

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
Katedra veterinárních disciplin



**Úloha gasotransmíterů (oxidu dusnatého a sirovodíku) při partenogenetické
aktivaci a stárnutí oocytů**

Doktorská disertační práce

Autor: Ing. Petra Melicharová
Školitel: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.
Konzultant: Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.

Praha 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „**Úloha gasotransmiterů (oxidu dusnatého a sirovodíku) při partenogenetické aktivaci a stárnutí oocytů**“ vypracovala samostatně a použila jen citovaných pramenů, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze 31. 10. 2012

Petra Melicharová

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří mě během celého mého doktorského studia odborně vedli, za jejich pomoc, trpělivost, cenné rady a připomínky, za sdílení svých zkušeností a vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí na Katedře veterinárních disciplin ČZU v Praze a během zahraniční stáže na Université Lille 1, Sciences et Technologies, Laboratoire de Régulation des Signaux de Division - EA 4479, Villeneuve d'Ascq, France.

Za odborné vedení bych zejména chtěla poděkovat své školitelce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. a prof. Jeanu-Françoisovi Bodartovi, Ph.D..

Mé poděkování však patří rovněž mému blízkému okolí, rodině a přátelům za jejich lásku, trpělivost a podporu ve studiu.

ABSTRAKT

Disertační práce se zabývala vlivem sirovodíku na stárnutí prasečích oocytů a vlivem oxidu dusnatého na partenogenetickou aktivaci oocytů žaby *Xenopus laevis*. Sirovodík a oxid dusnatý jsou gasotransmitery patřící mezi endogenní signální molekuly, které v organismu plní roli druhých posílů. Během procesu stárnutí oocytů dochází k mnoha funkčním a strukturním změnám, které ovlivňují kvalitu a životaschopnost oocytů a které mohou vyústit ve spontánní partenogenetickou aktivaci, fragmentaci či lýzu oocytů. S délkou doby prodloužené kultivace oocytů dochází ke zvyšování podílu spontánně partenogeneticky aktivovaných, fragmentovaných ale i lytických oocytů a spolu s těmito změnami dochází ke snižování podílu oocytů ve stádiu MII. Příčinou je inaktivace faktorů majících vliv na udržení oocytů ve 2. meiotickém bloku, hlavně inaktivace MAPK a MPF.

Výsledky experimentů se sirovodíkem potvrzují, že sirovodík je aktivně zapojen do regulace procesů spojených se stárnutím prasečích oocytů. Bylo prokázáno, že u stárnoucích prasečích oocytů, které jsou vystaveny donoru sirovodíku, dochází zcela k potlačení indukce apoptózy, tedy k fragmentaci oocytu. Inhibicí enzymů endogenně produkujících sirovodík v oocytu prasety, cystathionin β -syntázy (CBS) a cystathionin γ -lyázy (CTH), dochází v průběhu procesu stárnutí prasečích oocytů k akceleraci procesu stárnutí a dřívějšímu nástupu fragmentace oocytů. Účinek inhibitorů, kyseliny oxamové (CBS) a D,L-propargylglycinu (CTH) lze zvrátit použitím donoru sirovodíku Na_2S .

Během stárnutí prasečích oocytů se nám nepodařilo lokalizovat CBS. CTH však byla lokalizována v jednotlivých ložiscích v cytoplasmě jak ve stádiu MII a tak v oocytech po 24, 48 a 72 hodinách prodloužené kultivace. Intenzita signálu však v průběhu procesu stárnutí slábne.

Oxid dusnatý (NO) je zapojen do regulace partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis*, jeho role však zůstává i nadále neobjasněna.

Donor oxidu dusnatého (SNAP) je schopen navodit partenogenetickou aktivaci žabích oocytů, ale nevykazuje spektrum procesů typických pro fertilizaci vajíčka spermií. Po delší době kultivace oocytů se SNAP se objevují vnější známky partenogenetické aktivace, o čemž svědčí pigmentová přestavba typická pro kortikální reakci. SNAP indukoval exocytózu kortikálních granul. MAPK a její efektor p90rsk byly do 30 minut po přidání SNAP defosforylovány, zatímco MPF zůstal aktivní, tyrozin 15 byl nefosforylován a úroveň cyklinu B byla stabilní. Aktivita MPF byla potvrzena fosforylací histonu H3 a absencí degradace Mos. U oocytů ošetřených SNAP aktivita MAPK klesá, ale MPF zůstává aktivní. Pokles aktivity MAPK souvisí s reorganizací dělicího vřetenka, tvorbou prvojader a pigmentovou přestavbou při migraci prvojádra.

NO-Scavenger CPTIO nenarušil vstup do MII fáze a meiotické zrání oocytů *Xenopus laevis*, protože oocyty stimulované progesteronem po ošetření CPTIO obnovily a dokončily meiotické zrání podobně jako kontrolní skupina oocytů. Mikroinjekce CPTIO však blokovala

účinky SNAP na oocyty, tedy i inaktivaci MAPK, reorganizaci dělicího vřeténka a tvorbu prvojádra.

Byla prokázána důležitá role Ca^{2+} v procesu partenogenetické aktivace indukované oxidem dusnatým, jež byla narušena v médiích CaLim a CaFree. Naše výsledky naznačují, že NO specificky indukuje partenogenetickou aktivaci u oocytů *Xenopus laevis*, a to právě prostřednictvím Ca^{2+} dependentního mechanismu, i když mechanismus účinku NO je třeba ještě určit.

Klíčová slova: oocyt, stárnutí, partenogenetická aktivace, sirovodík, oxid dusnatý, prase, *Xenopus laevis*.

ABSTRACT

This thesis examined the influence of hydrogen sulfide on ageing of porcine oocytes and the effect of nitric oxide in the parthenogenetic activation of oocytes of frog *Xenopus laevis*. Hydrogen sulfide and nitric oxide are gasotransmitters belonging to endogenous signalling molecules which in the organism act as second messengers. During the process of ageing of oocytes there are many functional and structural changes that affect the quality and viability of the oocytes and that can result in spontaneous parthenogenetic activation, fragmentation or lysis of oocytes. The proportion of spontaneous parthenogenetic activated, of fragmented and of lytic oocytes is increased with the length of time of prolonged cultivation. The proportion of oocytes in MII stage is reduced together with these changes. The reason this is inactivation of factors affecting the maintenance of oocytes in the 2nd meiotic arrest, especially inactivation of MAPK and MPF.

Results of experiments with hydrogen sulfide confirm that hydrogen sulfide is actively involved in regulation of processes associated with ageing of porcine oocytes. It has been demonstrated that ageing of porcine oocytes exposed to donor of hydrogen sulfide, occurred entirely to suppress induction of apoptosis, thus the fragmentation oocyte. Inhibition of enzymes endogenously producing hydrogen sulfide in porcine oocytes, cystathionine β -synthase (CBS) and cystathionine γ -lyase (CTH), leads to the to accelerating during the process of ageing and earlier onset of fragmentation of porcine oocytes. The effect of inhibitors, oxamic acid (CBS) and D, L-propargylglycin (CTH) can be reversed by using donor of hydrogen sulfide Na₂S.

We failed to locate CBS in the process of porcine oocytes. However CTH was localized in individual deposits in the cytoplasm in the MII stage and in oocytes after 24, 48 and 72 hours of prolonged cultivation. However, the intensity of signal decreased during the ageing.

Nitric oxide (NO) is involved in the regulation of parthenogenetic activation of *Xenopus laevis* oocytes, but its role remains unclear.

Nitric oxide donor (SNAP) is able to induce parthenogenetic activation of the oocytes, but does not show processes typice range for egg fertilization by sperm. After prolonged cultivation of oocytes with SNAP are noticed external signs / markers of parthenogenetic activation. This result is supported by rebuilding of the pigment typical for cortical reaction. SNAP induced exocytosis of cortical granules. MAPK and its downstream effector p90rsk were dephosphorylated within 30 minutes after addition of SNAP. MPF remained to active, tyrosine 15 was unphosphorylated and the level of cyclin B was stable. MPF activity was confirm by phosphorylation of histone H3 and the absence of degradation of Mos. In oocytes treated with SNAP decreases activity of MAPK, but MPF remains active. The decrease inactivity of MAPK related with deorganization mitotic spindle, formation of pronucleus and pigment rebuilding during migration of pronucleus.

NO-Scavenger of CPTIO not disturb the entry into MII stage or meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes, because oocytes stimulated by progesterone after treatment of CPTIO resumed and completed meiotic maturation similar to the control group of oocytes. Microinjection of CPTIO blocked the effects of SNAP on oocytes, inactivation of MAPK, deorganization of mitotic spindle and formation of pronucleus.

Important role of Ca^{2+} was demonstrated in the process of parthenogenetic activation of oocytes induced with nitric oxide, which was impaired in the medium CaFree and medium CaLim. Our results suggest that NO specifically induced parthenogenetic activation in oocytes of *Xenopus laevis*, through Ca^{2+} -dependent mechanism. The mechanism of effect NO has yet to be determined.

Keywords: oocyte, ageing, parthenogenetic activation, hydrogen sulfide, nitric oxide, pig, *Xenopus laevis*.

SEZNAM ZKRATEK

1n (haploidní počet chromozómů)

2n (diploidní počet chromozómů)

A23187 (Calcium Ionophor)

AdoMet (S-adenosylmethionin)

AI (Anaphase, anafáze I)

AIF (Apoptosis-Inducing Factor)

AII (Anaphase II, anafáze II)

APC (Anaphase-Promoting Complex)

APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome)

ATP (Adenosin Triphosphate, adenosin trifosfát)

Bad

Bag

Bak

Bax

Bcl-10

Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2)

Bcl-xl

Bid

Bim

Blk

BSA (Bovine Serum Albumine, bovinní sérový albumin)

Ca²⁺ (vápenaté kationty)

CAK (Cdc-Activated Kinase)

CaM (Calmodulin, kalmodulin)

CaMKII (Calmodulin Dependent Kinase, kalmodulin dependentní kináza)

cAMP (Cyclic Adenosin Monophosphate, cyklický adenosin monofosfát)

CBS (Cystathionin β-syntáza)

cdc20 (Cell Division Cycle 20)

cdc25 (Cell Division Cycle 25)

cdc27 (Cell Division Cycle 27)

Cdk (Cyclin Dependent Kinases, cyklin dependentní kinázy)

Cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1, cyklin dependentní kináza 1)

Cdk2 (Cyclin Dependent Kinase 2, cyklin dependentní kináza 2)

cGMP (Cyclic Guanosine Triphosphate, cyklický guanosin trifosfát)

c-kit (Tyrosin-Kinase Receptor)

Cl⁻ (chloridové anionty)

CO (oxid uhelnatý)

CSF (Cytostatic Factor, cytostatický faktor)

CTH (Cystathionin γ-lyáza)

DAG (1,2-diacylglycerol)

DMSO (dimetylsulfoxid)

DNA (Deoxyribonucleotid Acid, deoxyribonukleová kyselina)

E3 (Ubiquitin ligase, ubikvitin ligáza)

eCG (equinní choriový gonadotropin)
EDRF (Endothelium-derived relaxing factor, endoteliální relaxační faktor)
Emi2/Erp1/XErp1
eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase, endoteliální syntáza oxidu dusnatého)
ER (endoplazmatické retikulum)
ERK (Extracellular Regulated Kinases, extracelulárně regulované kinázy)
ERK1/p44 (Extracellular Regulated Kinases 1, extracelulárně regulovaná kináza 1)
ERK2/p42 (Extracellular Regulated Kinases 2, extracelulárně regulovaná kináza 2)
ER α , β (estrogenové receptory α , β)
FAD (Flavin-adenin dinukleotid)
FITC (fluorescein-5-izothiokyanát)
FMN (Flavin mononukleotid)
FSH (Folikulostimulační hormon)
GADPH (Glyceraldehyd-3-phosphate Dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza)
GnRH – (Gonadotropin Releasing Hormon, uvolňující hormon pro gonadotropin)
GSS (Gonadostimulating Substance, gonády stimulující substance)
GTP (Guanosine triphosphate, guanosin trifosfát)
GV (Germinal Vesical, zárodečný váček)
GVBD (Germinal Vesicle Breakdown, rozpad zárodečného váčku)
H⁺ (vodíkový kationt)
H₂S (sirovodík)
H4B (tetrahydrobiopterin)
hCG (humánní choriový gonadotropin)
HO-1, HO-2 a HO-3 (Hemoxygenase-1, -2 a -3)
HS⁻ (hydrogensulfidový aniont)
HSP-90 (Heat Shock Protein, protein tepelného šoku)
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IGF (Insulin-Like Growth Factor, růstový faktor)
IKK (komplex I κ B kináz)
iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusnatého)
IP3 receptory (1,4,5-inositoltrifosfátové receptory)
JNK (c-Jun Amino Terminal Kinase)
K⁺_{ATP} dependentní kanály
K⁺kanál (draselné kanály)
LH (Luteinizační hormon)
LTP (Long Term Potention)
MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, mitogeny aktivovaná protein kináza)
MEK1 – MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)
MI (Metaphase I, metafáze I)
MIH (Meiosis Inducing Hormone, meiózu indukující hormon)
MII (Metaphase II, metafáze II)
Mos (Serin/Threonine Protein Kinase)
MPF (M-Phase Promoting Factor - Maturation Promotion Factor)
MPST (3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza)
mRNA (Messenger Ribonucleotic Acid, messengerová ribonukleová kyselina)

NADPH (Nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfát)

NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NH₃ (amoniak)

NH₄⁺ (amonný kationt)

NMDA receptory (N-methyl-D-aspartic acid, N-methyl-D-aspartátové receptory)

nNOS (Neuronal Nitric Oxide Synthase, nervová syntáza oxidu dusnatého)

NO (oxid dusnatý)

NOS (Nitric Oxide Synthase, syntáza oxidu dusnatého)

OMI (Oocyte Maturation Inhibitor, inhibitor zrání oocytů)

p34^{cdc2} (Serin/Threonin Kinase) = Cdk1

p53 (Tumor Supresor Protein)

p65 (podjednotka p65 na cysteinu-38 NF- κ B)

p90Rsk

PBS (Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr)

PDE (Phosphodiesterase, fosfodiesteráza)

PDE-3A (Phosphodiesterase-3A, fosfodiesteráza-3A)

PDE-4B (Phosphodiesterase-4B, fosfodiesteráza-4B)

PG (Progesteron)

PGC (Primordial Germ Cells, primordiální zárodečné buňky)

PI (Prophase I, profáze I)

PIN (Protein Inhibitor of Synthase Nitric Oxide, Protein inhibitor syntázy oxidu dusnatého)

PKA (Protein-Kinase A)

PKC (Protein-Kinase C)

PLC (Phospholipase C)

Plk1 (Polo-like Kinase 1)

PLP (pyridoxal 5'-fosfát = vitamín B₆)

pre-MPF (neaktivní forma MPF)

Raf1

Ras

RNA (Ribonucleotid Acid, ribonukleová kyselina)

ROCC (membránové kanály regulované receptorem)

