokusu. Výsledky jsou interpretovány jako průměr z těchto opakování \pm S.E.M. (standard error of the mean). Data získaná po provedení každého experimentu byla podrobena statistické analýze.

Statistické vyhodnocení dat pomocí ANOVA (t-test) bylo realizováno pomocí programu SAS 9.1. Za statisticky významný rozdíl mezi výsledky u porovnávaných skupin oocytů byla považována hodnota $P < 0,05$.

4.5 Experimentální design

4.5.1 Experiment č. 1

Vliv donoru sulfanu na zrání prasečích oocytů po 20 hodinách kultivace *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, kolik procent prasečích oocytů se bude nacházet v jednotlivých fázích meiotického zrání po 20 hodinách *in vitro* kultivace v médiu obsahujícím donor sulfanu Na₂S (0 μM; 35 μM; 70 μM; 150 μM; 300 μM).

Po uplynutí požadovaných 20 hodin kultivace byly oocyty výše popsáním způsobem připraveny k posouzení pod mikroskopem. Metodou pozorování struktury jádra bylo zjištěno, ve kterých fázích meiotického zrání se oocyty po kultivaci nacházely.

4.5.2 Experiment č. 2

Vliv donoru sulfanu na zrání prasečích oocytů po 30 hodinách kultivace *in vitro*

Cílem experimentu bylo zjistit, kolik procent prasečích oocytů se bude nacházet v jednotlivých fázích meiotického zrání po 30 hodinách *in vitro* kultivace v médiu obsahujícím donor sulfanu Na₂S (0 μM; 35 μM; 70 μM; 150 μM; 300 μM).

Po uplynutí stanovených 30 hodin kultivace byly oocyty výše popsáním způsobem připraveny k posouzení pod mikroskopem. Metodou pozorování struktury jádra bylo zjištěno, ve kterých fázích meiotického zrání se oocyty po kultivaci nacházely.

4.5.3 Experiment č. 3

Vliv donoru sulfanu (300 μM Na₂S) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách

Cílem experimentu bylo posoudit vliv 300 μM Na₂S na průběh jaderného zrání prasečích oocytů v průběhu *in vitro* kultivace pomocí časové řady (12 – 48 hod.).

Po příslušné době kultivace byly jednotlivé experimentální skupiny oocytů standardním způsobem připraveny k posouzení jaderné struktury pod mikroskopem. Metodou pozorování změn v jaderné struktuře bylo zjištěno, ve které fázi meiotického zrání se oocyty po kultivaci nacházely.

5 Výsledky

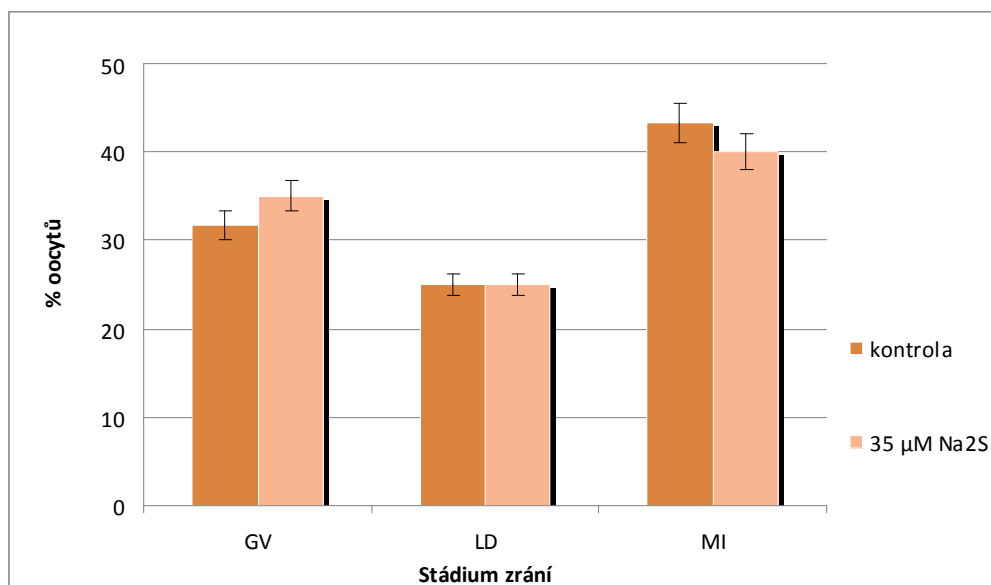
5.1 Experiment č. 1

Vliv donoru sulfanu na zrání prasečích oocytů po 20 hodinách kultivace *in vitro*

Cílem experimentu bylo ověřit hypotézu, že sulfan je zapojen do regulace meiotického zrání prasečích oocytů. Byl testován vliv různých koncentrací donoru sulfanu (Na_2S) na průběh meiotického zrání oocytů. V každém dílčím experimentu bylo použito 40 oocytů a byla provedena vždy 3 opakování.

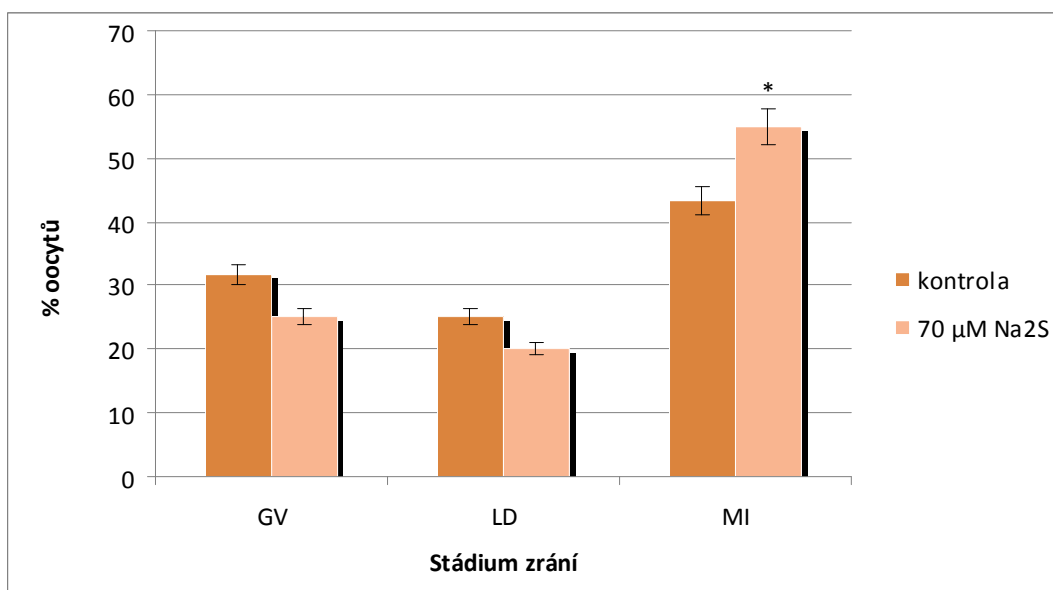
Kontrolní skupiny oocytů byly kultivovány v čistém modifikovaném mediu M199 bez přidaného Na_2S . Po 20 hod. kultivace se v těchto skupinách z celkového počtu 120 oocytů nacházelo 31,7 % oocytů ve stadiu GV, 25% ve stadiu LD a 43,3% ve stadiu MI. Nebyly nalezeny žádné oocyty v ostatních dvou hodnocených fázích zrání, tedy AI/TI a MII.

Po přidání $35 \mu\text{M}$ Na_2S do kultivačního média nebyly na poměrech mezi počty oocytů experimentální skupiny v jednotlivých fázích meiotického zrání pozorovány významné rozdíly oproti kontrolním skupinám. Procentuální podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích byl srovnatelný s kontrolou – GV 35%, LD 25% a MI 40%. Srovnání kontrolní a pokusné skupiny pro tuto koncentraci Na_2S znázorňuje Obrázek č. 3.



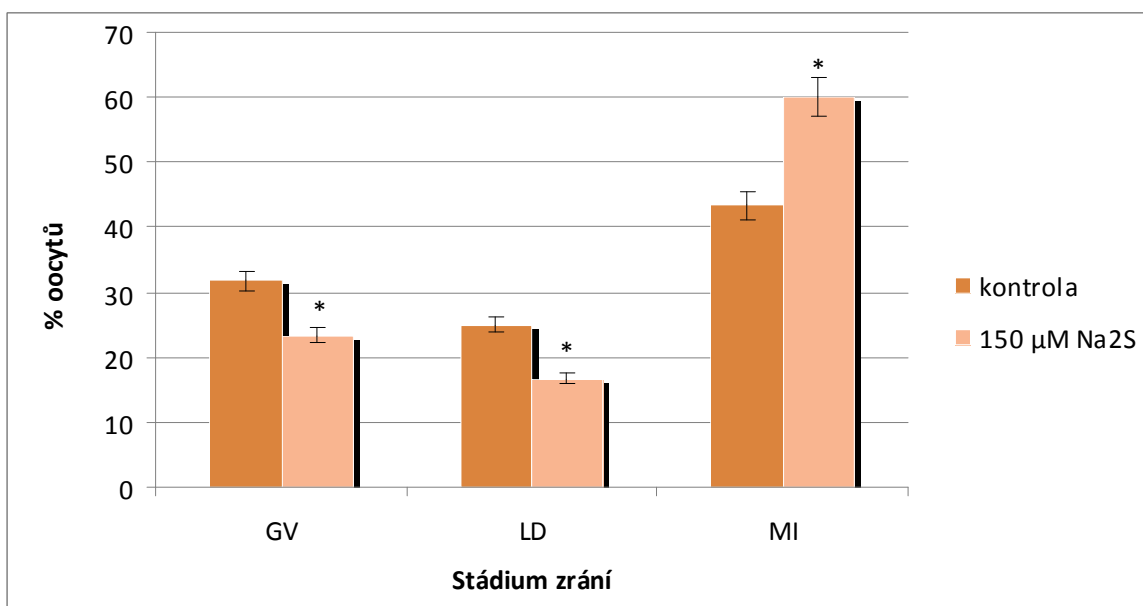
Obrázek č. 3 Podíl prasečích oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 20 hodinách kultivace *in vitro* v mediu s obsahem $35 \mu\text{M}$ Na_2S . GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku; LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze; MI – oocyt ve stádiu metafáze I.

Výraznější rozdíly byly pozorovány u koncentrace Na_2S 70 μM a vyšší. Oocyty vystavené koncentraci 70 μM Na_2S vykazovaly znatelný posun v dosažení stadia MI. Bylo zde zaznamenáno snížení podílu oocytů nacházejících se v GV (25%) a LD (20%). Ve stádiu MI se však po 20 hodinách kultivace nacházelo výrazně více oocytů (55%), a to nejen ve srovnání s ostatními stádii zrání v této experimentální skupině, ale především ve srovnání s výsledky předchozí experimentální skupiny i kontroly. Rozdíly jsou statisticky průkazné. Tyto výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 4.