RPS3 (Ribosomal Protein S3)

rRNA (Ribosomal Ribonucleotid Acid, ribozomální ribonukleová kyselina)

RyR (ryanodinové receptory)

S²⁻ (sulfidový aniont)

SAC (Spindle Assembly Checkpoint)

SEP (Sperm Entry Point)

sGC (Soluble Guanylate Cyclase, rozpustná guanylát cykláza)

SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine)

S-SH

TGF- α , - β (Transforming Growth Factor, transformační růstový faktor)

TI (Telophase I, telofáze I)

TNF (Tumor Necrosis Factor)

TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)

tnNOS (Testicular nNOS, testikulární nNOS)

tRNA (Transfer RNA, transferová ribonukleová kyselina)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VOCC (membránové kanály regulované změnou elektrického potenciálu na membráně)

OBSAH

ÚVOD	1
1 LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
1.1 Oogeneze	3
1.1.1 Fáze množení zárodečných buněk a folikulogeneze	3
1.1.2 Fáze růstu oocytů a folikulogeneze	4
1.1.3 Fáze zrání oocytů	7
1.1.4 Stárnutí oocytů v podmínkách <i>in vitro</i>	20
1.1.5 Aktivace oocytu vs. partenogenetická aktivace oocytu	24
1.2 Oocyty žab <i>Xenopus laevis</i>	26
1.2.1 Obecná charakteristika využití žab <i>Xenopus laevis</i>	26
1.2.2 Oogeneze a embryogeneze u žab <i>Xenopus laevis</i>	27
1.3 Sirovodík (H ₂ S)	32
1.3.1 Obecná charakteristika H ₂ S	32
1.3.2 Biochemické vlastnosti H ₂ S	32
1.3.3 Biosyntéza H ₂ S	33
1.3.4 Katabolismus H ₂ S	34
1.3.5 H ₂ S versus apoptotické změny v organismu	35
1.3.6 Účinky H ₂ S ve tkáních	36
1.4 Oxid dusnatý (NO)	41
1.4.1 Obecná charakteristika a katabolismus NO	41
1.4.2 Biochemické vlastnosti a biosyntéza NO	41
1.4.3 Účinky NO ve tkáních	44
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	49
3 METODIKA PRÁCE	50
3.1 Prasečí oocyty	50
3.2 Oocyty žab <i>Xenopus laevis</i>	52
4 EXPERIMENTÁLNÍ SCHÉMA	55
4.1 Prasečí oocyty	55
4.2 Oocyty žab <i>Xenopus laevis</i>	57
5 VÝSLEDKY	59
5.1 Prasečí oocyty	59
5.2 Oocyty žab <i>Xenopus laevis</i>	71
6 DISKUSE	84
7 ZÁVĚR	90
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92

ÚVOD

S rozvojem biotechnologických metod v reprodukci jsou kladeny stále vyšší požadavky na získávání kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách. Mezi reprodukční biotechnologie hospodářských zvířat, využívající takto kultivované oocyty, patří například *in vitro* fertilizace, *in vitro* produkce embryí, či klonování přenosem jader somatických buněk. Efektivita těchto metodik je limitována kvalitou *in vitro* dozrálých oocytů a také vhodným načasováním *in vitro* oplození. Prase je často využíváno jako modelový organismus pro metody xenotransplantace a i pro humánní medicínu. Prase je druhem velice problematickým, zamrazování inseminačních dávek, embryí, ale také metoda klonování stále není dostatečně úspěšná.

Oocyty, u kterých nedochází k oplození včas, podléhají změnám označovaným jako stárnutí, během nichž dochází k výraznému snížení jejich kvality. Stárnoucí oocyty mohou podléhat programované buněčné smrti apoptóze či nekróze. Proces stárnutí brání využití oocytů pro reprodukční biotechnologie. Pro zvýšení efektivity reprodukčních biotechnologií je nutné důkladně popsat regulační mechanismy procesu stárnutí oocytů. Mezi faktory, které mohou mít vliv na průběh stárnutí prasečích oocytů, patří signální molekuly gasotransmiterů, mezi něž patří oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík.

Oxid dusnatý je v současnosti jednou z nejstudovanějších signálních molekul. NO funguje jako druhý posel a je syntetizován ve stopovém množství v různých živočišných tkáních. V roce 1998 byla udělena Nobelova cena za fyziologii za objev vasodilatačního účinku oxidu dusnatého v kardiovaskulárním systému. NO má velmi krátký poločas rozpadu. NO je zapojen do mnoha různých fyziologických a reprodukčních procesů. V řadě studií byl prokázán významný podíl na regulaci vývoje oocytů. NO hraje významnou úlohu v partenogenetické aktivaci oocyty. Donor NO SNAP je schopen navodit partenogenetickou aktivaci oocytů prasete a žab *Xenopus laevis*.

Sirovodík je signální molekulou působící v organismu jako významný inhibitor intracelulárního metabolismu. Podílí se na regulaci jak mnoha fyziologických, tak i patologicky probíhajících procesů v organismu. V savčích tkáních je sirovodík endogenně produkován z L-cysteinu, a to dvěma enzymy cystathionin β -syntázou a cystathionin γ -lyázou. Zmíněné enzymy byly nalezeny v somatických buňkách v centrální nervové soustavě, v kardiovaskulárním systému, ve vylučovací soustavě a také v reprodukčním systému samce a samice. Intracelulární koncentrace H_2S se v tkáních pohybuje v rozmezí 46–160 μM . Jakou konkrétní roli hraje sirovodík v regulaci procesů, probíhajících během růstu, zrání a stárnutí oocytů, zatím není zcela známo.

Cílem této práce bylo potvrdit hypotézy o zapojení gasotransmiterů do partenogenetické aktivace a stárnutí oocytů. Prvním dílčím cílem bylo potvrdit, že sirovodík je zapojen do regulace procesu stárnutí prasečích oocytů. Druhým dílčím cílem bylo potvrdit, že oxid dusnatý je zapojen do regulace procesu partenogenetické aktivace oocytů žab *Xenopus laevis*.

1 LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Oogeneze

Oogeneze je proces, během něhož se u samic, již v průběhu fetálního vývoje začínají tvořit pohlavní buňky, a který se zastavuje na konci pohlavní aktivity samice. Výsledkem jsou zralé, oplození schopné oocyty (Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman, 1988, Johnson *et al.*, 2004).

Samičí zárodečná buňka během svého vývoje redukuje svůj genetický materiál v procesu tzv. redukčního dělení, meiózy. Tento proces je zahájen v embryonálním období. Během celého procesu meiózy dochází k dvojímu zastavení, tzv. prvnímu a druhému meiotickému bloku. V období dospívání je oocyt uvolněn z prvního meiotického bloku v profázi I znovuzahájením meiózy, v období ovulace dochází k dalšímu zastavení ve druhém meiotickém bloku v metafázi II, který je prolomen vstupem spermie do oocytu a meióza je dokončena.

V časném embryonálním vývoji se u samic v ováriích vytvářejí pohlavní buňky - gamety (primordiální zárodečné buňky – Primordial Germ Cells, PGC), popřípadě buňky, ze kterých prapohlavní buňky vznikají cestou tzv. zárodečné dráhy (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman, 1988, Hafez *et Hafez*, 2000). Primordiální zárodečné buňky jsou extragonádálního původu (Rozinek *et al.*, 1995, Hafez *et Hafez*, 2000). K migraci těchto buněk do ovárií dochází u prasete cca 30. den (Romanovský *et al.*, 1988, Matova *et Cooley*, 2001, Eppig *et al.*, 2004).

Vývoj oocytů během oogeneze probíhá ve třech fázích: fáze množení zárodečných buněk, fáze růstu oocytů a fáze zrání oocytů.

1.1.1 Fáze množení zárodečných buněk a folikulogeneze

Primordiální zárodečné buňky zanořené do korové vrstvy ovária označujeme jako oogonie, jedná se o primordiální zárodečné buňky, jež ztratily schopnost migrace. Tyto buňky se mitoticky množí do okamžiku, kdy vstoupí do profáze I meiotického dělení (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman, 1988, Picton *et al.*, 1998, Bielanska-Osuchowska, 2006). Oogonie se liší od ostatních typů buněk svými cytotochemickými vlastnostmi, morfologií a velikostí (Wassarman, 1988). Oogonie mezi sebou komunikují pomocí mezerových spojů (gap junctions) a desmozómů. Komunikují tak spolu dokonce celé shluky oogonií i na ně přilehlé somatické buňky (Guraya, 2000). Gap junctions se skládají z proteinů konexinů, jejichž exprese je spojena s proliferací granulózniích buněk a stupněm folikulogeneze, což je důležité pro růst, vývoj a meiotické zrání oocytu (Vanderhyden, 2002, Fair, 2003). Gap junctions umožňují přenos aminokyselin, metabolitů a nukleotidů do rostoucího oocytu (Eppig, 1991).

V průběhu oogeneze se oogonie asymetricky dělí, tím vznikají primordiální oocyty obklopené vrstvou pregranulózniích buněk (Wassarman, 1988, Picton *et al.*, 1998). U prasat dochází ke změně oogonie v primární oocyt před 40. dnem embryonálního vývoje (Black *et al.*, 1968, Picton *et al.*, 1998). Primární oocyty se v ováriu nacházejí v primordiálním folikulu a vykazují zvýšenou syntetickou aktivitu a rostou. Během této fáze se v každém ováriu vytváří zásoba primordiálních folikulů v množstvích desetitisíců až statisíců: prase 210 tisíc, člověk 500 tisíc, myš 10 tisíc (Romanovský *et al.*, 1988, Fair *et al.*, 1995, Gosden *et al.*, 1997). Původním předpokladem je, že samice se rodí s konečným počtem zárodečných buněk (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988). Avšak tento předpoklad byl vyvrácen některými studiemi. Fáze množení zárodečných buněk není omezena pouze na prenatální fázi života samice, ale k množení zárodečných buněk dochází i během života samice (Johnson *et al.*, 2004, Bukovský, 2005). U samic dospělých i juvenilních myší byly nalezeny mitoticky aktivní zárodečné buňky ve vaječnicích i v extragonádální tkáni – v kostní dřeni a v krevních buňkách. Sloužily jako zásoba zárodečných buněk, které však často podléhaly atrezii (Johnson *et al.* 2004, 2005). Další studie potvrdila Johnsonovu teorii, když autoři získali zárodečnou linii z buněk adultních myší (Zou *et al.*, 2009).

1.1.2 Fáze růstu oocytů a folikulogeneze

V této fázi dochází k výraznému zvýšení syntetické aktivity oocytu a intenzivnímu mitotickému dělení folikulárních buněk. Za iniciaci této fáze jsou zodpovědné oocyty (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Eppig, 2001).

Růstová fáze je velmi dlouhá, může trvat i několik let (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988).

Rostoucí oocyt je obklopen jednou nebo více vrstvami epiteliálních somatických buněk tvořících kolem oocytu váček – folikul (Wassarman, 1988, Picton *et al.*, 1998). Primordiální folikuly byly pozorovány ve vaječnicích embryí prasat už 56. den po inseminaci (Bielanska-Osuchowska, 2006). Postupně dochází ke změně folikulárních buněk na buňky kubické a folikul se stává folikulem primárním. V průběhu růstové fáze se pregranulózní buňky folikulu dále dělí a z primárního folikulu se stává folikul sekundární (Sládeček, 1986, Eppig, 1991, Fair, 2003).

S postupujícím vývojem se vrstvením granulózniích buněk vytváří *membrana granulosa* obklopená prokrveným pojivovým obalem zvaným *theca foliculli*. Buňky *theca foliculli* se diferencují na *theca foliculli interna* a *theca foliculli externa*. Jakmile je oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulózniích buněk, je folikul označován jako sekundární čili folikul preantrální (Eppig, 2001, Fair, 2003). V této fázi dosahují u prasat folikuly velikosti 300 μm a prasečí oocyt dosahuje 90 μm (Van den Hurk *et al.*, 1997). U savců postupně vzniká v mnohvrstevném

sekundárním folikulu dutina (*antrum folliculi*) vyplněná folikulární tekutinou, do této dutiny ční oocyt na tzv. vejconosném hrbolku (*cumulus oophorus*) (Wassarman, 1988, Vanderhyden *et al.*, 1993, Hunter, 2000, Eppig, 2001). Do zformování antrální dutiny uplynou u prasete tři měsíce (Hunter, 2000). Tento folikul se potom označuje jako terciární nebo antrální folikul, který má pro oocyt tři základní funkce – vytváří ochranný obal oocytu, zajišťuje jeho výživu a podílí se na hormonálně regulační funkci (Sládeček, 1986). Růst antrálních folikulů se uskutečňuje především pod vlivem folikulostimulačního hormonu (FSH) v krvi (Fair, 2003). Folikul se pod vlivem folikulární tekutiny vyklenuje nad povrch ovária a vzniká tak velký předovulační folikul představující poslední stádium vývoje folikulu (Wassarman, 1988). U prasnice se v cyklu vyvíjí více než 50 folikulů. U prepubertálních prasniček se na ováriu nachází 70 % primordiálních folikulů, 3 % primárních, 30 % sekundárních a malý počet terciárních folikulů a žádná žlutá tělíska. U prasnic má na selekci folikulů vliv především žluté tělísko. Během estrálního cyklu prasnic se mění poměr zdravých a atretických oocytů (Knox, 2005). Folikulární buňky kolem oocytu v antrální dutině tvoří obal *corona radiata*. Po ukončení zrání oocytu se mikrokilky (*mikrovilli*) plazmatické membrány zatahují do oocytu a vrstva glykoproteinů obalující oocyt se stává hlavním obalem oocytu – *zonou pellucidou* (Norberg, 1972, Sládeček, 1986). *Zona pellucida* chrání oocyt před mechanickým poškozením, slouží jako sekundární blok proti polyspermii při oplození a vytváří bariéru proti proniknutí spermie jiného živočišného druhu (Yurewicz *et al.*, 1987, Gosden *et al.*, 1997).

Granulózní buňky se v růstové fázi mění na dva typy buněk – buňky těsně obklopující oocyt (kumulární) a buňky těsně sousedící s buňkami vnitřní stěny folikulu (murální) (Buccione *et al.*, 1990). Kumulární buňky při zvýšené hladině LH expandují a po ovulaci zůstávají s oocytem asociovány až do oplození (Vanderhyden *et al.*, 1993, Fair, 2003).

Jen malé množství rostoucích folikulů dosáhne finální velikosti, dozraje a ovuluje, většina z nich podléhá atrézii (apoptotickému zániku).

Oocyty prasete rostou z původních 30 μm bez *zony pellucidy* do velikosti o průměru 120 μm u plně dorostlého oocytu ve folikulu o velikosti 1,8 mm (Motlík *et Fulka*, 1986, Hyttel *et al.*, 1997, Lánská *et al.*, 2006). U prasete tato fáze trvá cca 3 měsíce (Morbeck *et al.*, 1992).