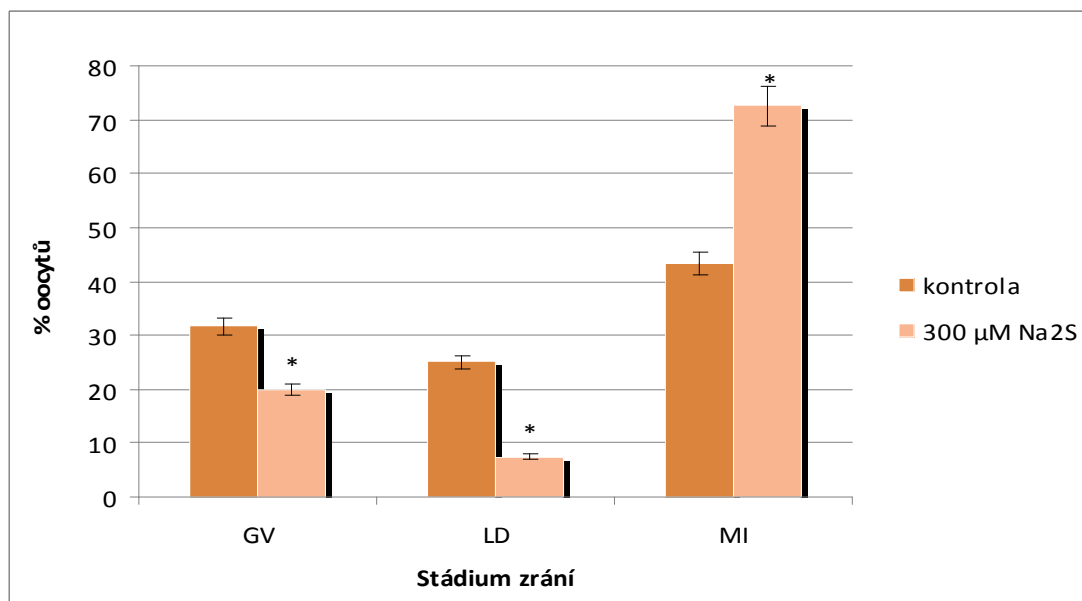
Obrázek č. 4 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 20 hodinách kultivace in vitro v mediu s obsahem 70 μM Na_2S . Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na_2S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku; LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze; MI – oocyt ve stádiu metafáze I.

Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých fází zrání byly zjištěny u experimentální skupiny oocytů vystavené působení kultivačního media s obsahem Na_2S o koncentraci 150 μM . Výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 5.



Obrázek č. 5 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 20 hodinách kultivace in vitro v mediu s obsahem 150 µM Na₂S. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku; LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze; MI – oocyt ve stádiu metafáze I.

Nejvyšší testovanou koncentrací Na₂S byla 300 µM. Experimentální skupiny oocytů vystavené takové koncentraci Na₂S v kultivačním mediu vykazovaly statisticky významné rozdíly v dosažených stádiích meiotického zrání oproti ostatním koncentracím i kontrolní skupině oocytů. Výrazně vyšší podíl oocytů se nacházel ve stadiu MI (72,5%), zatímco procentuální zastoupení ostatních dvou fází bylo naopak významně sníženo (GV – 20%, LD – 7,5%), jak je patrné z obrázku č. 6.



Obrázek č. 6 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 20 hodinách kultivace *in vitro* v mediu s obsahem 300 µM Na₂S. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku; LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze; MI – oocyt ve stádiu metafáze I.

Užitečným ukazatelem pro posouzení vlivu Na₂S na zrání oocytů je stanovení procenta oocytů, u kterých došlo GVBD po 20 hodinách kultivace pro každou koncentraci Na₂S. Tato data jsou shrnuta v tabulce č. 1. Z výsledků je patrné, že spolu se zvyšující se koncentrací Na₂S v kulturačním mediu roste i podíl oocytů, u kterých ve stejném čase došlo ke GVBD.

koncentrace Na ₂ S	% GVBD
0 µM	68,30±2.9 ^{b,c}
35µl	65,00±4.3 ^c
70µl	75,00±4.3 ^{a,b}
150µl	76,70±3.8 ^a
300µl	80,00±4.3 ^a

Tabulka č. 1 Stanovení procenta GVBD po 20 hodinách kultivace. Různé superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ($P < 0,05$).

5.2 Experiment č. 2

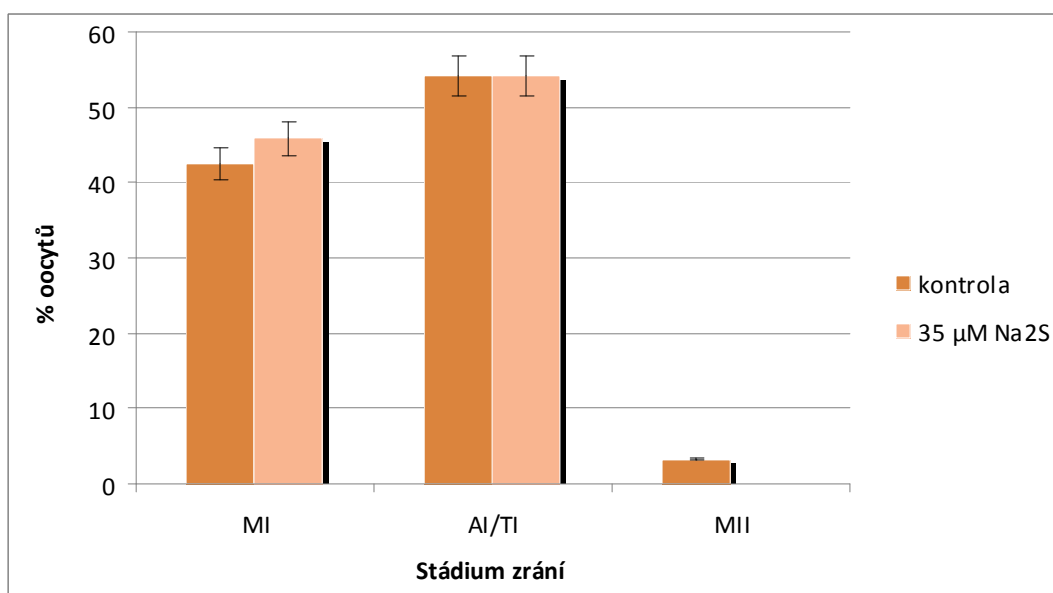
Vliv donoru sulfanu na zrání prasečích oocytů po 30 hodinách kultivace *in vitro*

Cílem experimentu bylo ověřit hypotézu, že sulfan je zapojen do regulace meiotického zrání prasečích oocytů. Byl testován vliv různých koncentrací donoru sulfanu (Na_2S) na průběh meiotického zrání oocytů. Pro testování každé koncentrace Na_2S bylo použito 40 oocytů a byla vždy provedena 3 opakování každého dílčího pokusu.

Hodnocení bylo vzhledem k času kultivace zaměřeno na pozdější stadia meiotického zrání. Statisticky byl posuzován procentuální podíl oocytů nacházejících se ve fázích MI, AI/TI a MII.

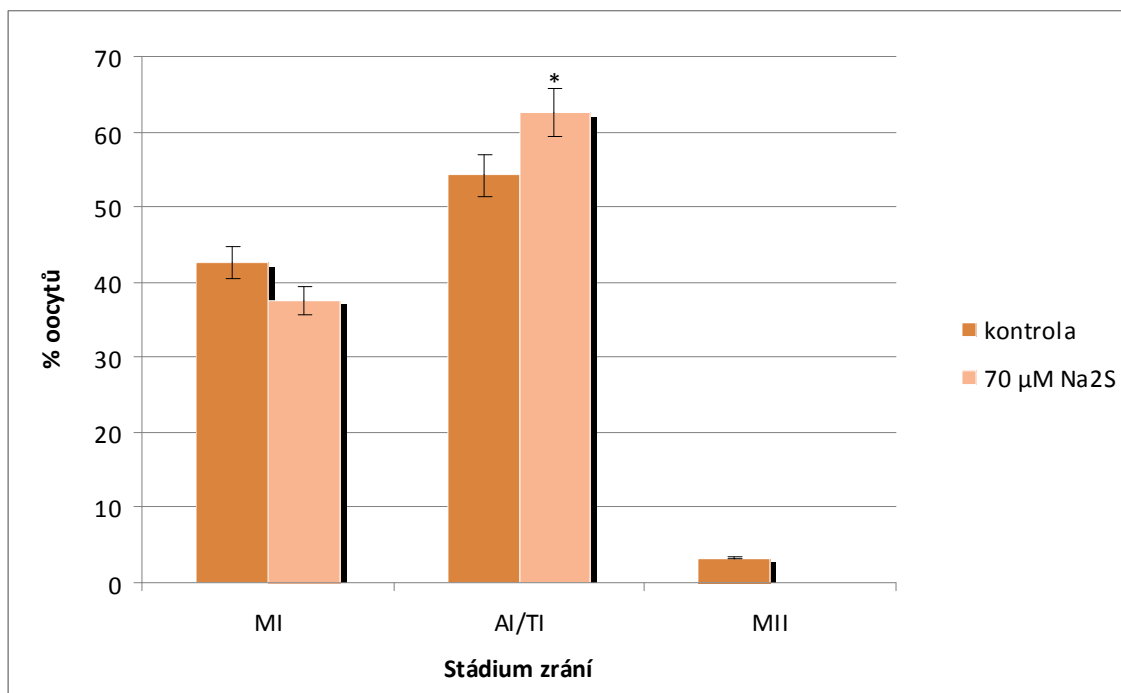
Kontrolní skupiny byly opět kultivovány v čistém modifikovaném kultivačním mediu M199 bez přidaného Na_2S . Po 30 hodinách kultivace se 42,5% z nich nacházelo ve stadiu MI, 54,2% ve stadiu AI/TI a 3,3% oocytů dosáhlo MII.

Nejnižší testovaná koncentrace Na_2S byla 35 μM . Nebyly pozorovány významné rozdíly po určené době kultivace mezi touto experimentální skupinou a kontrolou. Ve stadiu MI se nacházelo 45,8% oocytů, ve stadiu AI/TI bylo 54,2% oocytů, rozdíl není statisticky významný. Stadium MII nebylo v této experimentální skupině oocytů pozorováno vůbec. Tyto výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 7.



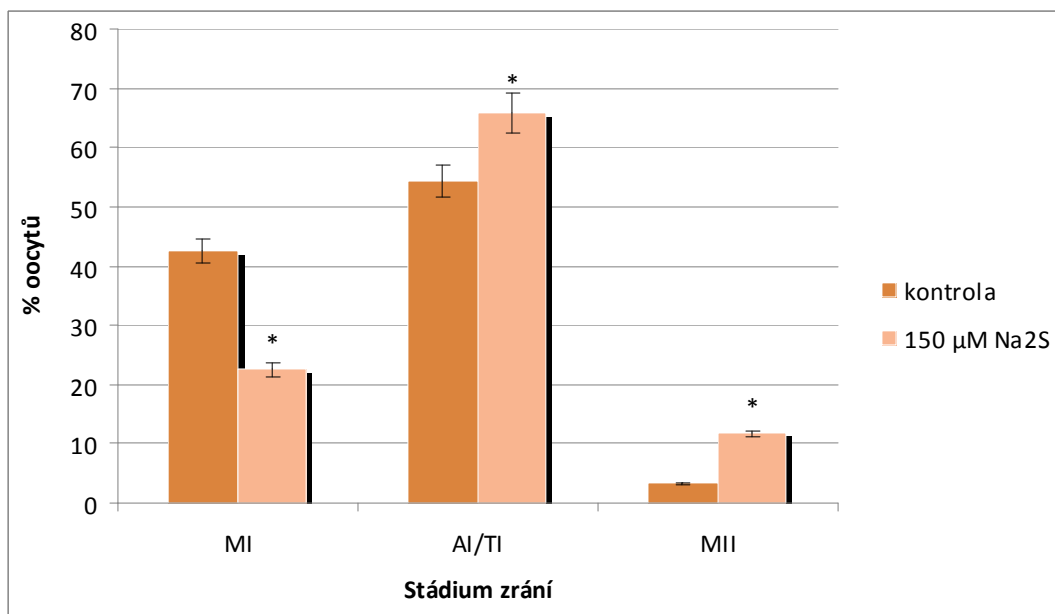
Obrázek č. 7 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 30 hodinách kultivace *in vitro* s obsahem 35 μM Na_2S . MI – oocyty ve stadiu metafáze I; AI/TI – oocyty ve stadiu přechodu z anafáze I do telofáze I; MII – oocyty ve stadiu metafáze II.

Po zvýšení koncentrace Na_2S v mediu na 0,07% došlo ke snížení počtu oocytů nacházejících se ve fázi MI (37,5%) a naopak u vyššího počtu oocytů byl pozorován přechod z anafáze I do telofáze I (AI/TI, 62,5%). Ani v této experimentální skupině se nenacházely oocyty, které by dosáhly MII. Výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 8.



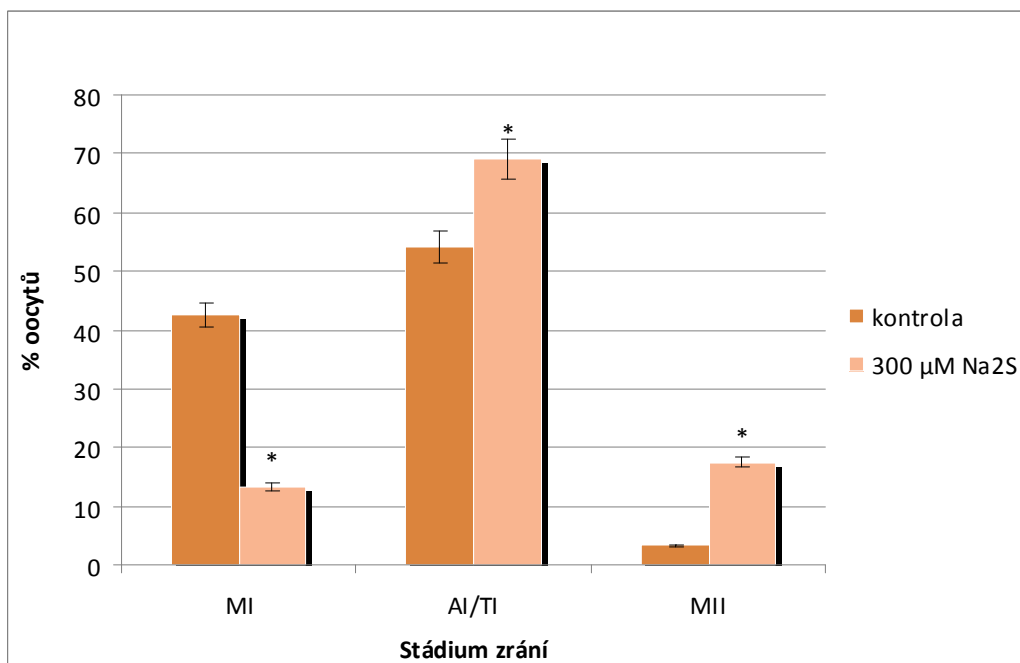
Obrázek č. 8 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 30 hodinách kultivace *in vitro* v mediu s obsahem 70 μM Na_2S . Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na_2S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). MI – oocyty ve stádiu metafáze I; AI/TI – oocyty ve stádiu přechodu z anafáze I do telofáze I; MII – oocyty ve stádiu metafáze II.

Při koncentraci 150 μM Na_2S v kultivačním mediu byly pozorovány významné rozdíly v procentuálním zastoupení oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání, a to ve srovnání jak kontrolou, tak i s předchozími experimentálními skupinami. Zatímco ve fázi MI se u této skupiny nacházelo pouze 22,5% oocytů, podíl oocytů v přechodovém stádiu AI/TI vzrostl na 65,8%. V této experimentální skupině již výrazný podíl oocytů dosáhl fáze MII (11,7%). Tyto výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 9.



Obrázek č. 9 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 30 hodinách kultivace *in vitro* v mediu s obsahem 150 µM Na₂S. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). MI – oocyty ve stádiu metafáze I; AI/II – oocyty ve stádiu přechodu z anafáze I do telofáze I; MII – oocyty ve stádiu metafáze II.

Nejvyšší testovanou koncentrací Na₂S v kultivačním mediu pak bylo 300 µM. Zde byl pozorován pokračující trend snížení počtu oocytů v MI a naopak zvýšení počtu oocytů v AI/II a MII. Byly patrné statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení těchto jednotlivých fází zrání mezi oocyty. Při použité koncentraci Na₂S v mediu se po 30 hodinách kultivace nacházelo ve fázi MI již pouze 13,3% oocytů, zatímco AI/II bylo pozorováno u 69,2% oocytů této experimentální skupiny. Statisticky významný nárůst oproti předchozím skupinám pak byl zaznamenán také u počtu zralých oocytů, tedy těch, které dosáhly stadia MII (17,5%). Grafické znázornění těchto výsledků poskytuje obrázek č. 10.



Obrázek č. 10 Podíl oocytů nacházejících se v jednotlivých stádiích meiotického zrání po 30 hodinách kultivace *in vitro* v mediu s obsahem 300 µM Na₂S. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S v každém stádiu meiotického zrání ($P < 0,05$). MI – oocyty ve stádiu metafáze I; AI/TI – oocyty ve stádiu přechodu z anafáze I do telofáze I; MII – oocyty ve stádiu metafáze II.

K posouzení vlivu jednotlivých koncentrací Na₂S na oocyty po 30 hodinách kultivace byl vytvořen přehled, ve kterém je stanoveno procento oocytů, které se po skončení kultivace nacházely v přechodu z meiózy I do meiózy II. Tyto výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 2. Z výsledků je patrné, že spolu se zvyšující se koncentrací Na₂S v kultivačním mediu roste i podíl oocytů, které se po dané době kultivace nacházely v přechodové fázi mezi meiózou I a meiózou II.

koncentrace Na ₂ S	% přechodu z meiózy I do meiózy II
0 µM	57,50±4.3 ^b
35µl	54,20±3.8 ^b
70µl	62,50±4.3 ^b
150µl	77,50±5.0 ^a
300µl	86,70±3.8 ^a

Tabulka č. 2 Stanovení procenta oocytů v přechodu z meiózy I do meiózy II po 30 hodinách kultivace. Různé superskripty označují statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ($P < 0,05$).

5.3 Experiment č. 3

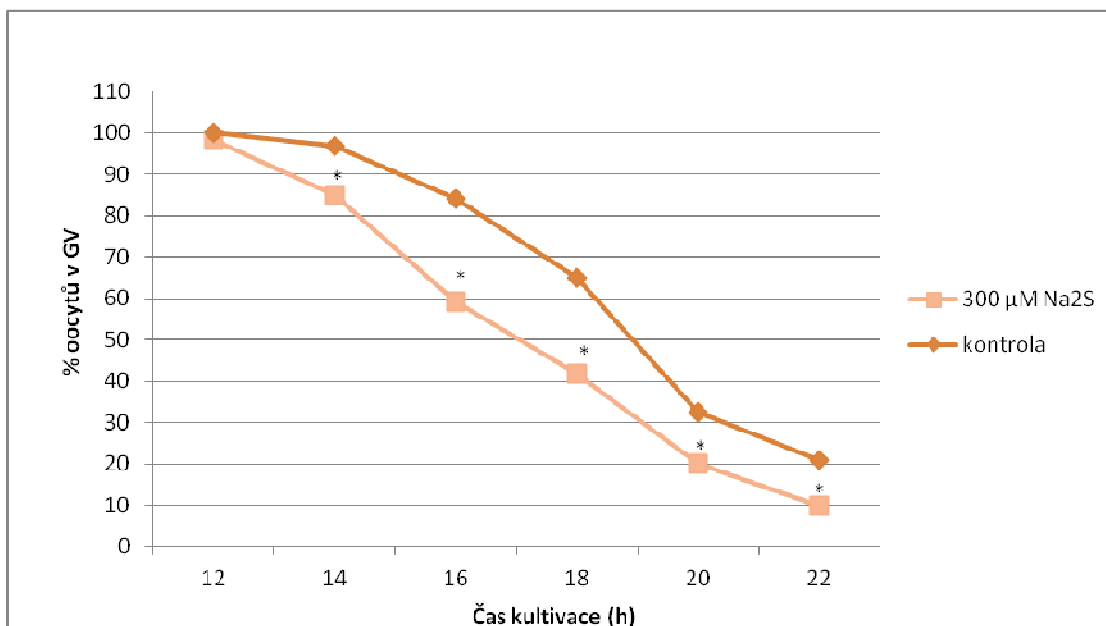
Vliv donoru sulfanu (300 μM Na_2S) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách

Cílem tohoto experimentu bylo objasnit vliv 300 μM Na_2S v kultivačním mediu na průběh meiotického zrání oocytů. Pro zmapování průběhu a načasování jednotlivých změn konformace chromatinu oocytů během kultivace v takto obohaceném mediu byla vytvořena experimentální časová řada. Ta zahrnovala provedení 19 dílčích pokusů, které představovaly kultivaci stejně početných skupin oocytů po různě dlouhou dobu. Nejkratší doba kultivace představovala 12 hodin a nejdelší 48 hodin, přičemž celá škála byla odstupňována po dvou hodinách. Ke každé experimentální skupině oocytů náležela jedna skupina kontrolní (kultivace v čistém mediu) a obě čítaly 40 oocytů. Pro získání dostatečného množství dat a zachování objektivitu experimentu byla u každého dílčího pokusu provedena 3 opakování.

Po 12 hodinách kultivace se všechny oocyty kontrolní skupiny nacházely ve stadiu GV. V experimentální skupině, která byla kultivována v obohaceném mediu, již však bylo pozorováno 1,7% oocytů ve stadiu LD. Tento rozdíl ovšem není statisticky významný.

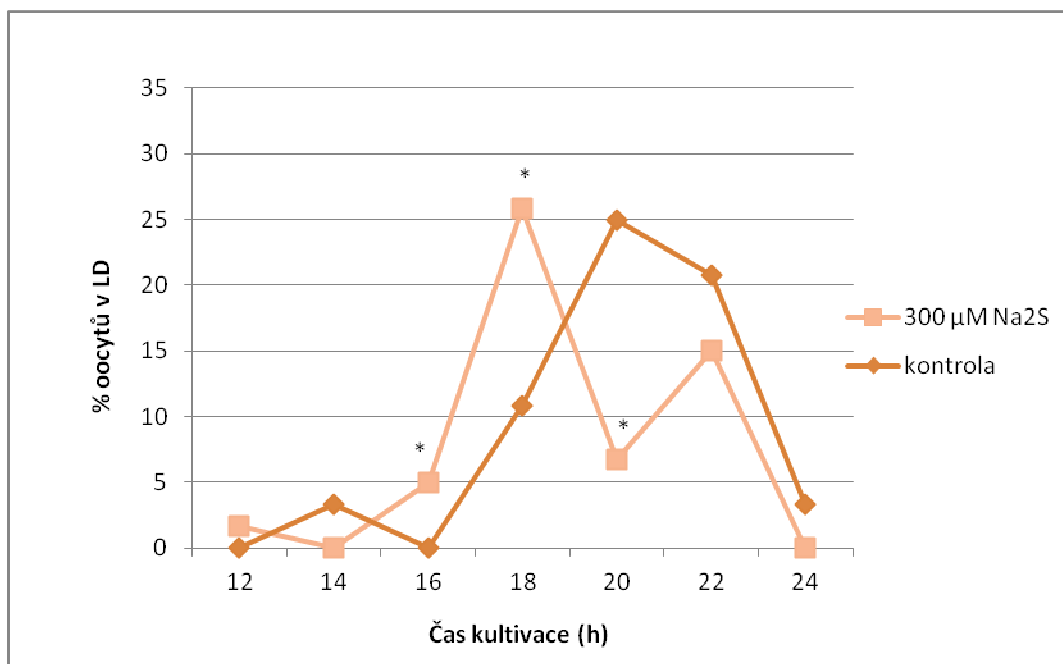
Po 14 hodinách kultivace se již i v kontrolní skupině objevily oocyty ve stadiu LD (3,3%), ale zatím žádné ve stadiu MI. Naproti tomu v experimentální skupině bylo pozorováno 15% oocytů, které dosáhly MI, ale nebyly nalezeny žádné oocyty ve fázi LD. Většina oocytů experimentální i kontrolní skupiny oocytů se stále nacházela ve stadiu GV.