Změny morfologie a biochemické změny oocyty ve fázi růstu

V průběhu růstové fáze v cytoplazmě oocyty dochází k syntéze a hromadění rezerv živin a prekurzorů proteinů potřebných pro průběh meiotického zrání a následný časný embryonální vývoj (Gosden *et al.*, 1997, Picton *et al.*, 1998). Dochází k morfologickým změnám mnoha intracelulárních organel. Silně se zvětšuje jádro oocyty, které se ve fázi diktyotene označuje jako zárodečný váček (GV – *germinal vesiculli*). Se zvětšováním jádra se zvětšuje i jadérko, které se v jádře jeví jako zárodečná skvrna (*macula germinativa*) (Wassarman, 1988). Chromatin GV se formuje do typické podkovovité struktury (Wassarman *et al.*, 1994). Zvyšuje se počet mitochondrií a mění se i jejich tvar a syntetická aktivita. Aktivita endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu během růstové fáze oocyty výrazně stoupá (Fair *et al.*, 1997, Guraya, 2000). Golgiho komplex se v oocyty nachází poblíž zárodečného váčku a v průběhu růstu oocyty se rozpadá na drobné váčkovité útvary, které se přemisťují do prostoru kortexu a podílí se, spolu s endoplazmatickým retikulem a multivezikulárními tělísky, na vzniku kortikálních granul. Ke konci růstové fáze Golgiho komplex zpracovává látky nezbytné pro další vývoj oocyty. U savců během růstové fáze v některých případech zaniká centriola (Norberg, 1972, Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman, 1988, Hyttel *et al.*, 1999, Bielanska-Osuchowska, 2006). Chromatin je dekonduzovaný v zárodečném váčku do periukleárních prstenců či jiných odpovídajících struktur dle živočišného druhu (Tan *et al.*, 2009b). Chybí-li v oocyty některé strukturní organely, je narušen zisk meiotické kompetence a samice se stává sterilní (Eppig *et al.*, 2002).

V oocyty dochází i k mnoha biochemickým změnám, zejména se zvyšuje činnost proteosyntetického aparátu. Zvětšování oocyty tedy souvisí s mimořádnou syntetickou aktivitou. Syntetizuje se množství zásobní RNA v oocyty (až 200x oproti somatickým buňkám), především ribozomální RNA (Moore, 1978, Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988). Po ukončení fáze růstu oocyty obsahují 15 % mRNA (messenger RNA), 20-25 % tRNA (transfer RNA) a 60-65 % rRNA (ribosomal RNA). Množství rRNA v polyzomální formě činí 20 %, zbytek zásobní rRNA je v translačně neaktivní formě a k její translaci do ribozomů dochází až v průběhu časně embryogeneze (Greenwald *et al.*, 1988, Hyttel *et al.*, 1999, Guraya, 2000). Po oplození jsou tyto ribozomy využity k okamžité proteosyntéze, a to až do doby, než je reaktivován embryonální genom a časně embryo je schopné vlastní syntézy rRNA (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988). Dále se syntetizují glykoproteiny vrstvy *zóny pellucidy*, laktát dehydrogenáza, tubulin, aktin, kalmodulin, histony a mitochondriální proteiny (Wassarman, 1988).

Zisk meiotické kompetence oocytů

Meiotická kompetence je schopnost oocytu znovuzahájit a dokončit meiotické zrání oocytu dosažením metafáze II. Tuto schopnost oocyty postupně získávají během fáze růstu a závisí právě na velikosti oocytu a folikulu (Motlík *et al.*, 1984, Eppig, 2001).

Zisk meiotické kompetence v *in vitro* podmínkách je závislý na stupni vývoje oocytů (Armstrong, 2001). To již bylo potvrzeno u oocytů lidí a primátů (Edwards, 1965), myši (Eppig *et al.*, 1992), potkanů (Vanderhyden *et al.*, 1990), ovcí (Staigmiller *et al.*, 1984), skotu (Liebfried-Rutledge *et al.*, 1987) a i u prasat (Mattioli *et al.*, 1988).

Zisk meiotické kompetence je mimo jiné závislý na hormonální regulaci, především na hladinách luteinizačního hormonu (LH) a také na folikulárním vývoji, kde je významně ovlivněn stupněm atrezie folikulu (Armstrong, 2001). V průběhu růstu jsou nejprve oocyty prasete meioticky zcela nekompetentní. Jedná se o malé rostoucí oocyty s vnitřním průměrem do 100 μm . Tyto oocyty nejsou schopné znovuzahájení meiotického zrání (Miyano, 2003). Částečně kompetentní oocyty prasete (o vnitřním průměru kolem 110 μm) jsou schopné zahájit meiotické zrání, ale nejsou schopné ho dokončit (Hampl *et al.*, 1995, Schramm *et al.*, 1999). Plně kompetentní oocyty prasete (o vnitřním průměru 120 μm – plně dorostlé oocyty) jsou nejen schopné znovuzahájit, ale i dokončit meiotické zrání dosažením metafáze II a stát se tak oplození schopnými oocyty (Motlík *et al.*, 1984, Morbeck *et al.*, 1992, Petr *et al.*, 1994). Nezbytným faktorem pro získání meiotické kompetence je přítomnost granulózních buněk (Petr *et al.*, 1994). Pro získání plně kompetentních prasečích oocytů je nejvhodnější odběr dorostlých oocytů z ovárií v pozdní luteální nebo časně folikulární fázi ovariačního cyklu (Machatková *et al.*, 2008).

1.1.3 Fáze zrání oocytů

Do fáze zrání vstupují oocyty plně dorostlé a během této fáze se oocyty stávají oplození schopnými (Wassarman, 1988). V *in vivo* prostředí stimuluje znovuzahájení meiotického zrání zvýšení hladiny hypofyzárních hormonů – LH a FSH. V podmínkách *in vitro* je stimulem izolace oocytu z folikulu (Fan *et al.*, 2002). Z dosud diploidních buněk vznikají meiotickým dělením buňky haploidní. Z primárního oocytu heterotypickým dělením vzniká sekundární oocyt a první pólová buňka (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988).

V rostoucích a dominantních folikulech oocyty zůstávají zastaveny ve stádiu diplotene profáze I. V *in vivo* podmínkách začíná fáze zrání u prasat asi 48 hodin před ovulací. Stimulem pro znovuzahájení meiózy je zvýšená hladina LH, ve které hraje nezbytnou roli komunikace oocytu s okolními somatickými buňkami. Oocyt nemá receptory pro gonadotropní hormony, proto hormonální signál působí přes granulózní buňky, které na svém povrchu mají odpovídající receptory (Lawrence *et al.*, 1980, Picton *et al.*, 1998). Po zvýšení hladiny LH nastává narušení

gap junctions mezi oocytem a kumulárními buňkami, které jsou nadále zadrženy v blízkosti oocytu pomocí kyseliny hyaluronové, v procesu expanze kumulu (Wassarman, 1988).

Po prasknutí folikulu dochází k procesu ovulace, kdy oocyt dozrává právě v období mezi LH vlnou a ovulací (Van den Hurk *et al.*, 2000). Při sestupu vejcovodem je meióza opět pozastavena, jedná se o tzv. druhý meiotický blok. Pokračování a dokončení meiózy je možné jen po tzv. aktivačním stimulu, v *in vivo* podmínkách jím je průnik spermií při oplození a *in vitro* může být vyvolán partenogenetickou aktivací, například ionty vápníku (Hunter, 2000).

Heterotypické dělení (redukční) (obr. č. 1) – první cyklus meiotického dělení, které se odlišuje od mitózy a je to poměrně složitý děj. Zahrnuje přípravné období proleptotene, během něhož se dokončuje replikace DNA. Samotné heterotypické dělení, v němž profáze I (PI) zaujímá 90 % děje, probíhá v několika fázích (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988).

První fází heterotypického dělení je fáze označovaná LEPTOTENE. Toto stádium je dlouhé 3-6 hodin a odpovídá rané mitóze (Romanovský *et al.*, 1988). V této fázi je zahájeno meiotické dělení a dochází ke kondenzaci, dehydrataci a zviditelnění chromozómů (Wassarman *et al.*, 1994). Mizí jaderné póry. Chromatin se stává heterochromatinem (Tan *et al.*, 2009b). Chromozómy jsou v diploidním počtu ($2n$) a jejich telomery směřují k určitému místu jaderné membrány. Tomuto uspořádání se říká buket (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988).

Druhá fáze je označována ZYGOTENE a dochází zde k podélné synapsi homologních chromozómů, jejichž telomery jsou zakotveny v jaderné membráně. Dále se vytváří synaptický komplex - synapton (spojovací bílkovina) a spárované chromozómy vytvářejí bivalenty (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman *et al.*, 1994).

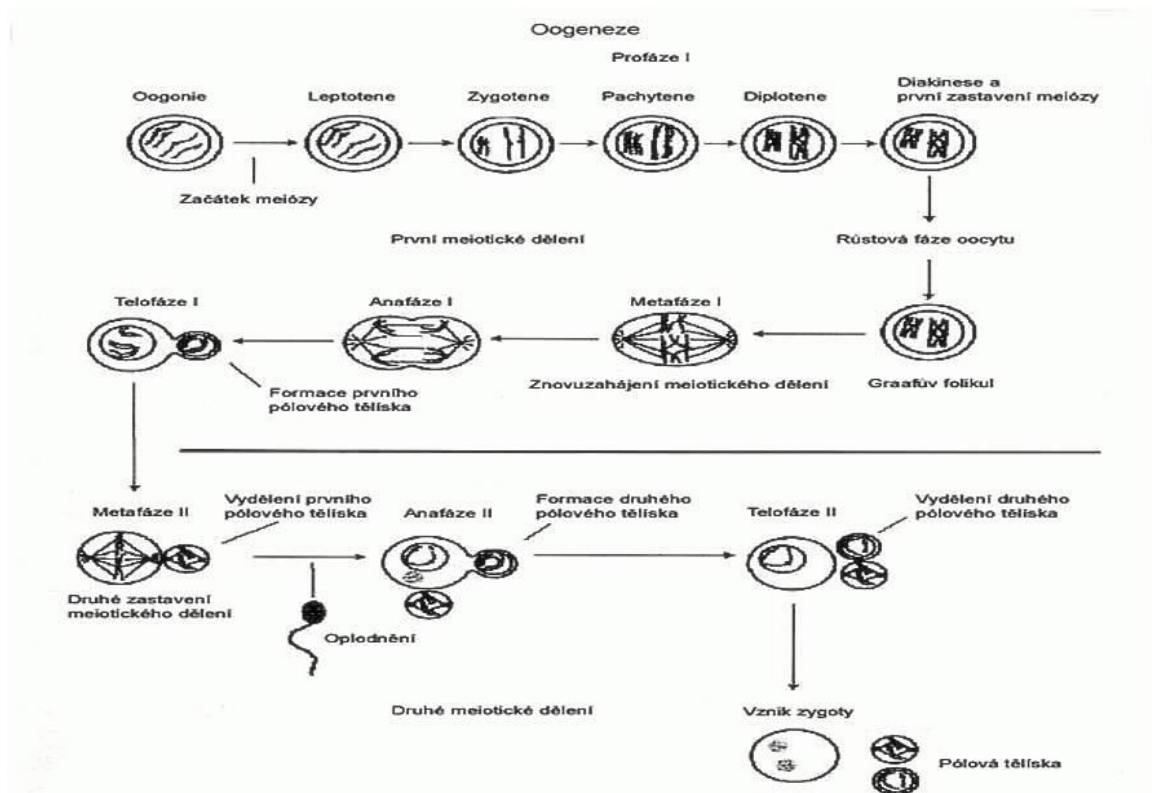
Třetí fáze je nazývána PACHYTENE. Zde se spárované chromozómy zkracují a tloustnou. Každý chromozóm je zřetelně rozdělen na dvě sesterské chromatidy. Ze dvou k sobě přiložených bivalentů vzniká tetráda. Mimo jiné dochází k jejich proplétání a následnému crossing-overu. Během crossing-overu dochází k výměně určitých úseků chromatid. Důsledkem je redistribuce genetického materiálu mezi chromatidami a jednotlivými vlákny DNA spojenými v synapsi. Toto stádium trvá cca 60 hodin (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Wassarman *et al.*, 1994).

Čtvrtou fází je DIPLLOTENE. V této fázi se začnou od sebe chromatidy oddělovat. Dochází k oddálení homologních chromozómů, ale ty zůstávají spojeny v místě překřížení nesesterských chromatid. Pokud proběhl crossing-over objeví se na některých chromatidách tzv. chiasmata (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988). V pozdní fázi diplotene dochází k prvnímu zastavení meiotického dělení – k prvnímu meiotickému bloku, v němž oocyt prochází

růstovou fází (Motlík *et* Fulka, 1986, Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Motlík, 1989, Lawrence *et al.*, 1997). U člověka může trvat až 40 let (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Homeotypické dělení (obr. č. 1) se v podstatě neliší od mitózy. Chromozómy jsou v této fázi v haploidním počtu ($1n$) v podobě diád, každý je tvořen dvěma chromatidami spojenými centromerou (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988). Toto dělení se zastavuje v metafázi II (MII) a pokračuje až po oplození (Motlík *et* Fulka, 1986, Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988, Motlík, 1989, Lawrence *et al.*, 1997). Po oplození pak dále ze sekundárního oocyty vzniká haploidní ootida a druhá pólová buňka. Výsledkem meiotického dělení je tedy zralý oplození schopný oocyt a dvě až tři pólové buňky (Sládeček, 1986, Romanovský *et al.*, 1988).

Obrázek č. 1: Schematické znázornění heterotypického a homeotypického meiotického dělení (převzato z Briggs *et al.*, 1999).



Meiotické zrání oocyty zahrnuje mimo jiné dva souběžně probíhající děje – jaderné zrání a cytoplazmatické zrání (Hunter, 2000, Sirard *et al.*, 2006).

Během jaderného zrání je zárodečný váček (GV) zpočátku ohraničen jadernou membránou. Jadérko je obklopeno rozptýleným chromatinem, který utváří kruh nebo útvar podobný koňské podkově (Motlík *et* Fulka, 1976, Wassarman, 1988). Zárodečný váček se zvětšuje a dochází v něm i ke zvětšení jadérka (Sládeček, 1986). Znovuzahájení meiotického zrání pak zahrnuje rozpad zárodečného váčku (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD),

kondenzaci chromozómů a formaci dělicího vřeténka (Thibault *et al.*, 1987). Při GVBD mizí jaderné póry, jadérko a jaderná membrána (Wassarman, 1988). U prasete probíhá ve 4 stádiích GVBD. V GV1 chromozómy jsou pozorovatelné v útvaru koňské podkovy. Ve stádiu GV2 jsou na jaderné membráně pozorovatelné shluky chromatinu. V GV3 je chromatin kondenzovaný a ve stádiu GV4 už není rozpoznatelné jadérko a jaderná membrána je rozptýlena do membránových dubletů spojených s endoplazmatickým retikulem (Lucas *et al.*, 2002). K rozpadu zárodečného váčku dochází u prasečích oocytů po 16-18 hodinách kultivace v *in vitro* podmínkách, mizí jadérko a splývá s cytoplazmou (Motlík *et al.*, 1984). V metafázi I (MI) se utváří bivalenty. V anafázi I (AI) se rozcházejí homologní chromozómy k pólům. V telofázi I (TI) se vyděluje první pólové tělísko (s polovinou genetické informace) a poté je zrání oocyty zastaveno v metafázi II (MII) (Kubelka *et al.*, 1988). Jaderné zrání oocyty prasete v *in vitro* podmínkách trvá 43-46 hodin (Edwards, 1965, Sirard *et al.*, 1989).