Výskyt oocytů, které byly klasifikovány jako GV, se postupně snižoval s prodlužující se dobou kultivace. V experimentální skupině oocytů docházelo k tomuto snižování procentuálního podílu GV rychleji než u kontrolní skupiny, přičemž tyto rozdíly byly vyhodnoceny jako statisticky významné (viz obrázek č. 11). Posledním časem kultivace, ve kterém bylo ještě možné pozorovat oocyty v tomto stadiu meiotického zrání, byl čas 22 hodin. Později již žádné GV oocyty nalezeny nebyly.



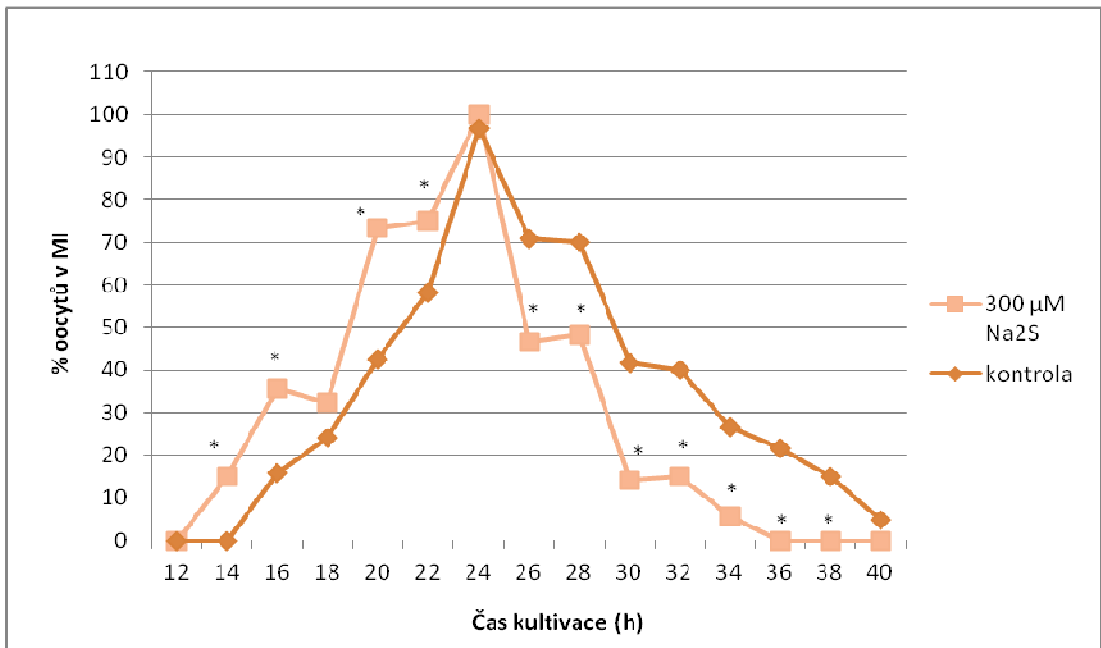
Obrázek č. 11 Procentuální zastoupení GV oocytů v závislosti na délce kultivace in vitro. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S ($P < 0,05$).

Podíl oocytů ve stádiu LD v průběhu kultivace kolísá. Rozdíly v počtech LD oocytů byly pro některé časy kultivace pozorovány i mezi kontrolní a experimentální skupinou oocytů. Po 16 hodinách kultivace bylo v experimentální skupině jako LD klasifikováno 5% oocytů, přičemž v kontrolní skupině se v této fázi žádné oocyty nenacházely. Poměrně vysoký podíl oocytů v LD pak byl pozorován po 18-ti hodinách kultivace, a to jak v kontrolní (10,8%), tak v experimentální (25,8%) skupině. Po 20-ti hodinové kultivaci však došlo k výraznému snížení podílu LD oocytů v experimentální skupině (6,7%), zatímco v té kontrolní bylo procento výskytu těchto oocytů relativně vysoké (25%). Oocyty ve stádiu LD bylo možné pozorovat v kontrolní skupině až do času kultivace 24 hodin, kdy v experimentální skupině již nebyly nalezeny žádné LD oocyty (viz obrázek č. 12).



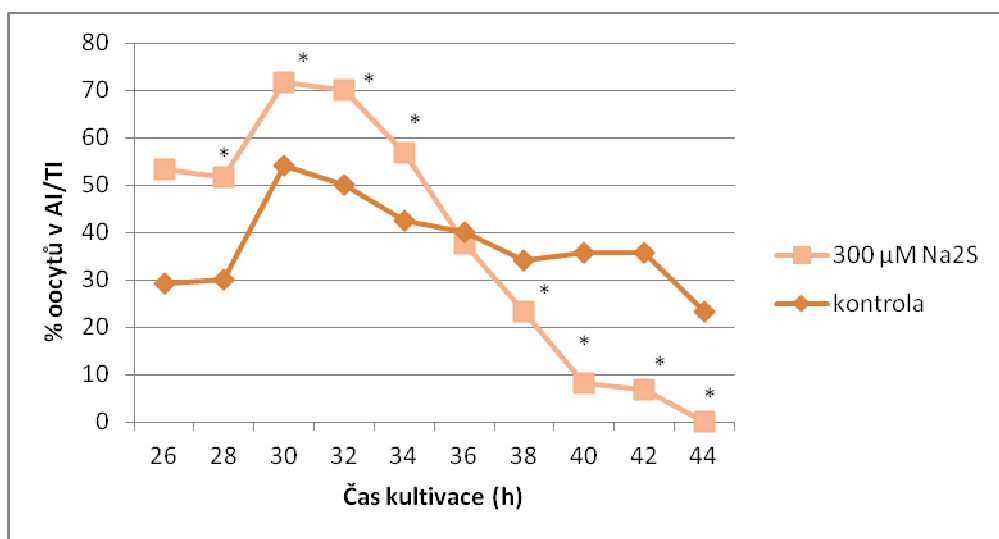
Obrázek č. 12 Procentuální zastoupení LD oocytů v závislosti na délce kultivace in vitro. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S ($P < 0,05$).

Počet oocytů experimentální skupiny nacházejících se ve stadiu MI se po uplynutí 16-ti hodin kultivace více než zdvojnásobil oproti 14-ti hodinové kultivaci (z 15% na 35,8%). K dalšímu výraznému zvýšení procenta oocytů v MI došlo po 20 hodinách kultivace. Růstový trend procentuálního zastoupení MI oocytů dále pokračoval až do času kultivace 24 hodin, kdy se celá experimentální skupina skládala pouze z oocytů nacházejících se v této fázi meiotického zrání (viz obrázek č. 13). Většina rozdílů mezi hodnotami experimentální a kontrolní skupiny oocytů byla i v tomto případě vyhodnocena jako statisticky významná.



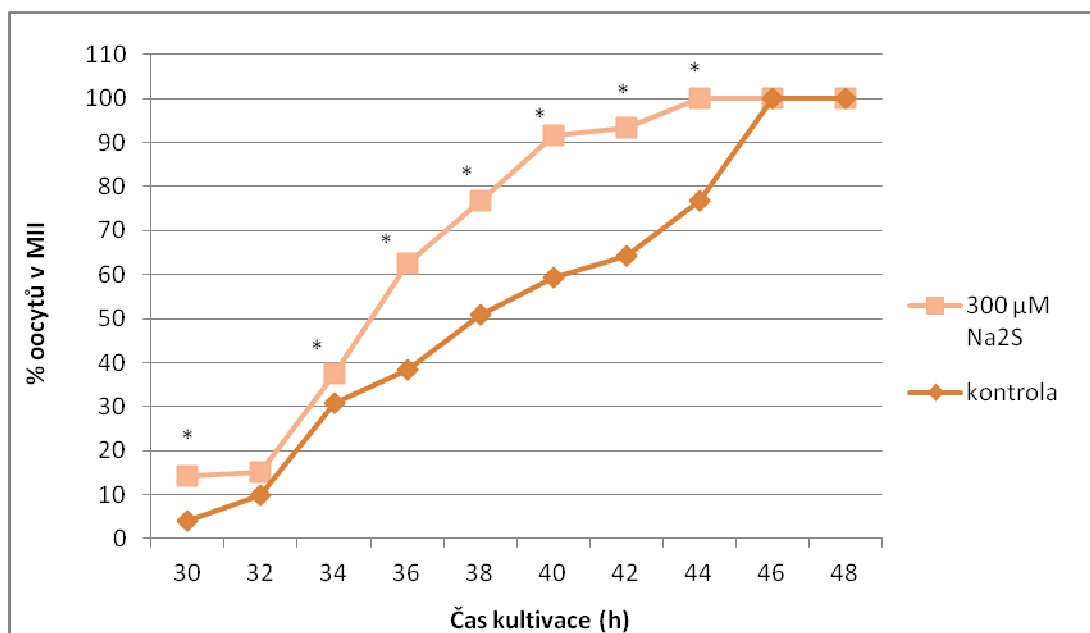
Obrázek č. 13 Procentuální zastoupení MI oocytů v závislosti na délce kultivace in vitro. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S ($P < 0,05$).

První oocyty ve stádiu AI/TI byly pozorovány po 26-ti hodinách kultivace, a to jak v pokusné, tak v kontrolní skupině. Po 30 hodinách kultivace oocytů ve fázi AI/TI statisticky významně přibývalo, ale od času kultivace 34 hodin začalo jejich procento v experimentální skupině postupně klesat. Poslední oocyty ve fázi AI/TI byly v experimentální skupině pozorovány po uplynutí 42 hodin kultivace, zatímco v případě kontrolní skupiny byly přítomny ještě po 44 hodinách. Podrobně výsledky znázorňuje obrázek č. 14.



Obrázek č. 14 Procentuální zastoupení AI/TI oocytů v závislosti na délce kultivace in vitro. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S ($P < 0,05$).

Po 30 hodinách kultivace již bylo možné pozorovat vedle MI a AI/TI oocytů také první zralé oocyty ve stádiu MII. Počet oocytů, které dosáhly stádia MII, byl v experimentální skupině výrazně vyšší (14,2%) než u kontroly (4,2%). Podobné hodnoty pak vykazovaly i výsledky 32 h kultivace. K významnému zvýšení procenta oocytů v MII fázi došlo po kultivaci po dobu 34 hodin, a to jak v experimentální skupině (37,5%), tak u kontroly (30,8%). Počet oocytů zastavených v MII poté postupně rostl s prodlužující se dobou kultivace. Po uplynutí 44 hodin kultivace se již celá experimentální skupina skládala pouze z oocytů zastavených v MII. V kontrolní skupině se však po takto dlouhé kultivaci ještě 23,3% oocytů nacházelo v přechodovém stádiu AI/TI. 100% MII oocytů bylo u kontroly dosaženo až po kultivaci trvající 46 hodin. Tyto výsledky jsou shrnuty v obrázku č. 15.

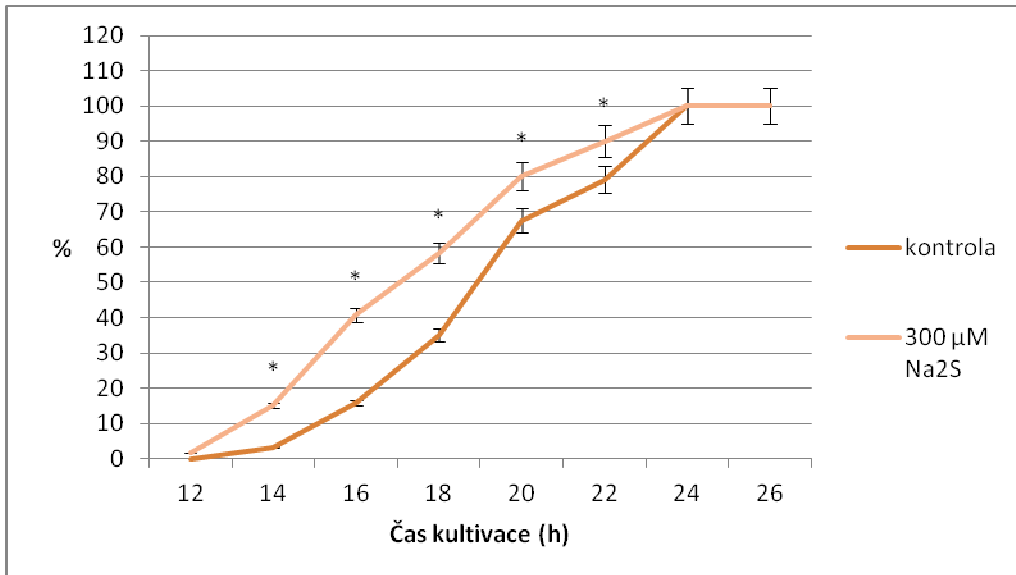


Obrázek č. 15 Procentuální zastoupení MII oocytů v závislosti na délce kultivace in vitro. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů kultivovaných s Na₂S ($P < 0,05$).

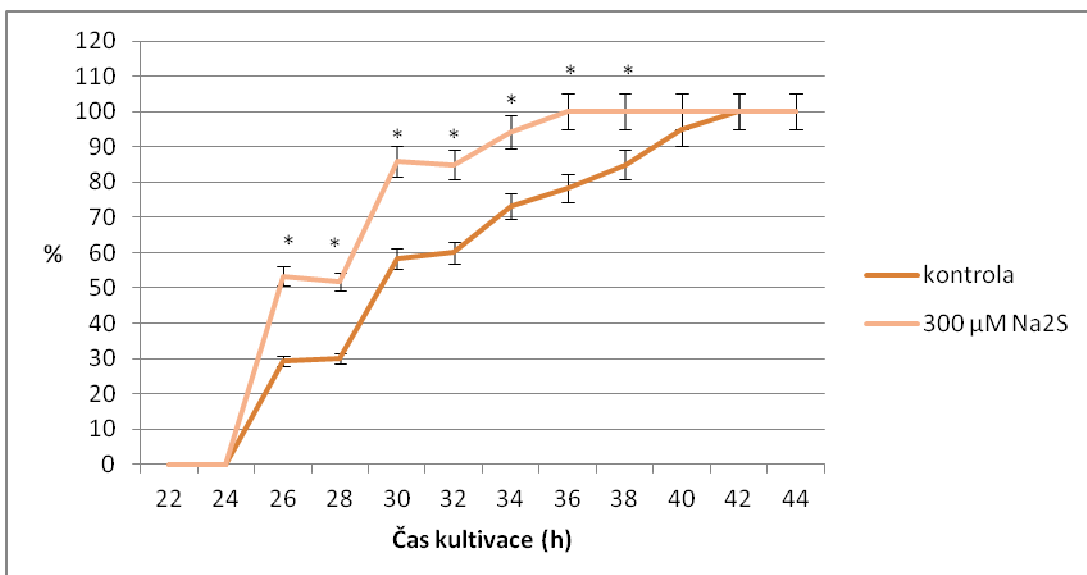
Níže situované obrázky 16 a 17 vyjadřují podíl oocytů po GVBD a v přechodu z meiózy I do meiózy II v závislosti na době kultivace a složení média, což jsou ukazatele, které umožňují přehledným způsobem posoudit míru zrychlení zrání po přidání Na₂S do kultivačního média.

Obrázek 16 porovnává kontrolní a experimentální skupinu z hlediska procentuálního zastoupení oocytů, u nichž došlo ke GVBD, v závislosti na době kultivace. Obrázek 17 pak obdobně porovnává experimentální a kontrolní skupinu z hlediska podílu oocytů nacházejících se v přechodu z meiózy I do meiózy II.

Z obou těchto obrázků a prezentovaných výsledků je patrné, že donor sulfanu Na_2S u prasečích oocytů statisticky významně urychluje proces meiotického zrání.



Obrázek 16 Stanovení procenta oocytů, u kterých došlo ke GVBD v závislosti na době kultivace. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami kontrolní a experimentální skupiny ($P < 0,05$).



Obrázek 17 Stanovení procenta oocytů v přechodu z MI do MII v závislosti na době kultivace. Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami kontrolní a experimentální skupiny ($P < 0,05$).

6 Diskuse

Sulfan (H_2S) endogenního původu vzniká v buňkách mnoha tkání a plní zde funkci signální molekuly, jako takzvaný gasotransmitter (Gadalla *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že H_2S má řadu fyziologických účinků na různé somatické buňky (Sitdikova *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Proto bylo možné předpokládat, že tomu tak bude i v případě oocytů. Množství Na_2S přidaného do kultivačního media v prezentovaných experimentech bylo zvoleno tak, aby odpovídalo koncentracím H_2S přirozeně se vyskytujícím v buňkách *in vivo* (Wang, 2002; Shibuya *et al.*, 2009). Z výsledků experimentů č. 1 a 2 vyplývá, že nejúčinnější testovanou koncentrací Na_2S v kultivačním mediu je $300 \mu M$ a tato koncentrace byla zvolena pro experiment č. 3.

Prasečí oocyty v podmínkách *in vitro* podstupují GVBD 16 – 24 hodin po stimulaci zrání (Motlík *et al.*, 1976; Ocampo *et al.*, 1991). Výsledky hodnocení zrání kontrolních skupin oocytů, uvedené v této práci, těmto údajům odpovídají. U oocytů zrajících v obohaceném mediu bylo GVBD a postup k dalším stádiím meiotického zrání statisticky významně urychlen, ale zjištěné hodnoty i u těchto oocytů korespondovaly se zmíněným časovým rozmezím.

Stádia MI dosahuje většina prasečích oocytů podle Sato *et al.* (1987) mezi 14. a 27. hodinou kultivace *in vitro*. Ocampo *et al.* (1991) pak uvádí rozmezí 26 až 30 hodin kultivace. Naše výsledky hodnocení kontrolních skupin oocytů v experimentu č. 3 ukazují výskyt prvních MI oocytů po 16 hodinách kultivace, zatímco experimentální skupiny obsahovaly oocyty ve stádiu MI již po 14 hodinách. Stádia MI oocyty dosahovaly po 24 hodinách kultivace (kontrolní skupina 96,7%, skupina Na_2S 100%, rozdíl není statisticky významný).

V anafázi I a telofázi I se prasečí oocyty podle Sato *et al.* (1987) nacházejí mezi 21 – 30 hodinami kultivace, podle Ocampo *et al.* (1991) mezi 31 – 34 hodinami. Výsledky získané v rámci této diplomové práce u kontrolních skupin oocytů odpovídají těmto údajům v tom smyslu, že v rámci experimentu č. 1 nebyly nalezeny žádné AI/TI oocyty po 20 hodinách kultivace ani po přidání Na_2S do kultivačního media, zatímco v rámci experimentu č. 2 po 30 hodinách již bylo možné oocyty v tomto stádiu pozorovat. V rámci experimentu č. 3 pak bylo zjištěno, že oocyty v kontrolní i experimentální skupině dosáhly tohoto stádia poprvé po 26

hodinách kultivace, ale v případě experimentální skupiny jich byl statisticky významně vyšší počet (29,2 % v kontrolní skupině a 53,3% v pokusné skupině ošetřené Na₂S). Tento rozdíl mezi oběma skupinami oocytů zůstal zachován až do času kultivace 36 hodin, kdy naopak vyšší procento AI/TI oocytů obsahovala kontrolní skupina, protože oocyty v experimentální skupině již tou dobou přecházely do stádia MII.

Jako dobu potřebnou pro získání oocytů ve stádiu MII v *in vitro* podmínkách uvádí Ocampo *et al.* (1991) časové rozmezí 34 – 48 hodin. Tyto údaje se liší od studie Sato *et al.* (1987), kde bylo nejvíce oocytů v této fázi zrání pozorováno mezi 30. a 45. hodinou kultivace. Tyto údaje korespondují s výsledky pozorování v rámci experimentu č. 3 diplomové práce (30 – 44 hodin). Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení MII oocytů mezi kontrolní a experimentální skupinou naznačují, že po přidání 300 μM Na₂S do kultivačního media vstupují prasečí oocyty do metafáze II signifikantně dříve a ve větším počtu. Z uvedeného je patrné, že zvýšení hladiny H₂S prostřednictvím donoru Na₂S ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro* a urychluje jeho průběh.

Pro navození maximálního efektu je důležité zvolit účinnou koncentraci Na₂S. Z výsledků experimentů 1 a 2 vyplývá, že přidání 35 μM Na₂S do média nemělo statisticky významný vliv na počet oocytů v jednotlivých fázích zrání po určené době kultivace. Poměry se začaly výrazněji posouvat až od koncentrace 70 μM Na₂S. Napříč všemi uvedenými experimenty pak lze opodstatněně tvrdit, že zvýšení hladiny H₂S v rámci fyziologického rozpětí působí na prasečí oocyty stimulačně. Důvodem pro toto tvrzení je fakt, že oocyty kultivované s donorem H₂S prošly celým procesem meiotického zrání řádově o hodiny rychleji než kontrolní skupina oocytů, a to bez zjevného negativního dopadu na jejich kvalitu či morfologii.

Zdá se, že podobně jako NO, jehož úloha je při zrání oocytů nezastupitelná (Jablonka-Shariff *et Olson* 1998, 2000), je i H₂S pro správný průběh tohoto děje důležitým faktorem. Kromě urychlení celého procesu je zřejmě zapojen i přímo do regulace meiózy, protože inhibice jeho syntázy lokalizované ve folikulárních buňkách má za následek udržení oocytů ve stádiu GV (Liang *et al.*, 2006, 2007). Protektivní úlohu H₂S ve vývoji oocytu naznačují i výsledky studie zaměřené na objasnění jeho funkce v procesu stárnutí oocytů (Krejčová *et al.*, 2015).