Dokončení samotného jaderného zrání následný embryonální vývoj nezaručuje (Sirard *et al.*, 1989).

Během cytoplazmatického zrání probíhají v cytoplazmě ultrastrukturální změny zahrnující redistribuci organel, cytoskeletu, transkripční aktivity mRNA u oocyty a obsahu tzv. cytoskeletálních faktorů (diferenciace signální kaskády vápníku), které souvisejí s jaderným zráním a se získáváním meiotické kompetence (Sirard *et al.*, 1989). Mitochondrie se v době rozpadu zárodečného váčku seskupí kolem jádra, pak se rozptýlí při vydělení prvního pólového tělíska a v MII se opět seskupí (Van Blerkom *et Bell*, 1986). Kumulární buňky syntetizují faktory kontrolující jaderné i cytoplazmatické buňky. Jaderné a cytoplazmatické zrání není v průběhu fáze zrání totožné, pokud dojde k zablokování jaderného zrání během kultivace, cytoplazmatické zrání pokračuje. Po následné stimulaci jaderného zrání pak dochází k jeho akceleraci (Chmelíková *et al.*, 2004). Cytoplazmatické zrání je důležité pro následující oplození a embryonální vývoj.

Faktory ovlivňující meiotické zrání oocytů a získání meiotické kompetence

Na meiotické zrání mají vliv různé faktory jako signální molekuly, fosfatázy, cykliny a na cyklinech závislé kinázy a jejich mechanismy působení jsou různě propojené.

Cyklické nukleotidy (cAMP a cGMP)

Cyklické nukleotidy jsou faktory mající schopnost regulace meiotického zrání. Nejdůležitějšími z nich je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Jsou syntetizovány jak oocyttem, tak i folikulárními buňkami prostřednictvím adenylátcyklázy a guanylátcyklázy a do oocyty se dostávají především pomocí mezibuněčných

spojů (gap junctions) (Cho *et al.*, 1974, Sato *et Koide*, 1987). Přítomnost cGMP a cAMP je důležitým faktorem při vytváření dělicího vřeténka (Sun *et Nagai*, 2003). Pro znovuzahájení meiózy a výstup z prvního meiotického bloku je nutné, aby se snížila hladina cAMP v oocytu, (Cho *et al.*, 1974).

V padesátých letech byl cAMP popsán jako intracelulární posel. Přenos signálu je zprostředkován aktivací cAMP dependentní kinázy známé jako Protein-Kinase A (PKA), která v oocytech slouží k udržení meiotického bloku tím, že fosforyluje proteiny důležité pro udržení prvního meiotického bloku (Bornslaeger *et al.*, 1986). Aktivovaná PKA má tedy inhibiční vliv na meiotické zrání (Lazar *et al.*, 2002). cAMP je syntetizován oocytem i folikulárními buňkami a přerušení komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami přes gap junctions má za výsledek snížení hladiny cAMP v oocytu (Suzuki *et al.*, 2000). Koncentraci cAMP může zvyšovat cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), a tak inhibovat spontánní zrání (Ratner, 1976).

Úloha cGMP u prasat nebyla zatím zcela jasně popsána. cGMP vzniká díky rozpustné guanylát cykláze (sGC), která se účastní přeměny guanosin trifosfátu (GTP) na cGMP. cGMP má v organismu za cíl fosfodiesterázy, proteinkinázu G a iontové kanály. Zvýšení hladiny cGMP, které je regulováno prostřednictvím FSH, má za následek snížení hladiny cAMP, a tím stimuluje rozpad zárodečného vaku (Hubbard *et Price*, 1988, Petr *et al.*, 2006).

Fosfodiesterázy (PDE) hydrolyzují cAMP na AMP, dochází tedy k poklesu hladiny cAMP a k znovuzahájení meiózy. V savcích oocytech je hlavní PDE-3A a v granulózních buňkách je PDE-4B (Bornslaeger *et al.*, 1986, Vaccari *et al.*, 2009).

Stimulace progesteronem u žab *Xenopus laevis* vedoucí k aktivaci cdc2 probíhá ve dvou krocích. Prvním je inhibice aktivity PKA a druhým je pokles hladiny proteinu cAMP, oba kroky jsou nezbytné pro meiotické zrání (Maller *et al.*, 1979, Matten *et al.*, 1994). Aktivita PKA je regulována prostřednictvím efektorů cdc25, cyklinu B (Rime *et al.*, 1992, 1994) a malých G proteinů (GTPázy) z rodiny Ras (Jesus *et al.*, 1998, Rime *et al.*, 1998). Inhibice PKA indukuje syntézu proteinu Mos a aktivaci MAPK a Rsk. Rsk ve spojení s cdc2 vede k inhibici Myt1 kinázy (Palmer *et al.*, 1998). Po působení progesteronu podobně jako u savců se během meiotického zrání jako první inhibuje adenylátcykláza, a tím klesá hladina cAMP, a tak brání aktivitě PKA (Maller *et al.*, 1979, Rime *et al.*, 1992, 1994).

OMI (Oocyte Maturation Inhibitor)

Malý polypeptid (1-2 kDa) udržující savčí oocyty ve fázi diplotene 1. meiotického dělení, nacházející se ve folikulární tekutině a jehož koncentrace klesá úměrně s velikostí folikulu (Van de Wiel *et al.*, 1983). OMI ovlivňuje oocyty prostřednictvím kumulárních buněk pomocí gap

junctions. Inhibiční účinek je spojen se zvýšenou koncentrací cAMP a ke snížení jeho hladiny dochází na konci fáze růstu oocytů (Wassarman, 1988).

O žab *Xenopus laevis* polypeptid OMI nefunguje, ale působí zde GSS a MIH.

GSS (Gonadostimulating substance) a MIH (Meiosis Inducing Hormone)

U obojživelníků neexistuje mechanismus podobný savčím oocytům, protože oocyt nevstupuje do GVBD při defolikulaci. U obojživelníků funguje model GSS a MIH. Oocyty jsou zastavené v profázi I. GSS stimuluje folikulární buňky, které v odpovědi na tuto stimulaci syntetizují MIH a oocyty vstupují do stádia GVBD. Převažuje zde víc mechanismus indukce nad mechanismem inhibice (Green *et al.*, 2007, 2010).

MPF (M-Phase Promoting Factor)

V roce 1971 byl popsán vliv tohoto faktoru na průběh meiotického zrání u oocytů žáby *Rana pipiens* (Masui *et* Markert, 1971) a až o pár let později získán prostřednictvím chromatografických metod a elektroforézy ze zralých oocytů *Xenopus laevis* (Lohka *et al.*, 1988). Díky svým účinkům byl nazván Maturation Promotion Factor. Později byl detekován i v somatických buňkách při mitotickém dělení. Byl přejmenován na M-Phase Promoting Factor (Nurse, 1990).

MPF je heterodimerní komplex skládající se z katalytické a regulační podjednotky. Katalytickou podjednotkou je p34^{cdc2} (Serin/Threonin Kinase), označována též jako Cdk1 (Cyclin Dependent Kinase 1). Hladina katalytické podjednotky je více méně konstantní. Významným regulačním mechanismem katalytické podjednotky MPF je CAK (Cdc-Activated Kinase) (Clarke, 1995). Regulační podjednotkou je cyclin B, jehož hladina kolísá. Jeho syntéza začíná během interfáze, maximální hladiny dosahuje v metafázi a k jeho degradaci dochází před vstupem do anafáze (Dunphy *et al.*, 1988, Sun *et* Nagai, 2003). Prostřednictvím degradace cyklinu B – fosfatázy defosforylují své substráty, a tím dochází k obnovení jaderné membrány a dekonenzaci chromatinu. Rodina savčích cyklinů B se skládá ze dvou členů (B1 a B2), ale u obojživelníků se rodina cyklinů B skládá z pěti členů (B1, B2, B3, B4 a B5). U žab *Xenopus laevis* je tedy regulační podjednotkou také cyklin B2 ale z B5 rodiny (Hochegger *et al.*, 2001).

Cílovými molekulami MPF jsou proteiny jaderné membrány a proteinové komplexy účastníci se svinutí DNA. Cdk1 fosforyluje proteiny jaderné laminy vedoucí k rozpadu jaderné membrány (Jones, 2004).

Během růstové fáze dochází v oocyty k hromadění neaktivního komplexu pre-MPF. Ale po vytvoření *antra folliculli* se pre-MPF nehromadí, rozvíjí se pouze schopnost aktivace tohoto komplexu (Masui *et* Markert, 1971). MPF fosforyluje substráty, které se účastní GVBD,

kondenzace chromozómů a tvorby dělicího vřeténka (Kishimoto, 1994). Kompetentní oocyt je schopen aktivovat a dále regulovat MPF (Jones, 2004), u nekompetentních a částečně kompetentních oocytů se MPF vyskytuje v neaktivní formě (Sun *et* Nagai, 2003). Injikování p34^{cdc2} do nekompetentního myšího oocytu zvýšilo intracelulární hladinu MPF, avšak nevedlo k rozpadu zárodečného váčku (de Vantéry *et al.*, 1997). Inhibice MPF blokuje GVBD (Wu *et al.*, 2002).

Pro aktivaci MPF je kromě spojení obou podjednotek zapotřebí i aktivita různých kináz a fosfatáz (Stojkovic *et al.*, 1999). MPF je regulován pomocí kináz procesem fosforylace a defosforylace, například pro aktivaci Cdk1 v MPF pomocí snížené aktivity Wee1/Myt1 kinázy, jež fosforyluje Cdk1, a tím inhibuje tyrozin 15 (Myt1 – fosforylace Cdc2 na treonin 14/tyrozin 15) a threonin 14 (u žab *Xenopus laevis* Wee1 A a B – fosforylace Cdc2 na tyrozin 15) a následuje zvýšená aktivita cdc25 fosfatázy, jež defosforyluje Cdk1 na stejném místě (Jones, 2004, Karaiskou *et al.*, 1998, 2004, Gaffré *et al.*, 2011). Kináza Myt1 je přítomna i před začátkem zrání, na rozdíl od kinázy Wee1, která se syntetizuje až během procesu zrání. Základní princip aktivace MPF spočívá ve spojení obou proteinových podjednotek, kdy vzniká neaktivní komplex – pre-MPF a ten je pak aktivován (Gautier *et* Maller, 1988). Aktivní MPF má charakter kinázy, jejíž aktivita je nutná pro správný průběh meiotického zrání. MPF aktivita narůstá před dobou rozpadu zárodečného váčku, fosforylací proteinů jaderné membrány, kondenzace chromozómů a vzniku dělicího vřeténka (Kishimoto, 1994, Stojkovic *et al.*, 1999). Aktivní MPF má důležitou funkci při iniciaci segregace chromozómů (King *et al.*, 1996). Snížená aktivita MPF dovolí přechod z anafáze I do metafáze I, kdy se aktivita MPF zvyšuje na svou nejvyšší hladinu. Následná inaktivace MPF prostřednictvím degradace cyklinu B nastává v době přechodu z metafáze II do anafáze II a telofáze II (Sun *et* Nagai, 2003). Při partenogenetické aktivaci a oplodnění dochází k poklesu aktivity MPF (Hashimoto *et* Kishimoto, 1988, Fulka *et al.*, 1992).

Nízké hladiny MPF u žab *Xenopus laevis* i savčích oocytů jsou předpokladem zastavení v profázi I a vysoké hladiny MPF pomáhají udržení v metafázi II před oddělením sesterských chromatid (Sagata, 1996, Bodart *et al.*, 2002b).

K inaktivaci MPF dochází u obratlovců procesem ubikvitinace faktorem APC, a to konkrétně jeho regulační podjednotky cyklinu B a jeho následnou degradací (Murray *et al.*, 1989, Peters, 1994). MPF je nezbytná pro aktivaci procesu ubikvitinace, jehož mechanismus je zatím neznámý, ale MPF zřejmě fosforyluje cdc27 z APC (Patra *et* Dunphy, 1998, Vorlauffer *et* Peters, 1998). Fosforylace APC umožňuje navázat cdc20 k aktivaci APC, jehož podjednotky musí být fosforylovány pro vazebnou reakci (Kramer *et al.*, 2000, Rudner *et* Murray, 2000).

Nejnovější studie prokázaly další složku komplexu MPF, Greatwall kinase (Hara *et al.*, 2012).

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

MAP kinázy jsou protein kinázy fosforylující svůj substrát na tyrosinových a serin/treoninových zbytcích. MAPK je začleněna do dynamiky a tvorby mikrotubulů. MAPK přenáší signál z cytoplazmy do jádra pro znovuzahájení meiózy (Stojkovic *et al.*, 1999).

Původně byly kinázy označovány jako MAPK, protože mimo jiné fosforylují MAP (proteiny asociované mikrotubuly) (Whitaker, 1996). Davis (2000) řadí všechny MAPK do jedné skupiny a rozděluje rodinu MAPK na tři podrodiny: ERK (-1, -2, -3, -4 - Extracellular Signal-Regulated Kinase), JNK (-1, -2, -3 - c-Jun Amino Terminal Kinase) a p38 MAPK (protein o molekulové hmotnosti 38 kDa – $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$). Rodina MAPK je dělena do podrodin dle homologie v sekvenci aminokyselin, dále podle jejich mechanismu regulace a dále dle senzitivity k aktivaci různými kinázami. Rodina MAPK je regulována extracelulárními podněty, například hormony nebo růstovými faktory (Kishimoto, 2003).