Urychlení zrání oocytů prostřednictvím zvýšení hladiny H₂S může být způsobeno časnější aktivací regulačních faktorů zrání, jako je MPF a MAPK (Nevoral *et al.*, 2014). H₂S působí na řadu proteinů prostřednictvím S-sulhydratace, která spočívá v záměně skupiny -SH

proteinu za –SSH a způsobuje posttranslační změny modifikující funkci proteinů (Snyder *et al.*, 2009). Tyto změny postihují také faktory s kinázovou aktivitou, kam patří i specifická MAP kinázy kináza, MEK. Zhao *et al.* (2014) uvádějí, že S-sulhydratace MEK-1 na cysteinu 341 vede k aktivaci polymerázy, která zprostředkovává opravu DNA (Cohen-Armon, 2007) a brání tak stárnutí buněk (PARP-1 - poly ADP-ribose polymeráza 1). S-sulhydratovaná MEK-1 umožňuje přesun ERK1/2 do jádra, kde tato přímo aktivuje PARP-1. Tento mechanismus může být vysvětlením pro akceleraci průběhu zrání oocytů, kdy dochází k dřívějšímu nástupu aktivity MAPK a následně MPF. Stejně tak lze signální kaskádou MEK-ERK1/2-PARP-1 vysvětlit možný protektivní účinek sulfanu, který příznivě ovlivňuje vývojovou kompetenci oocytů dozrálých v přítomnosti Na₂S (Nevoral *et al.*, 2014; Krejčová *et al.*, 2015).

Dalším příkladem řízení zrání oocytů gasotransmitterem H₂S může být jeho vliv na hladiny cAMP. Bylo zjištěno, že donory sulfanu včetně Na₂S mohou v závislosti na koncentraci zvyšovat hladinu vnitrobuněčného cAMP (Njie-Mbye, *et al.*, 2012). To by u oocytů znamenalo schopnost ovlivňovat průběh zrání prostřednictvím udržení meiotického bloku. cAMP reguluje aktivitu cAMP-dependentní protein kinázy (PKA). PKA se podílí na udržení nízké aktivity MPF inaktivací CDC25 fosfatázy, která je potřebná pro aktivaci katalytické podjednotky MPF, CDK1. Při poklesu hladiny cAMP dochází ke zvýšení aktivity MPF a následně k zahájení meiotického zrání oocytu (Conti *et al.*, 2012).

Kromě toho může H₂S ovlivňovat funkci iontových kanálů buněk, což souvisí s hladinou intracelulárního vápníku, jehož uvolněním z endoplazmatického retikula je provázána fertilizace oocytu. Sitdikova *et al.* (2010) uvádějí, že H₂S způsobuje v závislosti na jeho koncentraci reverzibilní otevření velkých membránových draslíkových kanálů, jejichž funkce je řízena součinně změnou elektrického potenciálu a vnitrobuněčnou koncentrací Ca²⁺. V další studii (Sitdikova *et al.*, 2014) pak uvádějí, že míra vlivu na tyto iontové kanály závisí na míře fosforylace proteinů kanálu, což souvisí s konformací daného proteinu. Tím, že H₂S způsobuje otevření těchto iontových kanálů bez ohledu na hladinu Ca²⁺, by mohl být ovlivněn proces meiotického zrání v oocytu, kde Ca²⁺ funguje jako důležitá signální molekula zapojená do řady funkčních kaskád zahrnujících i degradaci cyklinu B jako regulační podjednotky MPF (Ito *et Kashiwazaki*, 2012).

Provedené experimenty prokázaly, že zvýšení hladiny sulfanu prostřednictvím donoru Na₂S ovlivňuje průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*, kdy došlo k jeho urychlení, vyjádřeného dosažením jednotlivých stádií meiotického zrání.

Ačkoliv ještě nebyly plně objasněny všechny aspekty buněčné signalizace H₂S, je zřejmé, že se jedná o významnou a z hlediska dalšího výzkumu velmi zajímavou signální molekulu. I přes omezené znalosti konkrétních signalizačních mechanismů H₂S lze vlastností této molekuly využít ke zlepšení výsledků některých biotechnologických metod. Jeho schopnost urychlovat proces meiotického zrání, která byla prokázána experimenty uvedenými v této práci, má spolu s výsledky jiných studií potenciální využití při optimalizaci postupů asistované reprodukce.

7 Závěr

Experimenty prezentovanými v této diplomové práci se podařilo ověřit hypotézu, že sulfan je zapojen do regulace meiotického zrání prasečích oocytů. Z výsledků této práce vyplývá, že vhodné koncentrace použitého donoru sulfanu (Na_2S) v kultivačním mediu urychlují proces zrání oocytů *in vitro* oproti kultivaci v čistém mediu. To se projevuje dřívějším vstupem oocytů experimentálních skupin do jednotlivých fází zrání a kratší dobou trvání těchto fází.

Sulfan, jako třetí popsaný gasotransmitter, je v současné době předmětem výzkumu v biologických a lékařských oborech za účelem objasnění jeho úlohy v živočišných buňkách. Jedná se o molekulu, která je funkčně zapojena do množství signálních drah na buněčné úrovni a může tak ovlivňovat širokou škálu fyziologických procesů v rámci celého organismu.

V současné době je k dispozici jen omezené množství informací o působení sulfanu na různé aspekty reprodukce zvířat i člověka. Vzhledem k narůstající potřebě inovace a optimalizace metod reprodukčních biotechnologií je nyní této oblasti výzkumu věnována značná pozornost.

Tato zjištění mohou být využita ve snaze optimalizovat biotechnologické postupy při práci se savčími oocyty a zvýšit efektivitu metod asistované reprodukce. Je však nezbytné provést další experimenty, které by pomohly popsat a vysvětlit konkrétní buněčné regulační mechanismy, kterých se sulfan jako signální molekula účastní. Další experimenty jsou nezbytné pro ověření protektivní a signální úlohy sulfanu v průběhu časného embryonálního vývoje.

8 Seznam použité literatury

Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator.

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

Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of the protein kinase inhibitor 6-dimethyl aminopurine. *Reproduction in domestic animals*. 36(3-4). 139-145.

Adhikari, D., Liu, K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*. 30 (5). 438-464.

Adhikari, D., Liu, K. 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 382(1). 480-487.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell: Fifth Edition*. New York: Garland Science. ISBN: 998-0-8153-4105-5. 1601 s.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 357(Pt3). 593-615.

Allen, E. 1923. Ovogenesis during sexual maturity. *American Journal of Anatomy*. 31. 439-581.

Anderson, L., Hillier, S. G., Eidne, K. A., Miro, F. 1996. GnRH-induced calcium mobilisation and inositol phosphate production in immature and mature rat ovarian granulosa cells. *The Journal of endocrinology*. 149(3). 449-556.

Baker, T. G., Franchi, L. L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *Journal of Cell Science*. 2(2). 213-224.

Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, M. L., de Rooij, D. G., Page, D. C. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics*. 38(12). 1430 – 1434.

Bergandi, L., Basso, G., Evangelista, F., Canosa, S., Dalmaso, P., Aldieri, E., Revelli, A., Benedetto, C., Ghigo, D. 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.

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

Bleil, J. D., Wassarman, P. M. 1980. Synthesis of *zona pellucida* proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77(2). 1029-1033.

Boja, E. S., Hoodbhoy, T., Fales, H. M., Dean, J. 2003. Structural characterization of native mouse *zona pellucida* proteins using mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry*. 278(36). 34189-34202.

Borum, K. 1961. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental Cell Research*. 24. 495-507.

Braw-Tal, R., Yossefi, S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109 (1). 165-171.

Brown, S. D., Piantadosi, C. A. 1990. *In vivo* binding of carbon monoxide to cytochrome c oxidase in rat brain. *Journal of applied physiology*. 68(2). 604-610.

Bukovsky, A., Caudle, M.R., Keenan, J.A., Wimalasena, J., Foster, J.S., Van Meter, S.E., 1995. Quantitative evaluation of the cell cycle-related retinoblastoma protein and localization of Thy-1 differentiation protein macrophages during follicular development and atresia, and in human corpora lutea. *Biol. Reprod*. 52. 776–792.

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 hte gene for heme oxygenase-2. *Nature Medicine*. 4(1). 84-87.

Byskov, A. G. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological reviews*. 66(1). 71-117.

Cahill, L. P., Mauleon. 1981. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 61. 201-206.

Calarco, P. G., Donahue, R. P., Szöllösi, D. 1972. Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *Journal of Cell Science*. 10(2). 369-385.

Cella, M., Farina, M. G., Keller Sarmiento, M. I., Chianelli, M., Rosenstein, R. E., Franchi, A. M. 2006. Heme oxygenase-carbon monoxide (HO-CO) system in rat uterus: effect of sexual steroids and prostaglandins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 99(1). 59-66.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signalling. *Cell*. 80. 259-268.

Cohen-Armon, M. 2007. PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends in pharmacological sciences*. 28(11). 556-560.

Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., Szabo, C. 2012. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(23). 9161-9166.

Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M., Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*. 356(1-2). 65-73.

Crozet, N., Motlik, J., Szöllösi, D. 1981. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biology of the Cell*. 41. 35-42.

De Felici, M., Farini, D., La Sala, G., Tedesco, M. 2007. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Developmental Biology*. 306(2). 572-583.

Dekel N., Ayalon D., Lewysohn O., Nevo N., Kaplan-Kraicer R., Shalgi R. 1995. Experimental extension of the time interval between oocyte maturation and ovulation: effect on fertilization and first cleavage. *Fertility and Sterility*. 64(5). 1023-1028.

Dekel, N. 1988. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 541. 211-216.

DeLeon, E. R., Stoy, G. F., Olson, K. R. 2012. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Analytical Biochemistry*. 421(1). 203-207.

- Dello Russo, C., Tringali, G., Ragazzoni, E., Maggiano, N., Menini, E., Vairano, M., Preziosi, P., Navarra, P. 2000. Evidence that hydrogen sulfide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat.
- Denninger, J. W., Marletta, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et biophysica acta*. 1411(2-3). 334-350.
- Dissen, G. A., Garcia-Rudaz, C., Ojeda, S. R. 2009. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Seminars in reproductive medicine*. 27(1). 24-31.
- Duckitt, K., Thornton, S., O'Donovan, O. P., Dowswell, T. 2014. Nitric oxide donors for treating preterm labour. *The Cochrane database of systematic reviews*. 5. CD002860.
- Dufour, J. J., Lussier, J. G., Matton, P. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journals of Reproduction and Fertility*. 81. 301-307.
- Durlinger, A. L., Visser, J. A., Themmen, A. P. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 124(5). 601-609.
- Dyce, P. W., Wen, L., Li, J. 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell biology*. 8 (4). 384–390.
- Ecay, T. W., Powers D. R. 1990. Differential effects of testosterone and dibutyl cyclic AMP on meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 253, 88 – 98.
- Eckery, D. C., Moeller, C. L., Nett, T. M., Sawyer, H. R. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 57(3). 507-513.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., Wagers, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441 (7097). 1109–1114.
- Egorova, P., Popugaeva, E., Bezprozvanny, I. 2015. Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Seminars in cell and developmental biology*. pii: S1084-9521(15)00064-6.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122(6). 829-838.

Errico, S., Shohreh, R., Barone, E., Pusateri, A., Mores, N., Mancuso, C. 2010. Heme oxygenase-derived carbon monoxide modulate gonadotropin-releasing hormone release in immortalized hypothalamic neurons. *Neuroscience Letters*. 471(3). 175-178.

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70(3). 535-547.

Fissore, L. A., He, C. L., Van de Woude, G. F. 1996. Potential role of mitogen-activated protein (MAP) kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 55. 1261-1270.

Flores, J. A., Aguirre, C., Sharma, O. P., Veldhuis, J. D. 1998. Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH- $[Ca^{2+}]_i$ dose response. *Endocrinology*. 139(8). 3606-3612.

Franchi, L. L., Mandl, A. M., Zuckerman, S. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. In: *The Ovary*. Edited by: Zuckerman, S. London, Academic Press. 1-88.

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

Furchgott, R. F., Jothianandan, D. 1991. Endothelium-dependent and -independent vasodilatation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*. 28(1-3). 52-61.

Gershon, E., Plaks, V., Dekel, N. 2008. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 282(1-2). 18-25.