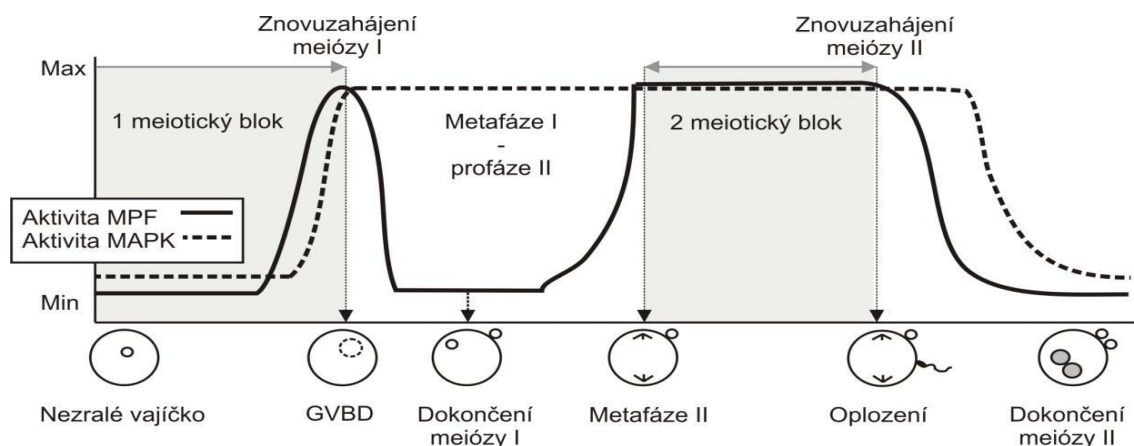
U savců byla v oocytech nalezena ERK1 (p44) a ERK2 (p42). U žab *Xenopus laevis* pouze ERK2 (p42) spolu s JNK a p38 MAPK (Mood *et al.*, 2004). Neaktivní forma MAPK se u meioticky nekompetentních oocytů hromadí podobně jako MPF (Sun *et al.*, 2003). Během meiotického zrání oocytu se uplatňuje Mos/MEK1/MAPK/p90rsk dráha, která je propojena s mechanismy působení například MPF, PKA, PKC a CaMKII (Fan *et al.*, 2004). MAPK může fosforylovat inhibiční kinázy fosforylující MPF a také proteiny jaderné laminy, a tím bránit znovuoobnovení jaderné membrány. Aktivita MAPK je během meiotického zrání konstantní na rozdíl od MPF – obr. č. 2, její aktivita klesá po aktivaci (Inoue *et al.*, 1995). K aktivaci MAPK dochází současně s MPF v době rozpadu zárodečného váčku (Goudet *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 2001b). U prasat se názory na aktivitu MAPK liší, jedni popisují současnou aktivaci spolu s MPF (Motlík *et al.*, 1998) a jiné studie uvádí, že nejprve je aktivován MPF a pak MAPK (Inoue *et al.*, 1995), ale nejvíce je zastoupena teorie, že nejdříve je aktivována MAPK a až pak MPF (Wehrend *et al.*, 2001, Sugiura *et al.*, 2005). U prasečích oocytů hraje p90rsk a MAPK důležitou roli v zastavení meiózy (Stojkovic *et al.*, 1999). Aktivní MAPK urychluje průběh rozpadu zárodečného váčku (Kosako *et al.*, 1994, Inoue *et al.*, 1998, Josefsberg *et al.*, 2003). Rozpad zárodečného váčku však probíhá u prasat i v případě, že je aktivita MAPK blokována prostřednictvím inhibitoru MEK1 (MAPKK - Mitogen Activated Protein Kinase Kinase) (Tong *et al.*, 2003). MEK1 je aktivována přes kinázu Raf1 či přes kinázu Mos, která je produktem proukogenu Mos (Matsuda *et al.*, 1992).

MAPK je aktivována pomocí proteinu Mos, což je aktivní katalytický komponent CSF a Plk1 (Pololike Kinase 1) (Sun *et al.*, 2003). Mos = Serin/Threonine Protein Kinase, nacházející se na konci této kaskády, se účastní řízení meiotického zrání oocytů v interakci s MPF (Fan *et al.*, 2004). Dále se MAPK účastní regulace velikosti oocytu a vydělení prvního pólového tělíska (Choi *et al.*, 1996).

MAPK (ERK2) je v oocytech *Xenopus laevis* aktivována růstovými faktory, je nezávislá na transkripční aktivitě oocytu a hraje důležitou roli v kontrole meiotického dělení. Aktivita MAPK není nezbytná pro vstup do MI, ale aktivita MAPK vzrůstá těsně před prvním meiotickým dělením a poté zůstává stabilní (Fisher *et al.*, 1999, Bodart *et al.*, 2002a). MAPK je aktivována ve stejný čas jako MPF (Ferrell *et al.*, 1991). Přesto ale aktivita MAPK vyžaduje reaktivaci MPF a potlačení replikace DNA mezi MI a MII (Furuno *et al.*, 1994). Injikování MEK1 (MAPK kinázy) do oocytů *Xenopus laevis* indukuje znovuzahájení meiózy (Gotoh *et al.*, 1995, Huang *et al.*, 1995, Dupré *et al.*, 2011). Mechanismus, který indukuje aktivaci meiózy MAPK zahrnuje Myt1-inhibiči kinázou p90^{rsk}. Bylo prokázáno, že efektor p90^{rsk} má vliv na fosforylaci a aktivaci MAPK a je schopen vázat, fosforylovat a inaktivovat Myt1-kinázu (Palmer *et al.*, 1998, Gavin *et al.*, 1999).

Myt1 je členem Wee1 rodiny inhibičních kináz. Wee1 je přítomna pouze u eukaryot, načež Myt1 u všech živočichů (Coleman *et al.*, 1994). Wee1 je jadernou kinázou fosforylující cdc2 na tyrozin 15, zatímco Myt1 má duální fosforylační roli threonin 14/tyrozin 15 (Liu *et al.*, 1997). U *Xenopus laevis* byly objeveny dvě formy Wee1A a Wee1B. Wee1A byl detekována po prvním meiotickém dělení, zatímco Wee1B byla detekována po vytvoření gastruly (Nakajo *et al.*, 2000, Okamoto *et al.*, 2002, Gaffré *et al.*, 2011).

Obrázek č. 2: Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání savčích oocytů (převzato z Fan *et al.*, 2004).



APC (Anaphase-Promoting Complex)

APC je cyklin dependentní kináza (Cdk) katalyzující přenos fosfátové skupiny z ATP na aminokyselinové postranní řetězce cílového proteinu. Řízení meiózy je závislé především na změnách koncentrace cyklinů prostřednictvím ubikvitin dependentní proteolýzy. APC byl poprvé extrahován z oocytů žaby *Xenopus laevis* jako multipodjednotkový komplex známý jako ubikvitin-protein ligáza (King *et al.*, 1995). APC jako ubikvitin ligáza má významnou úlohu v rozeznání cyklinů předurčených k degradaci (Maller *et Krebs*, 1980, Hagting *et al.*, 1999).

APC je u obratlovců zodpovědný za snížení hladiny MPF v metafázi (King *et al.*, 1996). Aktivace APC souvisí s oscilací hladin Ca^{2+} , s vyloučením kortikálních granul a je jedním z faktorů prevence proti polyspermii, podílí se na prolomení druhého meiotického bloku a také na dokončení meiózy a zformování prvojádra (Jones, 2005).

Aktivita APC je v oocytech *Xenopus laevis* nezbytná pro přechod z metafáze II do anafáze II na rozdíl od prvního meiotického dělení (Taieb *et al.*, 2001). Jeho činnost je nutná pro proteolýzu cyklinu B a inaktivaci MPF při přechodu z metafáze do anafáze (Murray *et al.*, 1989, Peters, 1994).

CSF (Cytostatic Factor)

CSF je skupina molekul odpovědných za zastavení meiotického zrání ve stádiu metafáze II. CSF se podílí na udržení vysoké hladiny MPF až do oplození nebo partenogenetické aktivace oocytu. Kvůli nedostatečnému množství CSF v cytoplasmě po fertilizaci dochází až k vymizení aktivity CSF. CSF byl nalezen při studiích na oocytech žab *Rana pipiens*, kdy extrakty cytoplazmy oocytů ve fázi MII byly injikovány do jedné blastomery dvoubuněčného embrya, injikovaná blastomera byla zablokována, zatímco druhá pokračovala ve svém vývoji (Masui *et Markert*, 1971). CSF byl nalezen také u myších oocytů, což vedlo k závěru, že CSF je univerzálním faktorem meiotického bloku u obratlovců (Balakier *et Czolowska*, 1977).

Působení CSF přes Mos – MAPK dráhu (Mos/MEK1/MAPK/p90rsk) (Furuno *et al.*, 1994, Gross *et al.*, 2000, Inoue *et al.*, 2007, Wu *et Kornbluth*, 2008). Faktory CSF hrají důležitou roli při regulaci meiotického zrání u oocytů *Xenopus laevis* a při GVBD (Sagata *et al.*, 1989, Qian *et al.*, 2001). Cdc25 a Myt1 fosforylují CDK1 a přispívají tak k inhibici aktivity MPF (Lorca *et al.*, 1992, Fesquet *et al.*, 1993, Poon *et al.*, 1993, Solomon, 1993, Müller *et al.*, 1995, Karaiskou *et al.*, 1998) a pravděpodobně i k vylučování MPF do cytoplazmy (Wells *et al.*, 1999). Aktivita CSF u oocytů *Xenopus laevis* vymizí po 30-40 minutách, zatímco aktivita MPF klesá již po pár minutách, 5-10 min po oplození (Watanabe *et al.*, 1991). To koreluje s rozkladem proteinu Mos a inaktivací MAPK. Aktivita CSF brání inaktivaci MPF.

Převážnou část CSF tvoří kináza Mos, která je schopná přes kinázu MEK1, její fosforylací, aktivovat MAPK dráhy a dále Mos/MAPK kinázovou drahou (Mos/MEK) slouží k stabilizaci a aktivaci MPF (Stojkovic *et al.*, 1999, Dupré *et al.*, 2011). CSF v cytoplazmě ovulovaných oocytů podporuje meiotický blok stabilizací MPF (Murray, 2004). CSF má inhibiční vliv na APC (SAC, Spindle Assembly Checkpoint), a tím blokuje přechod z metafáze do anafáze (Kishimoto, 2003). Po oplození či partenogenetické aktivaci oocytu se zvyšují hladiny Ca^{2+} , které mají inhibiční vliv na CSF, což vede k nástupu APC, jež se naváže na cyclin B a navodí jeho degradaci, po níž následuje pokles hladiny MPF a stává se tak stimulem pro dokončení druhého meiotického dělení (Yamano *et al.*, 2004). Inaktivace MPF a CSF prostřednictvím CaMKII, jež je aktivována uvolněním a zvýšením intracelulární hladiny iontů vápníku při vstupu spermie do oocytu (Lorca *et al.*, 1993).

Mos (MAPKKK) je transformační gen objevený v roce 1980 jako Moloney murine sarcoma virus. Mikroinjekce Mos-mRNA do vajíček *Xenopus laevis* inhibuje proteolýzu cyklinu B a indukuje zastavení zrání v MII (Sagata *et al.*, 1989). Injekce Cdk1 blokuje akumulaci Mos, ale nemá vliv na jeho syntézu, která následuje po hormonální stimulaci progesteronem. Mos má poločas rozpadu 30 minut (Nebreda *et al.*, 1995). Exprese Mos vzroste v době GVBD a klesá po MII. Aktivita Mos se uplatní pouze po aktivaci MPF a při znovuzahájení meiózy musí být MPF stabilizován navzdory své počáteční translační aktivitě.

Dalším efektozem účastnícím se aktivity CSF je **p90rsk** (ribosomal S6 kinase). p90rsk je schopen u oocytů *Xenopus laevis* zadržet blastomeru v MII při neaktivní MAPK (Gross *et al.*, 1999). Efektor p90rsk je tedy zapojen do regulace zastavení meiózy během meiotického bloku, protože oocyty *Xenopus laevis* ztrácejí schopnost podstoupit meiotické zastavení jako odpovědi na Mos-ubikvitin dependentní mechanismy (Bhatt *et al.*, 1999).

Cdk2 se účastní aktivity CSF při zastavení během prvního a druhého meiotického bloku tím, že u oocytů *Xenopus laevis* tento blok částečně chrání (Gabrielli *et al.*, 1993, Furuno *et al.*, 1997).

Emi2 (Erp1) je přímý inhibitor komplexu APC/C, u žab *Xenopus laevis* je označován jako E3 ubikvitin ligáza (Schmidt *et al.*, 2005, Peters, 2006), jehož aktivita je kontrolována Mos-MAPK drahou (Wu *et al.*, 2008). U žab *Xenopus laevis* je Emi2 nazýván XErp1 nebo Erp1 (Inoue *et al.*, 2007, Ohe *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2008). Cdk1 fosforyluje a inaktivuje Emi2 (Wu *et al.*, 2007). Emi2 je spolu s Mos syntetizován během meiotického zrání a také degradován po oplodnění, avšak Emi2 je krátce po oplodnění opět resyntetizován (Sagata *et al.*, 1989, Schmidt *et al.*, 2005). Emi2 fosforyluje CaMKII (Liu *et al.*, 2005, Rauh *et al.*, 2005). Rsk přímo fosforyluje Emi2 (Inoue *et al.*, 2007, Nishiyama *et al.*, 2007a). Stabilizace Emi2 během MII fosforylací z Mos/MEK/MAPK/Rsk dráhy (Sagata *et al.*, 1989, Inoue *et al.*, 2007,

Nishiyama *et al.*, 2007a). Emi2 má silnou cytotatickou aktivitu pouze tehdy, když Mos-MAPK dráha je činná. Je hlavní drahou vedoucí k zastavení CSF. CSF se skládá z Mos, p90rsk, Cdk2 a efektorového proteinu Emi2, jenž váže a inhibuje komplex APC/C (Inoue *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2010).

Vápenaté ionty Ca^{2+}

Ca^{2+} hraje roli intracelulárního přenašeče signálů v organismu. Účastní se regulace různých procesů během vývoje oocyty, při meiotickém zrání a následně i po oplození (Miyazaki, 1991, Yanagimachi, 1994). Střídají se vysoké a nízké koncentrace vápenatých iontů, dochází k oscilaci intracelulárních hladin vápenatých kationtů. Depozita intracelulárního vápníku v prasečích oocytech jsou především v endoplazmatickém retikulu, v mitochondriích a pak v dalších depozitech jako je karyoplazma, vakuoly, povrch lipidových granul a cytoplazma (Mehlmann *et al.*, 1995, Petr *et al.*, 2001). Ca^{2+} ionty jsou do cytoplazmy uvolňovány otevřenými Ca^{2+} kanály. V prasečím oocyty jsou využívány k otevření těchto kanálů dvě hlavní receptorové dráhy využívající buď inositol-1,4,5-trifosfátové receptory (IP3) receptory nebo ryanodinové receptory (RyR), které reagují na oscilaci hladin iontů Ca^{2+} během meiotického zrání, a to membránovými kanály dvojího typu: membránovými kanály regulovanými změnou elektrického potenciálu na membráně (VOCC) nebo regulovanými receptorem (ROCC) (Clapham, 1995, Macháty *et al.*, 1997a, Petr *et al.*, 2002). Dále transport Ca^{2+} z cytoplazmy do zásobáren uvnitř oocyty probíhá také pomocí tzv. SERCA pump (Berridge, 1995).

Intracelulárním receptorovým proteinem pro vápenaté kationty je kalmodulin (CaM), jenž reguluje mnoho procesů spojených s vápníkovou signalizací. Kalmodulin obsahuje 4 vazebná místa pro Ca^{2+} . Kalmodulin má schopnost aktivovat Ca^{2+} /Calmodulin Dependent Kinase CaMKII, jež je zapojena do regulace průběhu meiotického dělení a vytvoření dělicího vřeténka. Schopnost regulace CaMKII je zřejmě zprostředkována MPF a MAPK v průběhu zrání a aktivace prasečích oocytů (Kovář, 2000, Fan *et al.*, 2003). Aktivita CaMKII závisí na frekvenci oscilace hladin vápníku. CaMKII u žab *Xenopus laevis* fosforyluje MPF (Lorca *et al.*, 1993).