Gil, V., Parsons, S., Gallego, D., Huizinga, J., Jimenez, M. 2013. Effects of hydrogen sulfide on motility patterns in the rat colon. *British journal of pharmacology*. 169. 34-50.

Gondos, B. 1984. Germ cell differentiation and intercellular bridges. In: Van Blerkom, J., Motta, P. M. (eds.). *Ultrastructure of reproduction. Gametogenesis, fertilization and embryogenesis*. The Hague, Boston, Martinus Nijhoff. 31-45.

Gosden, R. G., Bownes, M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development. In: Grudzinskas, J. G., Yovich, J. L. (eds.). *Gametes – The Oocyte*. Cambridge REviews in Human Reproduction. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 23 – 53.

Gosden, R. G., Bownes, M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development. In: Grudzinskas, J. G., Yovich, J. L. (Eds.), *Gametes – The Oocyte*, Cambridge Reviews in Human Reproduction. Cambridge University Press, Cambridge. 23-53.

Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates – Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17. 121-155.

Gougeon, A., Chainy, G. B. N. 1987. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *Journal of Reproduction and Fertility*. 81. 433-442.

Greenwald, G. S., Terranova, P. F. 1988. Follicular selection and its control. In: *The physiology of reproduction*. Raven Press. New York, 445 s.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 346(6281). 245-250.

Gün, G., Kues, W. A. 2014. Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *BioResearch open access*. 3(6). 255-264.

Guzmán, M. A., Navarro, M. A., Carnicer, R., Sarría, A. J., Acín, S., Arnal, C. Muniesa, P., Surra, J. C., Arbonés-Mainar, J. M., Maeda, N., Osada, J. 2006. Cystathione beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human molecular genetics*. 15(21). 3168-76.

Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., Conti, M. 2005. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology*. 15(18). 1670-1676.

Harrouk W., Clarke H. J. 1995. Mitogen-activated protein (MAP) kinase during the acquisition of meiotic competence by growing oocytes of the mouse. *Molecular Reproduction and Development*. 41(1). 29-36.

Helmy, N., Prip-Buus, C., Vons, C., Lenoir, V., Abou-Hamdan, A., Guedouari-Bounihi, H., Lombés, A., Bouillaud, F. 2014. Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria. *Nitric oxide: Biology and chemistry*. 15,41. 105-112.

Herlands, R. L., Schultz, R. M. (1984). Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology*. 239. 317–325.

- Hervé, J. C., Phelan, P., Bruzzone, R., White, T. W. 2005. Connexins, innexins and pannexins: bridging the communication gap. *Biochimica et biophysica acta*. 1719(1-2). 3-5.
- Himelstein-Braw, R., Byskov, A. G., Peters, H., Faber, M. 1976. Follicular atresia in the infant human ovary. *Journal of reproduction and fertility*. 46(1). 55-59.
- Himelstein-Braw, R., Byskov, A.-G., Peters, H., Faber, M. 1976. Follicular atresia in the infant human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 46. 55—59.
- Holt, J. E., Tran, S. M., Stewart, J. L., Minahan, K., García-Higuera, I., Moreno, S., Jones, K. T. 2011. The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development*. 138(5). 905-913.
- Holwerda, K. M., Karumanchi, S. A., Lely, A. T. 2015. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. 24(2). 170-176. – review, jen AB!
- Horváth, B., Hortobágyi, L., Lenzser, G., Schweer, H., Hrabák, A., Sándor, P., Benyó, Z. 2008. Carbon monoxide –prostaglandin E2 interaction in the hypothalamic circulation. *Neuroreport*. 19(16). 1601-1604.
- Høyer, P. E., Byskov, A. G., Møllgård, K. 2005. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234(1-2). 1-10.
- Hsueh, A. J., McGee, E. A. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*. 21(2). 200-214.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5, 122-130.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47. 23-32.
- Channing, C. P., Bae, I. H., Stone, S. L., Anderson, L. D., Edelson, S., Fowler, S. C. 1981. Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 22(3). 359-370.
- Chin, E. R. 2005. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *Journal of applied physiology*. 99(2). 414-423.

Chmelíková, E., Tichovská, H., Petr, J., Sedmíková, M., Tůmová, L., Krejčová, M., Dörflerová, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal: an international journal of animal bioscience*. 5(9).1398-1405.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84(24). 9265-9269.

Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., Sagata, N. 2007. A direct link of the Mos-MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446(7139). 1100-1104.

Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58(1). 13-136.

Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*, 83, 669–682.

Jablonka-Shariff A., Olson M. L. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139. 2944 – 2954.

Jablonka-Shariff A., Olson M. L. 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Molecular Reproduction and Development* . 55. 412 – 421.

Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2005. The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxidants and Redox Signaling*. 7(5-6). 813-822.

Karpuzoglu, E., Ahmed, S. A. 2006. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric oxide*. 15(3). 177-186.

Keefe, D., Tran, P., Pellegrini, C., Oldenbourg, R. 1997. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster *zona pellucida*. *Human Reproduction*. 12(6). 1250-1252.

Kezele, P. R., Nilsson, E. E., Skinner, M. K. 2002. Insulin, but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Molecular and cellular endocrinology*. 192 (1-2). 37-43.

Kimura, H. 2002. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Molecular neurobiology*. 26(1).13-9.

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

Kline, D., Kline, J. T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology*. 149(1). 80-89.

Krejčová, T., Šmelcová, M., Petr, J., Bodart, J. F., Sedmíková, M., Nevorál, J., Dvořáková, M., Vyskočilová, A., Weingartová, I., Kučerová-Chrpová, V., Chmelíková, E., Tůmová, L., Jílek, F. 2015. Hydrogen sulfide donor proteus porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PloS one*. 10(1). e0116964.

LaPolt, P. S., Hong, L. S. 1995. Inhibitory effects of superoxide dismutase and cyclic guanosine 3', 5' – monophosphate on estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 136, 5533 – 5539.

Lasiene, K., Vitkus, A., Valanciute, A., Lasys, V. 2009. Morphological criteria of oocytes. *Medicina (Kaunas)*. 45(7). 509-515.

Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y. Lee, S. W., Zhao, Y. Baskar, R., Tan, C. H., Moore, P. K. 2008. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*. 117(18). 2351-60.

Li, S., Maruo, T., Ladines-Llave, C. A., Kondo, H., Mochizuki, M. 1994. Stage-limited expression of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocrine Journal*. 41. 83-92.

Lian, H. Y., Jiao, G. Z., Wang, H. L., Tan, X. W., Wang, T. Y. Zheng, L. L., Kong, Q. Q., Tan, J. H. 2014. Role of cytoskeleton in regulativ fusion of nucleoli: a study using the activated mouse oocyte model. *Biology of Reproduction*. 91(3). 56.

Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Shang, M., Guo, J. Z. 2006. Lokalization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese medici journal*. 119(22). 1877-83.

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

Lintern-Moore, S. Moore, G. M. P. 1979. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*. 20. 773—777.

Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9. 149.

Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Méry, J., Means, A., Dorée, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366(6452). 270-273.

Lu, C. Kavalier, A., Lukyanov, E., Gross, S. S. 2013. S-sulfhydration/desulfhydration and S-nitrosylation/denitrosylation: a common paradigm for gasotransmitter signaling by H₂S and NO. *Methods (San Diego, Calif.)*. 62(2). 177-181.

Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58 (5). 871 – 85.

Machado-Oliviera, G., Lefièvre, L., Ford, C., Herrero, M.B., Barrat, C., Connolly, T. J., Nash, K., Morales-Garcia, A., Kirkman-Brown, J., Publicover, S. 2008. Mobilisation of Ca²⁺ stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised in the female reproductive tract.

Marchal, R., Feugang J. M., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M., Mermillod, P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*. 56(1). 17-29.

Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E., Jelínek, K. 2007. *Morfologie hospodářských zvířat*. 4. vydání. Česká zemědělská univerzita v Praze. Brázda, Praha. 304 s. ISBN: 978-80-213-1658-4.

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

Mehlmann, L. M., Mann, J. S., Lowther, K. M. 2010. Reorganization of the endoplasmic reticulum and development of Ca²⁺ release mechanism during meiotic maturation of human oocytes. *Biology of Reproduction*. 83(4). 578-583.

Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170(2). 607-615.

Merchant-Larios, H., Chimal-Nonroy, J. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In: Motta, P. M. (ed.), *Developments in Ultrastructure of Reproduction*. Alan R. Liss Inc., New York. *Progress in clinical and biological research*. 296: 55-63.

Miyazaki, S., Ito, M. 2006. Calcium signals for egg activation in mammals. *Journal of pharmacological sciences*. 100(5). 545-552.

Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K., Wylie, C. 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Developmental Biology*. 240(2). 488-498.

Molyneaux, K., Dudley, B., Palumbo, C., Nalepka, J. 2010. BMP signaling controls formation of a primordial germ cell niche within the early genital ridges. *Developmental Biology*. 343(1-2). 84-93.

Monget, P., Bobe, J., Gougeon, A., Fabre, S., Monniaux, D., Dalbies-Tran R. 2012. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 356(1-2). 2-12.

Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 1995. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 53(3). 692-699.

Morbeck, D. E., Esbenschade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of Follicle Growth in the Prepubertal Gilt. *Biology of Reproduction*. 47 (3). 485-491.

Moricard R. a Moricard F. 1975. Espace périvitellin et réactions microvillositaires au cours de l'achèvement de la méiose et de la fécondation chez les Mammifères; orientation de recherches humaines. In: *La fécondation*. Thibault C., Collage Sociale Naturelle Etude Sterilite. Paris. 37-48.

Mortillo, S., Wassarman, P. M. 1991. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *International reviews of cytology*. 130. 85-110.

- Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72. 323-328.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Experimental Zoology*. 198(2). 155-162.
- Motlík, J., Koefoed-Johnsen, H. H., Fulka, J. 1978. Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro. *The Journal of Experimental Zoology*. 205(3). 377-383.
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S. 1997. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 75(1). 5-10.
- Mummery, Ch. L., de Sousa Lopes, S. M. Ch., van den Driesche, S., Carvalho, R. L. C., Larsson, J., Eggen, B., Surani, M. A. 2005. Altered primordial germ cell migration in the absence of transforming growth factor h signaling via ALK5. *Developmental Biology*. 284(1). 194-203.
- Nagyova, E. 2012. Regulation of cumulus expansion and hyaluronan synthesis in porcine oocyte-cumulus complexes during in vitro maturation. *Endocrine Regulations*. 46(4). 225-235.
- Nevoral, J., Petr, J., Gelaude, A., Bodart, J. F., Kucerova-Chrpova, V., Sedmikova, M., Krejcova, T., Kolbabova, T., Dvorakova, M., Vyskocilova, A., Weingartova I., Krivohlavkova, L., Zalmanova, T., Jilek, F. 2014. Dual effect of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS One*. 9(7). e99613.
- Nishiyama, T., Oshumi, K., Kishimoto, T. 2007. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytoskeletal factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446(7139). 1096-1099.
- Njie-Mbye, Y. F., Kulkarni, M., Opere, C. A., Ohia, S. E. (2012). Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 98. 16-22.
- Oakberg, E. F. 1979. Follicular growth and atresia in the mouse. *In Vitro*. 15. 41-49.
- Ocampo, L. T. C., Ocampo, M., Kanagawa, H. 1991. Timing of sequential changes in chromosome configuration during the 1st meiotic division of pig oocytes cultured in vitro. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 38(3-4). 127-137.

Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of Cell Biology*. 188 (2). 199-207.

Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A., Choi, A. M. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*. 6(4). 422-428.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327(6122). 524-526.