Po oplození dochází ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , a tím dochází k aktivaci oocyty, iniciaci embryonálního vývoje prostřednictvím uvolnění druhého meiotického bloku a nastavení bloku proti polyspermii, vzniku prvojádra a uvolnění 2. pólového tělíska (Steinhardt *et al.*, 1974, Hollinger *et Schuetz*, 1976, Busa *et Nuccitelli*, 1985, Lorca *et al.*, 1993, Stricker, 1999, El-Jouni *et al.*, 2005). Aktivní forma CaMKII vede k dokončení meiózy indukcí přechodu z MII do AII, vydělením druhého pólového tělíska a vstupu do mitózy tím, že inaktivuje MPF a CSF (Lorca *et al.*, 1993, Tunquist *et Maller*, 2003). CaMKII zprostředkovává účinky vápníku při oplození, zatímco inhibitory CaMKII brání partenogenetické aktivaci oocytů *Xenopus laevis*

(Lorca *et al.*, 1993, Whitaker, 2006) a způsobují ve vajíčcích *Xenopus laevis* depolarizaci membrány, sloužící k blokování případné polyspermie, dále kortikální smrštění či exocytózu kortikálních granul a pseudoštěpení (pseudocleavage) (Busa *et Nuccitelli*, 1985). Dále receptory pro IP3 a IP3 spouští přechodné uvolnění Ca^{2+} , které je v podstatě k nerozeznání od situace, jež doprovází oplodnění (Busa *et Nuccitelli*, 1985). Ca^{2+} aktivuje kinázu CaMKII, která inaktivuje CSF a umožňuje aktivaci APC a proces ubikvitinace, po němž se buněčný cyklus vrací do interfáze (Lorca *et al.*, 1993).

Ubikvitin protein fosfatáza kalcineurin je vápníkem/kalmodulinem aktivovaný protein. Kalcineurin je přechodně aktivován vzrůstem hladiny Ca^{2+} , přidáním Ca^{2+} dojde ke zvýšení aktivity kalcineurinu v čase 2-4 min po přidání (Nishiyama *et al.*, 2007b). Kalcineurin iniciuje výstup z MII. Aktivita fosfatázy kalcineurinu vymizí při vstupu do mitotického dělení a znovu se objeví na konci mitózy. Inhibice kalcineurinu je důležitá, aby buňky mohly vstoupit do mitotického dělení a naopak, když je aktivace kalcineurinu vyžadována pro včasný návrat do interfáze. Kalcineurin je nutný k prolomení bloku buněčného cyklu prostřednictvím Mos-MAPK dráhy (Sagata *et al.*, 1989, Mochida *et Hunt*, 2007, Nishiyama *et al.*, 2007b).

Gasotransmitery

V organismu působí jako plynné přenašeče oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a sirovodík (H_2S) (Wang, 2002, Li *et al.*, 2009). Jsou to signální molekuly, které difundují skrz buněčné membrány. Gasotransmitery jsou v organismu endogenně syntetizovány, netvoří se jejich zásoby a k jejich syntéze dochází jen v případě potřeby. Všechny tři mediátory v organismu spolupracují (Pae *et al.*, 2009).

Většina endogenně produkovaného množství oxidu uhelnatého vzniká v reakcích katalyzovaných hemoxygenázou, jež má tři izoformy HO-1, HO-2 a HO-3. Úloha prvních dvou izoform hemoxygenázy je jasná, podílí se na oxidaci hemu a produkci oxidu uhelnatého a biliverdinu. Biologická funkce poslední izoformy zůstává zatím nejasná (Wu *et Wang*, 2005). Při navázání se na hemoglobin, CO vytěsňuje kyslík za vzniku karboxyhemoglobinu, který má 250x vyšší afinitu k navázání se, než kyslík. Kromě hemoglobinu se oxid uhelnatý váže i na myoglobin a cytochromy. Navázání CO na cytochrom P-450 nebo cytochrom c-oxidázu má inhibiční efekt na jejich enzymatickou aktivitu (Kim *et al.*, 2006).

Funkce gasotransmiterů sirovodíku a oxidu dusnatého v organismu jsou podrobně rozpracovány v kapitolách 1.3 a 1.4.

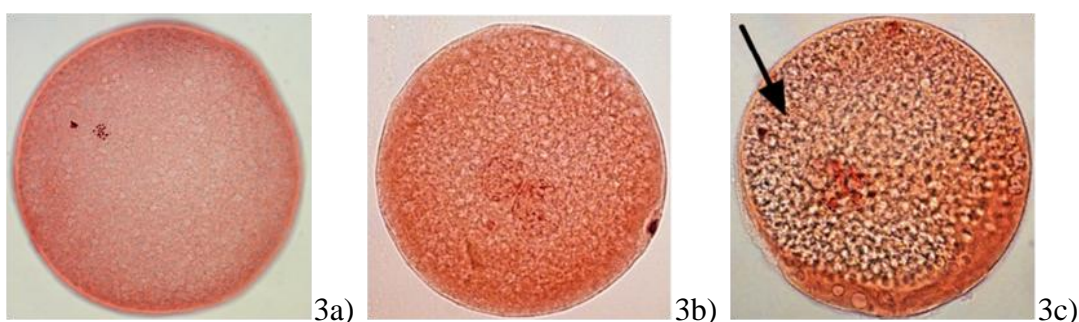
1.1.4 Stárnutí oocytů v podmínkách *in vitro*

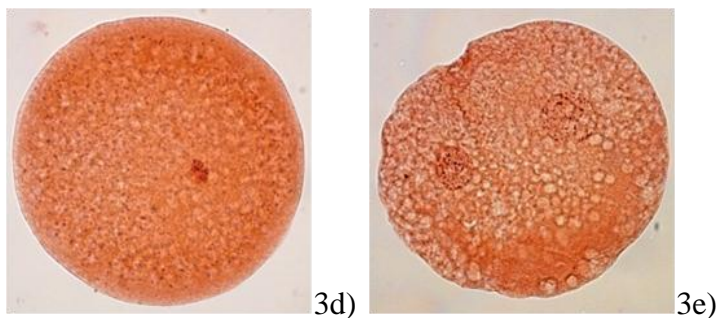
Zlepšení kvality *in vitro* zrajících bovinních oocytů můžeme částečně dosáhnout prodlouženou kultivací v *in vitro* podmínkách (Chian *et al.*, 1992, Pavlok *et al.*, 1997), čehož je využíváno pro *in vitro* fertilizaci (Chian *et al.*, 1992, Pavlok *et al.*, 1997), pro klonování (Iwamoto *et al.*, 2005) nebo pro partenogenetickou aktivaci oocytů a tvorbu partenogeneticky aktivovaných embryí (Jolliff *et Prather*, 1997). To však s sebou přináší svá rizika, neboť při prodloužené kultivaci posléze u oocytů dochází k iniciaci procesu, označovaném jako stárnutí. Během stárnutí oocytů dochází k mnoha morfologickým a funkčním změnám, které výrazně snižují životaschopnost a kvalitu oocytů.

U savčích oocytů za fyziologických podmínek dochází k oplození brzy po ovulaci (Ducibella, 1998). Optimální doba pro oplození savčích oocytů je 12–24 hodin po ovulaci (Fissore *et al.*, 2002). Důvodem je krátká životnost oocytů doprovázená snižující se vývojovou kompetencí s rostoucím časem po ovulaci (Ducibella, 1998). V případě, že oocyty nejsou včas oplodněny, prochází procesem zvaným stárnutí - v *in vivo* podmínkách neoplozené oocyty setrvávají ve vejcovodu, kde zanikají a v *in vitro* podmínkách jsou oocyty podrobeny prodloužené kultivaci v médiu (Kikuchi *et al.*, 2000). Zygoty získané ze stárnoucích oocytů posléze podléhají programované smrti (apoptóze) (Fissore *et al.*, 2002, Tarín *et al.*, 2002).

Stárnutí je komplexní proces, který může u oocytů vyústit ve spontánní partenogenetickou aktivaci (obr. č. 3b), fragmentaci (obr. č. 3c) či lýzu oocytů (obr. č. 3d) (Kikuchi *et al.*, 1995, Petrová *et al.*, 2004, Miao *et al.*, 2009).

Obrázek č. 3: Morfologické změny prasečích oocytů v průběhu stárnutí (převzato z Petrová *et al.*, 2009).





3a) oocyt ve stádiu metafáze II (MII), 3b) spontánně partenogeneticky aktivovaný oocyt, 3c) fragmentovaný oocyt (šipka ukazuje na apoptotický váček), 3d) lytický oocyt, 3e) spontánně partenogeneticky aktivované embryo. Barveno orceinem, zvětšeno 400x.

Změny morfologie a biochemické změny během stárnutí oocytu

Během stárnutí probíhají uvnitř oocytů mnohé morfologické a biochemické změny (Kim *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 2002), které zahrnují i změny v aktivitě enzymů (Lawrence *et al.*, 1997, Kikuchi *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 2003).

Při stárnutí dochází k fragmentaci oocytu, která je indikátorem apoptotického zániku oocytů (Fissore *et al.*, 2002). Také dochází ke změnám polohy chromozómů či abnormalitám dělicího vřeténka, což vede k výrazným aneuploidiím (Webb *et al.*, 1986, Kim *et al.*, 1996, Steuerwald *et al.*, 2005). Během procesu stárnutí dochází k částečné exocytóze kortikálních granul a dokonce i ke změnám vlastností *zony pellucidy* (Xu *et al.*, 1997, Miao *et al.*, 2009), které se nejčastěji projevují tzv. tvrdnutím *zony pellucidy* (*zona pellucida* hardening) (Xu *et al.*, 1997, Miao *et al.*, 2009). Prodloužená kultivace oocytů má vliv i na pokles membránového potenciálu vnější mitochondriální membrány (Wilding *et al.*, 2001), což může vést k iniciaci apoptotického zániku oocytů. Často je během stárnutí oocytů pozorováno bobtnání a případné shlukování mitochondrií (Ma *et al.*, 2005). U somatických buněk může být výsledkem tohoto bobtnání až prasknutí vnější mitochondriální membrány a uvolnění apoptotických faktorů a cytochromu c z dýchacího řetězce mitochondrií do cytoplazmy (Wang, 2001). V *in vivo* podmínkách se apoptóza projevuje při spontánním zániku oocytů ve vaječníku (Johnson *et al.*, 2004).

Biochemické změny během stárnutí se týkají hlavně aktivity kináz, fosfatáz a proteosyntetické aktivity oocytu. Mezi významné změny patří i pokles citlivosti k aktivačním stimulům (Kubiak, 1989) a pokles aktivity významných faktorů důležitých pro udržení druhého meiotického bloku v MII (Xu *et al.*, 1997, Abbott *et al.*, 1998, Kikuchi *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2005). Dochází k poklesu MPF a MAPK, zdá se, že k poklesu MAPK nedochází současně s MPF, ale opožděně, zřejmě z důvodu klíčové role při vydělení druhého pólového tělíska v telofázi II (Fan *et al.*, 2004). Snížená hladina MPF byla zjištěna u stárnoucích prasečích oocytů (Kikuchi *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 2005), kde pokles hladiny aktivního MPF souvisel i

s poklesem aktivity MAPK (Xu *et al.*, 1997, Kikuchi *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2005), což je jednou z hlavních příčin spontánní partenogenetické aktivace a zvýšení fragmentace u oocytů vystavených stárnutí (Kikuchi *et al.*, 2000, Ma *et al.*, 2005). Následek poklesu MPF a MAPK je také snížení exprese anti-apoptického faktoru Bcl-2 (B-cell lymphoma-2). Na programovanou buněčnou smrt má mimo jiné vliv aktivace pro-apoptických faktorů z rodiny Bcl-2 (Bax), dále kaspáz a dalších důležitých proteáz (Adams *et Cory*, 1998). Bax z rodiny Bcl-2 je lokalizován na vnější mitochondriální membráně, jeho přítomnost byla také prokázána i na jaderné membráně a na endoplasmatickém retikulu. Za fyziologických podmínek se podílí na udržení vnitřní homeostázy, hladiny vápenatých iontů v cytoplazmě, membránového potenciálu mitochondrie a tím se také podílí i na přežití buněk (Thomenius *et Distelhorst*, 2003). Naproti tomu antiapoptický Bcl-2 zřejmě chrání oocyt tak, že zablokuje uvolnění cytochromu c z mitochondrií, a tím blokuje i iniciaci programované buněčné smrti (apoptózy) (Fissore *et al.*, 2002, Wang, 2001, Ma *et al.*, 2005).

Webb *et al.* (1986) ve svých studiích prokázali, že morfologické změny během stárnutí oocytů jsou obdobné jak v *in vivo* tak v *in vitro* podmínkách. Avšak Abbott *et al.* (1998) sledovali, že prodloužená kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách zpomaluje stárnutí, oproti stárnutí v *in vivo* podmínkách.

Stárnoucí oocyty prasete podléhají spontánní partenogenetické aktivaci, fragmentaci nebo lýze (obr. č. 3 a-e; Petrová *et al.*, 2004, 2005). Podstata těchto procesů zatím není zcela známa. Oocyty podléhají programované buněčné smrti apoptózou, jejímž projevem je fragmentace oocytu (Fujino *et al.*, 1996, Tarín *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2004).

Přežití oocytů v *in vivo* podmínkách zajišťují růstové hormony, FSH, LH, progesteron (PG), estradiol, insulin, aktivin a interleukin 1-beta (Markström *et al.*, 2002).

Programovaná buněčná smrt – apoptóza

Programovaná buněčná smrt je důležitou součástí regulačních mechanismů u všech organismů. Hraje nezastupitelnou roli při regulaci počtu buněk během jejich vývoje a jejich obnově, při udržení rovnováhy vnitřního prostředí v organismu a v imunitní odpovědi na různé podněty (Thompson, 1995). Apoptóza je procesem energeticky poměrně náročným a vede k fagocytóze zbytku buňky ostatními buňkami (Vaux, 1993). Termín apoptóza poprvé použili Kerr *et al.* (1972). Apoptóza je důležitým typem programované buněčné smrti zahrnujícím geneticky danou determinaci buněk (Debnath *et al.*, 2005).

Morfologické a biochemické změny při apoptóze

Během programované buněčné smrti dochází k mnoha změnám, zejména je patrné smršťování buňky i buněčného jádra. Dochází tak k zahušťování cytoplazmy a shlukování organel. V jádře díky tomu dochází ke kondenzaci a rozpadu chromatinu. Buňka vyděluje tzv. apoptotická tělíška obsahující organely, cytoplazmu a i fragmenty DNA, jež jsou pohlcena a degradována buňkami se schopností fagocytózy (Kerr *et al.*, 1972). Na rozdíl od nekrózy, nedochází během apoptózy k zánětlivé reakci, protože nedochází k vyelití obsahu buňky do okolního prostředí (Kurosaka *et al.*, 2003).

Biochemické změny při apoptóze zahrnují štěpení proteinů, rozpad DNA a aktivaci řady signálních kaskád (Hengartner, 2000). Apoptóza je spouštěna různými signály, například nedostatečným působením růstových faktorů, zvýšenou hladinou interleukinu-2, poškozením DNA, virovou infekcí, hypoxií, tepelným šokem a mnohými dalšími podněty (Xia *et al.*, 1995). Existují dvě základní iniciační dráhy apoptózy: vnější (death receptorová) a vnitřní (mitochondriální) dráha (Green *et al.*, 1998). Ve vnější dráze apoptózy dochází k interakcím mezi death ligandy a death receptory – například z rodiny receptorů TNF (Tumor Necrosis Factor) (Locksley *et al.*, 2001). Obsahují extracelulární doménu bohatou na cystein, intracelulární doménu (death doménu) a v centru apoptózové regulátory (Ashkenazi *et al.*, 1998). Ve vnitřní mitochondriální dráze dochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrií například prostřednictvím členů rodiny Bcl-2 (Adams *et al.*, 1998). Dále může dojít k uvolnění endonukleázy G z mitochondrií, jež se účastní apoptotické degradace DNA (Li *et al.*, 2001) či AIF (Apoptosis-Inducing Factor), jež se účastní kondenzace chromatinu a fragmentace DNA (Susin *et al.*, 1999). V organismu dochází k vzájemnému propojení death receptorové a mitochondriální dráhy apoptózy přes mnohé proteiny, například přes Bid, jež je substrátem kaspázy-8 a který také pochází z rodiny proteinů Bcl-2. Bcl-2 proteiny kontrolují a regulují apoptotické děje (Cory *et al.*, 2002). Tato rodina obsahuje 25 genů, anti- i pro-apoptotické faktory. Pro-apoptotickými geny jsou například Bax, Bak, Bid, Bim, Bad a Blk. Anti-apoptotickými geny jsou například Bcl-2, Bcl-xl a Bag. Jsou rozhodujícími pro skutečnost, jestli buňka podlehne apoptóze či ne (Schuler *et al.*, 2001). Pro apoptózu mohou být spouštěcím a regulačním stimulem také kaspázy. Kaspázy jsou proteázy katalyzující proteolýzu (Adams *et al.*, 1998). V buňkách jsou přítomny ve formě inaktivního proenzymu, aktivovaného jinými proteázami či autokatalytickým štěpením. V současné době známe 14 druhů kaspáz: efektorové (-3, -6, -7), inflamační (-1, -4) a iniciační kaspázy (-2, -8, -9, -10) (Cohen, 1997).

Během stárnutí oocytů dochází k navýšení hladin volných vápenatých iontů v cytoplazmě, a tím k narušení vápníkové signalizace (Takahashi *et al.*, 2000, Takahashi *et*

Mendelsohn, 2003). Dochází tedy k výraznému narušení homeostázy v oocytu a může to vést k fragmentaci a apoptóze oocytů (Fissore *et al.*, 2002). U myších oocytů byla zjištěna fragmentace DNA i cytoplazmy (Takase *et al.*, 1995, Fujino *et al.*, 1996, Perez *et al.*, 1997, Perez *et al.*, 1999). Podobně jako po oplození oocytu spermií, kdy dochází k oscilaci hladin vápenatých kationtů, tento proces je závislý na syntéze inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃) a 1,2-diacylglycerolu (DAG) a následném otevření Ca²⁺ kanálů vyvolaném IP₃ (Igarashi *et al.*, 2007, Jones, 2007) a uvolněním vápenatých iontů z vnitrobuněčných depozit do cytoplazmy (Kovář, 2000). Bylo prokázáno, že dalším z faktorů, majícím vliv na programovanou buněčnou smrt, jsou i chemoterapeutika přítomná v kultivačním médiu (Perez *et al.*, 1997).

1.1.5 Aktivace oocytu vs. partenogenetická aktivace oocytu

Během aktivace oocytu probíhá velké množství biochemických a morfologických procesů, některé z nich trvají několik vteřin či minut při interakci spermie s plazmatickou membránou oocytu a jiné trvají až několik hodin (Yanagimachi, 1994). Penetrace oocytu spermií u prasat byla pozorována 3 h po inseminaci (Ding *et al.*, 1992). Průnik spermie je schopen vyvolat nárůst intracelulární hladiny vápníku prostřednictvím fosfolipázy C-δ (PLC-δ) (Saunders *et al.*, 2002). Hladina vápníku opakovaně osciluje od splnutí spermie s oocytem v čase i několika hodin (Miyazaki *et al.*, 1993, Jones *et al.*, 1995, Macháty *et al.*, 1997a). Vzrůst hladiny intracelulárního vápníku způsobí exocytózu kortikálních granul (Abbott *et al.*, 2001). Enzymy uvolněná kortikální granula způsobí modifikaci *zony pellucidy* a zabrání polyspermii (Bleil *et al.*, 1981).

Důležitým faktorem při aktivaci oocytu je znovuzahájení meiózy oocytu zastaveného ve druhém meiotickém bloku a v tomto procesu se hlavička spermie přemění v samčí pronucleus. Chromatin spermie postupně v cytoplazmě oocytu dekonduzuje a okolo se vytváří nová jaderná membrána (Yanagimachi, 2005). Dochází k rotaci dělicího vřeténka, vstupu do anafáze II a vydělení 2. pólového tělíska (Williams, 2002). U prasat se 8 h po inseminaci začíná syntéza DNA a formuje se samčí a samičí prvojádru (Ding *et al.*, 1992). Poté dojde k vytvoření jednobuněčné zygoty. Po přemístění prvojader do středu zygoty se rozpadá jaderná membrána a dochází k syngamii, procesu přípravy pro první dělení (Williams, 2002), pro který je zapotřebí ATP a vysokých hladin volných vápenatých iontů, k jejichž akumulaci dochází v mitochondriích a v perinukleárním prostoru (Sun *et al.*, 2001a).

Po splnutí spermie s oocytem dojde k degradaci cyklinu B (Lorca *et al.*, 1993). Mos podléhá degradaci proteasomem po navázání ubikvitinu (Ishida *et al.*, 1993). Konečná ztráta aktivního CSF a inaktivace MPF umožní vstup samičího chromatinu do anafáze II (Lorca *et al.*, 1993). Po poklesu aktivity MPF, také začíná klesat aktivita MAPK (Moos *et al.*, 1995). Tato

protein kináza je důležitá pro regulaci meiotického buněčného cyklu. Pokles MAPK je pravděpodobně potřebný pro formaci prvojader (Miyano *et al.*, 2000). U myši je během oplodnění přechodně aktivována CaMKII (Winston *et Maro*, 1995). CaMKII se společně s kalmodulinem naváže na dělicí vřeténko, což zdůrazňuje úlohu CaMKII v pokračování meiózy. Studie Matsumota *et Mallera* (2002) mluví o potřebě CaMKII pro duplikaci centrosomu, jež umožňuje přechod z metafáze II do anafáze II. Aktivace Ca^{2+} /CaMKII je základním faktorem vedoucím k inaktivaci MPF i CSF (Dupont, 1998). CaMKII je zřejmě zapojena do exocytózy kortikálních granul (Abbott *et Ducibella*, 2001) a účastní se cytoskeletární přestavby během aktivace oocyty (Johnson *et al.*, 1998).

Při partenogenetické aktivaci oocytů je během migrace prvojader zapotřebí k jejich splynutí vysokých koncentrací vápenatých kationtů a ATP, aby mimo jiné došlo k akumulaci mitochondrií v perinukleárním prostoru (Sun *et al.*, 2001a). Pro navození partenogenetické aktivace oocyty v *in vitro* podmínkách slouží calcium ionophor A23187, který zvyšuje vnitrobuněčné hladiny vápenatých kationtů (Jílek *et al.*, 2000, 2001). V *in vitro* podmínkách dále existuje možnost navození partenogenetické aktivace také umělými stimuly, například elektrickými pulzy, kterými se opět zvýší hladina Ca^{2+} (Procházka *et al.*, 1992). V *in vivo* podmínkách ustává oscilace hladin Ca^{2+} několik hodin po fúzi spermie s oocytem (Jones *et al.*, 1995). Opakované oscilace hladin Ca^{2+} od fúze spermie a prasečího oocyty trvá po několik hodin (Macháty *et al.*, 1997b).

Migrace a přežití zárodečných buněk během embryonálního vývoje probíhá mimo jiné prostřednictvím tyrosin-kinázového receptoru c-kit a jeho ligandu CSF, k jeho lokalizaci došlo v oocytech a granulózních buňkách (Fair, 2003). U savců je krátce po oplození degradována mRNA, ale k její aktivaci dochází časně během embryonálního vývoje. U prasete probíhá degradace mRNA na konci třetího buněčného cyklu ve stádiu 4 blastomer (Thompson *et al.*, 1998).

1.2 Oocyty žab *Xenopus laevis*

1.2.1 Obecná charakteristika využití žab *Xenopus laevis*

Oocyty žab *Xenopus laevis* jsou voleny pro experimentální výzkumné účely nejen pro výzkum vývoje obojživelníků, ale také z důvodu podobnosti mechanismů se savčími oocyty, tedy i humánními oocyty. Meiotické zrání je dvakrát zastaveno, poprvé v profázi I a v *in vitro* podmínkách obnoveno hormonální stimulací prostřednictvím progesteronu, kdy se oocyty nachází ve stádiu VI a podruhé zastaveno v metafázi II, kdy jsou připraveny k oplodnění (Masui, 1967, Smith *et al.*, 1968, Ješeta *et Bodart*, 2012). Stejně jako prasečí oocyty jsou oocyty *Xenopus laevis* závislé při znovuzahájení a dokončení meiotického zrání na translaci bílkovin, nikoliv na jejich transkripci (Ješeta *et Bodart*, 2012). V *in vitro* podmínkách se žáby *Xenopus laevis* používají od 50. let 20. století v diagnostice gravidity. Stimulace hormonem hCG vyvolává u drápatek kladení vajíček. Tato stimulace se dnes využívá k získávání oocytů pro výzkum ve vývojové, buněčné a molekulární biologii. Samice je vhodná k výzkumným účelům a používá se od věku dvou let (Kobel *et al.*, 1992, Tinsley *et Kobel*, 1996, Green, 2010). *Xenopus laevis* je chován ve skleněných či plastových nádobách o hloubce minimálně 30 cm a výšce hladiny vody 7-14 cm. Teplota vody je kolem 18°C při pH ≤ 7. Je doporučeno dodržování fotoperiody 12h den/12h noc (ASTM, 1998). Krmení probíhá dvakrát až třikrát týdně. Je vhodné po každém krmení vyměnit vodu, aby se předešlo vzniku infekce. Ke krmení se používají pelety pro akvarijní rybičky doplněné o vitamíny (Green, 2010).

Modelový organismus *Xenopus laevis* je vhodný také z hlediska politiky „3R“ (Replace, Refine, Reduce) a je vhodným buněčným modelem z hlediska usnadnění mikromanipulací, výzkumu mechanismu signálních kaskád, elektrofyziologických vlastností či enzymatických aktivit za fyziologických podmínek a v podmínkách *in vitro*. Dále je vhodný z hlediska studia morfogeneze dělicího vřetenka, výskytu aneuploidií a partenogenetické aktivace oocytů. Nevýhody žab *Xenopus laevis* spočívají v některých odlišnostech oproti savčím modelům – a to svou allotetraploidií (18 chromozómů), nejsou oviparní a meiotické zrání a fertilizace nezávisí na přítomnosti kumulárních buněk (Haccard *et al.*, 1995, Huang *et al.*, 1995, Tinsley *et Kobel*, 1996, Ješeta *et Bodart*, 2012).

Jeden oocyt žab *Xenopus laevis* o své velikosti 1,2-1,4 mm je ekvivalentem 50 tisíc somatických buněk. Žabí oocyty mají vysokou koncentraci proteinů, například 50-70 ng katalytické podjednotky PKA. Oocyty také disponují zvýšenou proteosyntézou (200-400 ng/den/oocyt) (Cailliau *et Browaeys-Poly*, 2009, Ješeta *et Bodart*, 2012).

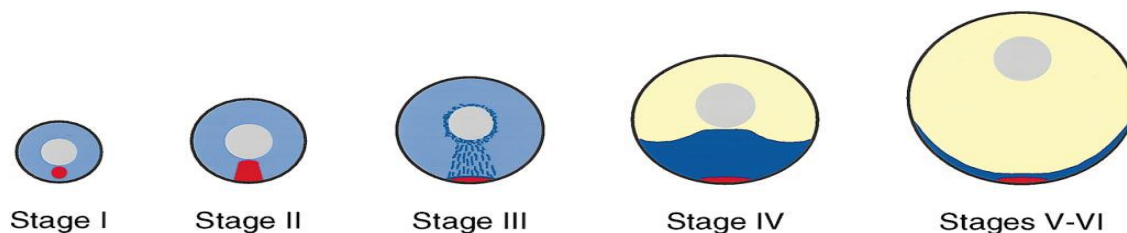
Výhodou žab *Xenopus laevis* je také jejich výhradně vodní způsob života po celou dobu vývoje a možnost získávání oocytů během celého roku (Anguiano *et al.*, 2001).

Drápatka vodní obývá převážně stojaté vody a patří mezi výhradně akvatické žáby, které jsou tolerantní k mnoha změnám faktorů jako je pH vody, salinita i nedostatek potravy. Drápatka je však schopna pohybu po souši a nepříznivé období je schopna přežít v blátě ve stavu estivace (Tinsley *et* Kobel, 1996, Green, 2010). Sliznaté tělo těchto žab je zploštělé, bez krku, jazyka a ocasu. Po stranách těla se nachází laterální rýha, podobně jako u ryb. Zadní končetiny jsou silné a na třech vnitřních prstech mají tmavé zahnuté drápky. Na předních končetinách nemá plovací blány. Kůže je hladká s proměnlivým hnědo-zeleným zbarvením se skvrnami a břicho je světlé. U žab *Xenopus laevis* je výrazný pohlavní dimorfismus. Samice měří 10-15 cm a má velký kloakální vak. Samci jsou o třetinu menší a mají tmavou až černou vnitřní stranu předních končetin. Drápatky pohlavně dospívají v 8. až 12. měsíci věku a dožívají se 10 až 15 let věku. V přírodě se páří v období června – září, ale rozmnožovat se mohou až 4x ročně. Samice se samcem tvoří spojení tzv. amplexus (3-4 hodinové „objetí“ při páření). Samička klade vajíčka, jež jsou oplodněna při výstupu z kloaky (Tinsley *et* Kobel, 1996, Green, 2010).