Paronetto, M. P., Giorda, E., Carsetti, R., Rossi, P., Geremia, R., Sette, C. 2004. Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *The EMBO Journal*. 23(23). 4649-4659.

Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. J. 2009. The endogenous production of hydrogen sulfide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6, 7. 10.

Peers, C. 2011. Ion channels as target effectors for carbon monoxide. *Experimental Physiology*. 96(9). 836-839.

Pepling, M. E., Spradling, A. C. 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*. 125(17). 3323-3328.

Pepling, M. E., Spradling, A. C. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental biology*. 234(2). 339-351.

Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozínek, J., Jílek, F. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal reproduction science*. 70(3-4). 235-249.

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

Pincus, G., Enzmann, E. V. 1935. The komparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *The Journal of experimental medicine*. 62(5). 665-75.

Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F., Cooper, J. A. 1993. Mos stimulans MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Molecular and cellular biology*. 13(4). 2546-2553.

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 32. 109-34. – jen AB

Reis, A., Gorr, I. H., Boos, D., Wühr, M., Madgwick, S., Jones, K. T., Stemmann, O. 2006. Essential CDK1-inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nature Cell Biology*. 8(9). 1035-1037.

Rienzi, L., Vajta, G., Ubaldi, F. 2011. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*. 17(1). 34-45.

Robinson, H., Wray, S. 2012. A new slow releasing, H₂S generating compound, GYY4137 relaxes spontaneous and oxytocin-stimulated contractions of human and rat pregnant myometrium. *PLoS One*. 7(9). e46278.

Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D. 2000. The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell*. 6(5). 975-987.

Ryter, S. W., Otterbein, L. E. 2004. Carbon monoxide in biology and medicine. *BioEssays*. 26 (3). 270 – 280.

Ryter, S. W., Otterbein, L. E., Morse, D., Choi, A. M. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 234-235(1-2). 249-263.

Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie: Překlad 10. vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN: 978-80-247-2640-3.

Sathananthan, A. H., Selvaraj, K., Trounson, A. 2000. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 161(1-2). 3-8.

Sato, E., Iritani, A., Nishikawa, Y. 1987. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured in vitro. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 49. 400-405.

Shamloul, R. 2009. The potential role of the heme oxygenase/carbon monoxide systém in male sexual dysfunctions. *The Journal of Sexual Medicine*. 6(2). 324-333.

Sherizly, I., Galiani, D., Dekel, N. 1988. Regulation of oocyte maturation: communication in the rat cumulus-oocyte komplex. *Human Reproduction*. 3(6). 761-766.

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

Schatten, H., Sun, Q. Y. 2011. Centrosome dynamics during mammalian oocyte maturation with a focus on meiotic spindle formation. *Molecular Reproduction and Development*. 78(10-11). 757-768.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346(6281). 240-244.

Singh, B., Meng, L., Rutledge, J. M., Armstrong, D. T. 1997. Effect of Epidermal Growth Factor and Follicle Stimulating Hormone during *in vitro* maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 46. 401-407.

Sitdikova, G. F., Fuchs, R., Kainz, V., Weiger, T. M., Hermann, A. 2014. Phosphorylation of BK channels modulates the sensitivity to hydrogen sulfide (H₂S). *Frontiers in physiology*. 5. 431.

Sitdikova, G. F., Weiger, T. M., Hermann, A. 2010. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Plügers Archiv: European Journal of Physiology*. 459(3). 389-397.

Skinner, M. K. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction update*. 11(5). 461-471.

Snyder, S. H., Gadalla, M. M., 2010. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of neurochemistry*. 113. 14-26.

Snyder, S. H., Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R. 2009. H₂S Signals through protein S-sulfhydration. *Science Signaling*. 2(96). ra72.

Soede, N. M., Langendijk, P., Kemp, B. 2011. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science*. 124 (3-4). 251-258.

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.

Stojkovic M., Motlik J., Kölle S., Zakhartchenko V., Alberio R., Sinowatz F., Wolf E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335–342.

Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et biophysica acta*. 1411(2-3). 217-230.

Sun, X. S., Liu, Y., Yue, K. Z., Ma, S. F., Tan, J. H. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*. 69(2). 228-34.

Suzuki, H., Jeong, B. S., Yang, X. 2000. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 63(3). 723-729.

Szabó, C. 2007. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *Nature Reviews*. 6. 917-935.

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

Tam, P. P., Snow, M. H., 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 64. 133-147.

Tan, J. H., Wang, H. L., Sun X. S., Liu, Y., Sui, H. S., Zhang, J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular human reproduction*. 15(1). 1-9.

Tang, G., Wu, L., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 37(7). 753-763.

Tannenbaum, S. R., White, F. M. 2006. Regulation and specificity of S-nitrosylation and denitrosylation. *ACS chemical biology*. 1(10). 615-618.

Tapanainen, J. S., Törmälä, R. M., Jääskeläinen, M., Lakkakorpi, J., Liakka, A., Vaskivuo, T. E. 2008. Zona pellucida components are present in human fetal ovary before follicle formation. *Molecular and cellular endocrinology*. 189(1-2). 10-15.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 61(2). 748-755.

Thibault, C., Szöllösi, D., Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement*. 27(5). 865-896.

Tilly, J. L., Niikura, Y., Rueda, B. R. 2009. The Current Status of Evidence for and Against Postnatal Oogenesis in Mammals: A Case of Ovarian Optimism Versus Pessimism? *Biology of Reproduction*. 80. 2-12.

Tsafiriri, A., Dekel, N., Bar – Ami, S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.* 64, 541 – 551.

Turnbull, K. E., Braden, A. W., Mattner, P. E. 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Australian Journal of Biological Sciences*. 30 (3). 229-241.

Uhm, S. J., Chung, H. M., Seung, K. R., Kim, N. H., Lee, H. T., Chung, K. S. 1998. Interactive effect of Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor beta and gonadotropin in *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*. 49. 319-319.

van den Hurk, R., Schotanus, K., Hage, W. J., Vanderstichele, H. 1997. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*. 48(3). 471-483.

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

Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in bioscience*. 7. d2006-2022.

Vitullo, A. D., Ozil, J. P. 1992. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental Biology*. 151(1). 128-136.

Vodička, P., Smetana, K. Jr., Dvořánková, B., Emerick, T., Xu, Y. Z., Ourednik, J., Ourednik, V., Motlík, J. 2005. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1049. 161-171.

Wang R. 2004. *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H₂S in Biology and Medicine*. Humana Press, New Jersey, USA, 400 stran.

Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16(13). 1792-1798.

Wang, R. 2012. Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(23). 8801-8802.

Wang, R. 2014. Gasotransmitters: growing pains and joys. 39(5). 227-232.

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

Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 283(36). 24285-24289.

Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. s. 79 – 122. ISBN 978-0781700863.

Wassarman, P. M., Litscher, E. S. 2012. Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *The International Journal of Developmental Biology*. 56(10-12). 833-839.

Weaver, L. K. 1999. Carbon monoxide poisoning. *Critical Care Clinics*. 15. 297-317.

Wegiel, B., Larsen, R., Gallo, D., Chin, B. Y., Harris, C., Mannam, P., Kaczmarek, E., Lee, P. J., Zuckerbraun, B. S., Flavell, R., Soares, M. P., Otterbein, L. E. 2014. Macrophages sense and kill bacteria through carbon monoxide-dependent inflammasome activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 124(11). 4926-40.

Wehrend, A., Meinecke, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science*. 66(3-4). 175-184.

Williams, C. J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*, 8 (4), 313–321.

Yang G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., Wang, R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. 322(5901). 587-590.

Ying, Y., Qi, X., Zhao, G. Q. 2001. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America*. 98(14). 7858-7862.

Ying, Y., Qi, X., Zhao, G. Q. 2002. Induction of primordial germ cells from pluripotent epiblast. *The Scientific World Journal*. 2. 801-810.

Yokobayashi, S., Liang, C. Y., Kohler, H., Nestorov, P., Liu, Z., Vidal, M., van Lohuizen, M., Roloff, T. C., Peters, A. H. 2013. PRC1 coordinates timing of sexual differentiation of female primordial germ cells. *Nature*. 495(7440). 236-240.

Zakhary, R., Gaine, S. P., Dinerman, J. L., Ruat, M., Flavahan, N. A., Snyder, S. H. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(2). 795-798.

Zamboni, L. 1974. Fine Morphology of the Follicle Wall and Follicle Cell-Oocyte Association. *Biology of Reproduction*. 10 (2). 125-149.

Zhang, W., Wei, Q. W., Wang, Z. C., Ding, W., Wang, W., Shi, F. X. 2011. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and the related nitric oxide/cyclic GMP signaling pathway in the ovaries of neonatal and immature rats. *Journal of Zhejiang University*. 12(1). 55-64.

Zhao, K., Ju, Y., Li, S., Altaany, Z., Wang, R., Yang, G. 2014. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Reports*. 15. 792-800.

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

Zhou, K, Gao, Q., Zheng, S., Pan, S., Li, P., Suo, K., Simoncini, T., Wang, T., Fu, X. 2013. 17beta-estriol induces vasorelaxation by stimulating endothelial hydrogen sulfide release. *Molecular Human Reproduction*. 19(3).169-176.

Zhu, X. Y., Gu, H., Ni, X. 2011. Hydrogen Sulfide in the Endocrine and Reproductive Systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75 – 82.

Zuckerman, S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress Hormonal Research*. 6. 63-108.

9 Seznam použitých zkratk

3MPST	3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza
AC	adenylát cykláza
AI/TI	přechodové stádium mezi anafází I a telofází I
AMH	antimüllerický hormon
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ATP	adenosin trifosfát
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
CaMKII	kalmodulin-dependentní protein kináza II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CBS	cystathionin β -syntáza
CDK1	cyklin-dependentní kináza 1
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CO	oxid uhelnatý
CSE	cystathionin γ -lyáza
CSF	cytostatický faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endoteliální forma NO-syntázy
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	Extracelular Signal-reguated Kinase
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FSH	folikuly stimulující hormon

GA	Golgiho aparát
GC	guanylát cykláza
GDF-9	Growth Differentiation Factor 9
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
GTP	guanosin trifosfát
GV	germinal vesicle
GVBD	germinal vesicle breakdown
H ₂ S	sulfan
HO	hem oxygenáza
IGF	Insuline-like Growth Factor
IL-4	Interleukin 4
iNOS	inducibilní NO-syntáza
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
IP ₃ R	inositol-1,4,5-trifosfátové receptory
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KL	kit ligand
KVD	Katedra veterinárních disciplín
LD	late diakinesis
LH	luteinizační hormon
LIF	Leukemia-Inhibiting Factor
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (MAP kináza)
MAPKK	specifická MAP kinázy kináza
MAPKKK	specifická kináza MAP kinázy kinázy (jinak také Mos)
MEK	specifická MAP kinázy kináza (jinak také MAPKK)
MI	metafáze I
MII	metafáze II

MPF	metafázi podporující faktor
N ₂ O ₃	oxid dusitý
Na ₂ S	sulfid sodný
NaCl	chlorid sodný
nNOS	nervová forma NO-syntázy
NO	oxid dusnatý
NO ₂	oxid dusičitý
NOS	Nitric Oxide Synthase (NO-syntáza)
p90RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
PDE3A	fosfodiesteráza 3A
PDE5	fosfodiesteráza 5
PGC	Primordial Germ Cell
PKA	cAMP-dependentní protein kináza
PKG	protein kináza G
PN	pronucleus
RNA	ribonukleová kyselina
RyR	ryanodinové receptory
SCF	Stem Cell Factor
TGF β	transforming Growth Factor