1.2.2 Oogeneze a embryogeneze u žab *Xenopus laevis*

Oogeneze žab *Xenopus laevis* probíhá v 6 vývojových stádiích oocyty (obr. č. 4). Ve stádiu I jsou oocyty bezbarvé s transparentní cytoplazmou a velkým jádrem a shluky mitochondrií. Oocyty o průměru 50-100 μm . Ve stádiu II jsou oocyty bílé s neprůhlednou cytoplazmou o průměru 450 μm . Stádium I je stádiem previtelogenním a stádium II je stádiem časně vitelogenním. Ve stádiu III a IV pokračuje proces vitelogeneze zahrnující akumulaci žloutku a syntézu pigmentů. Oocyty se rapidně zvětšují a diferencují se na pól tmavý animální a na bílý pól vegetální. Oocyty ve stádiu IV jsou o průměru 600-1000 μm . Ve stádiu V nabývají oocyty své maximální velikosti a obsahu žloutku. Oocyty jsou o průměru 1000-1200 μm . Stádium VI u oocytů je charakteristické přítomností světlého proužku, je to oblast bez pigmentů, v ekvatoriální rovině. Oocyty jsou o průměru 1200-1300 μm . Stádium VI je postvitelogenní a oocyty jsou připravené k ovulaci, k procesu kladení vajíček. Oogeneze je kontinuálním asynchronním procesem. Oocyty ve všech vývojových stádiích jsou na vaječnicku přítomny (Wallace *et al.*, 1970, Dumont, 1971, Hausen *et al.*, 1991).

Obrázek č. 4: Vývojová stádia oocytů žab *Xenopus laevis* (převzato z Mowry *et* Cote, 1999).



Oocyt vzniká meiotickým dělením jako haploidní buňka spolu s vydělením 2 polárních tělísek. Výrazně pigmentované je místo vydělení pólových tělísek a výskytu jádra, jenž je označován jako animální pól, protilehlá část oocytu, kde se nachází žloutek a menší počet pigmentových granulí se nazývá pól vegetální. Oocyt je polarizovanou buňkou s anisotropní vnitřní strukturou (Gilbert *et* Raunio, 1997).

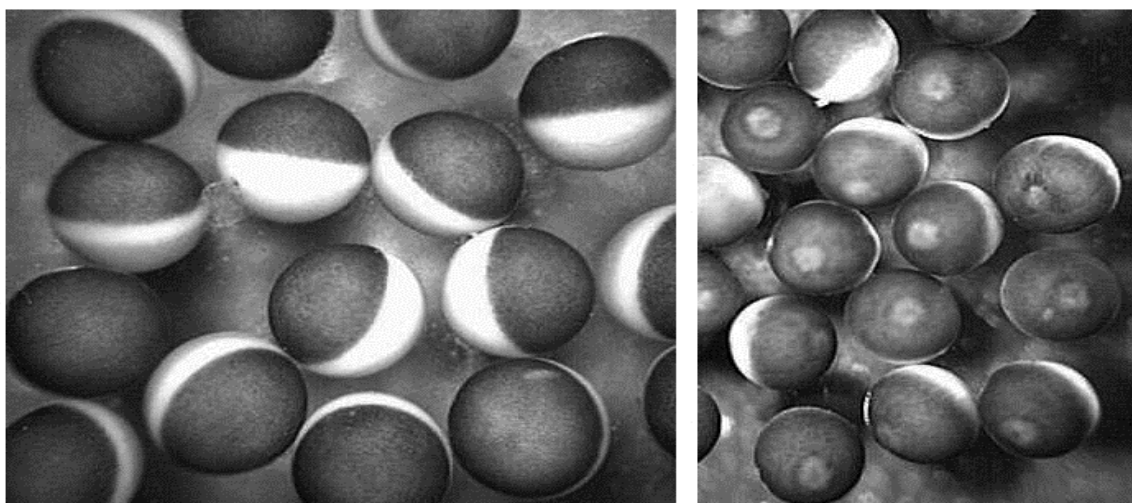
Během oogeneze se zvyšuje syntéza RNA a potřebných ribozomů pro podporu růstu oocytu a embrya v prvních dnech jeho vývoje. V oocytech ve stádiu zárodečného váčku se nachází tzv. „štetkovité“ chromozomy. Během fáze růstu oocytu se mitochondrie seskupí na jedné straně GV a vytvoří tzv. Balbiani body - strukturu bez membrány, skládající se z mitochondrií, endoplazmatického retikula, membránových váčků a tukových kapének (Kloc *et* Etkin, 2005). Tato struktura se pak rozdělí do menších shluků a přesouvají se k povrchu rostoucího oocytu (Gilbert *et* Raunio, 1997). Transport mitochondrií k povrchu oocytu je náznakem budoucí vegetální části oocytu a jedním z rozhodujících faktorů polarizace oocytu. V oplozeném vajíčku a v období časného embryonálního vývoje u žab *Xenopus laevis* jsou oblasti bohaté na mitochondrie označovány zárodečnými cytoplazmaty. Oocyt zvětšuje svou velikost přibýváním žloutku v procesu vitellogeneze ve formě žloutkových destiček ve vegetální části. Žloutkové prekurzory vznikají v játrech a jsou složeny z fosfolipoproteinů (Gilbert *et* Raunio, 1997).

Tvorba dělicího vřeténka je spojena s migrací nukleoplasmy a chromosomů k vrcholu oocytu následující po hormonální stimulaci například progesteronem a v čase po rozpadu zárodečného váčku, dochází k vytvoření velké bílé plochy bez pigmentu (bílá skvrna/místo zrání, White Spot/Maturation Spot, obr. č. 5). Chromozomy jsou kondenzované a dělicí vřeténko ve stádiu MI je vytvořené v kortikální oblasti v blízkosti plazmatické membrány. Po vydělení 1. pólového tělíska, dělicí vřeténko ve stádiu MII je v plazmatické membráně ukotveno a došlo k vytvoření bílé plochy – místa zrání. Nezralé žabí oocyty obsahují tmavě pigmentovanou polokouli, kde se nachází jádro a po progesteronové stimulaci se objeví malá bílá skvrna na

vrcholu oocyty, což má souvislost s migrací zárodečného váčku a jeho následným dělením (Ješeta *et* Bodart, 2012).

Kromě bílé plochy se objevuje tmavý proužek, v čase shodném s výstupem z MI a vstupem oocyty do AI, resp. časem vzrůstu aktivity MPF, jejím poklesu na začátku AI a jejím opětovným následným vzrůstem (Dunphy *et al.*, 1988, Gautier *et al.*, 1988, Draetta *et al.*, 1989, Labbé *et al.*, 1989, Bodart *et al.*, 2002a,b).

Obrázek č. 5: Morfologie nezralých oocytů žab *Xenopus laevis* (vlevo) a morfologie oocytů ve stádiu zárodečného váčku (vpravo) (převzato z Ješeta *et* Bodart, 2012).



Meiotické zrání oocytů u žab *Xenopus laevis*

Dorostlé oocyty v ovariích čekají na hormonální stimul z hypofýzy, aby meióza mohla být dokončena. Folikuly okolo oocyty jsou stimulovány LH-peakem k syntéze steroidních látek především progesteronu, který má vliv na dozrávání oocyty. Luteinizační hormon (LH) vyvolává ovulaci. Po dozrání oocyty dochází k prolomení 2. meiotického bloku a meióza pokračuje. Po GVBD se vytváří dělicí vřeténko na animálním pólu. Oocyt se dělí, dochází k vydělení prvního polárního tělíska a následuje metafáze II (Gilbert *et* Raunio, 1997). Vedle meiotického zrání prochází oocyt i zráním cytoplasmatickým, které u žab *Xenopus laevis* zahrnuje změny propustnosti membrán, cytoskeletární změny a ztrátu mnoha membránových organel. U *Xenopus laevis* doba meiotického zrání oocyty trvá od šesti do dvanácti hodin dle samice a případné hormonální stimulace. Po dozrání je oocyt schopný splýnutí se spermií a vývoje embrya (Sive *et al.*, 2000).

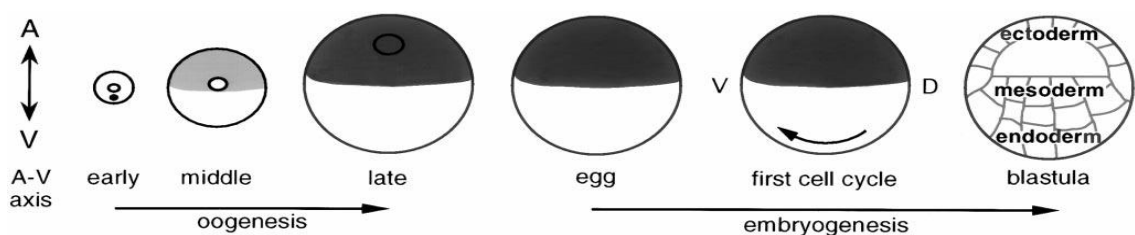
Při sestupu vejcovody jsou zralé oocyty žab *Xenopus laevis* obklopeny slizovitým obalem. Spermie splýne s plazmatickou membránou oocyty v místě animálního pólu a svým

vstupem zralý oocyt aktivuje, dochází k depolarizaci membrány a změně pH, a tak je zabráněno polyspermii. Další ochranou je uvolnění kationtů vápníku do vnějšího prostředí oocyty. Ionty Ca^{2+} (rozdílnost mezi savci a obojživelníky) způsobí exocytózu kortikálních granul a kontrakci kortexu (Gilbert *et* Raunio, 1997). Obsah kortikálních granulí spolu s vrstvou slizového obalu vytváří tzv. fertilizační obal. Po jistém čase se vajíčko z této schránky uvolní a volně se pohybuje. Poté dojde ke stočení vegetálního pólu směrem dolů o 30 stupňů vůči vnitřní cytoplazmě, a to většinou do 30 minut po oplodnění oocyty. Pohyb jádra spermie z vnější vrstvy oocyty do cytoplazmy je umožněn díky paprscité mikrotubulární struktuře mající původ v centrosomu. Změny polohy pigmentových granulí jsou pozorovatelným směrem pohybu penetrace spermii. Animální pól se odchýlí k místu penetrace spermie do oocyty (sperm entry point- SEP), což má za následek posun vegetální části a tvorbu šedého srpkovitého útvaru (grey crescent), dojde k odkrytí pigmentované cytoplazmy na animálním pólu, jež je po posunutí pokryta pouze nepigmentovanou vrstvou části vegetálního pólu. Šedá část naznačuje budoucí dorzální stranu embrya. Animální i vegetální pólová cytoplazma oocytů *Xenopus laevis* je málo pigmentovaná, a proto není šedá část příliš zřetelná.

Oocyty žab *Xenopus laevis* se řadí díky svému excentrickému uložení žloutku mezi heterolecitální. Žloutková zrna jsou soustředěna při vegetálním pólu. Na animálním pólu se mezi blastomerami utváří štěrbina, která se rozšíří v antrum zvané blastocel obklopené blastodermem (Gilbert *et* Raunio, 1997).

Proces embryogeneze (obr. č. 6) začíná tvorbou zygoty, fúzí obou haploidních prvojadér a následným dělením. Rýhování vajíček nastává 1,5-3,5 hodiny po oplodnění při 20 °C. První rýha jde přes animální pól a SEP a dělí se na srpkovitý útvar. Zygota se rychle dělí, a to bez růstu buněčné hmoty. U žab probíhá holoblastické (totální) rýhování, při kterém vznikají blastomery (Gilbert *et* Raunio, 1997).

Obrázek č. 6: Oogeneze vs. embryogeneze u žab *Xenopus laevis* (převzato z Mowry *et* Cote, 1999).



Dělení je synchronní a u žab *Xenopus laevis* probíhá každou půlhodinu (Gilbert *et Raunio*, 1997). Na vegetálním pólu se nachází větší žlutkové buňky s prekurzory zárodečných buněk obsahujících zárodečnou plasmu, která původně byla na povrchu vegetálního pólu oocyty, to nejspíše vysvětluje přesun kortikální cytoplasmy z povrchu oocyty podél vznikajících rýh. U oocytů větších než 3mm, je rýhování méně symetrické, protože na animálním pólu oocyty vzniká nepravidelná struktura, ale rýhování vegetálního pólu probíhá pomaleji.

Během procesu oogeneze oocytů žab *Xenopus laevis* se uplatňuje řada faktorů, které mají vliv na získání meiotické kompetence. MAPK se podílí na ochraně aktivace degradace cyklinu B při přechodu z MII do AII, ochrana probíhá prostřednictvím aktivace inhibitoru APC (Vorlauffer *et Peters*, 1998). CaMKII je schopna u zablokovaných oocytů indukovat degradaci cyklinu B bez inaktivace MAPK (Abrieu *et al.*, 1996) a je schopna (in)aktivovat inhibitor APC a tím potlačit cytostatickou aktivitu oocyty. Během oplození aktivita MPF klesne účinkem aktivity CSF prostřednictvím defosforylace proteinu Mos. Degradace cyklinu B a inaktivace MPF je zprostředkována signalizací vápníkovými ionty, dochází k narušení rovnováhy mezi CSF a MPF (Watanabe *et al.*, 1989, Weber *et al.*, 1991). 30-45 minut po oplodnění dojde ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} (Watanabe *et al.*, 1989, Weber *et al.*, 1991, Phillips *et al.*, 2002), zatímco k inaktivaci MPF degradací cyklinu B dochází asi po 15 minutách. Aktivace MPF vyvolaná progesteronem je narušena syntézou cyklinu B a současně snížena aktivita Mos/MAPK dráhy (Haccard *et Jessus*, 2006).

U oocytů *Xenopus laevis* zastavených v MII je aktivita APC přímo potlačena proteinem Emi2 (Erp1) (Liu *et Maller*, 2005), který se objeví až po stádiu MI, což vysvětluje, proč meiotický blok končí až v MII (Liu *et al.*, 2006, Tang *et al.*, 2008). Po oplodnění se zvýší hladina volného intracelulárního vápníku, který aktivuje CaMKII a ta fosforyluje Emi2 (Erp1), a tak dojde k uvolnění inhibovaného APC (Liu *et Maller*, 2005, Rauh *et al.*, 2005, Schmidt *et al.*, 2005). APC pak zapříčiní degradaci cyklinu B, MPF je neaktivní a oplodněné vajíčko opouští MII. U oocytů *Xenopus laevis* zastavených v MII, jsou substráty pro Emi2 (Erp1) kinázy p90Rsk a Mos. Emi2 (Erp1) dependentní fosforylace způsobená p90Rsk je zásadní, jak pro stabilizaci Emi2 (Erp1), tak pro zastavení v MII prostřednictvím CSF (Inoue *et al.*, 2007, Nishiyama *et al.*, 2007a).

1.3 Sirovodík (H₂S)

1.3.1 Obecná charakteristika H₂S

Sirovodík je bezbarvý, hořlavý, velmi dráždivý až toxický plyn se specifickým zápachem zkažených vajec (Winder, 1933, Stárka, 2009).

V savčích tkáních je H₂S produkován endogenně z L-cysteinu (Stipanuk *et* Beck, 1982). V organismu jako signální molekula zajišťuje mnoho fyziologických funkcí (Abe *et* Kimura, 1996, Patel *et al.*, 2009). H₂S byl poprvé popsán jako endogenní neurotransmitter (Abe *et* Kimura, 1996).

Sirovodík jako signální molekul a byl popsán v respiračním systému, kardiovaskulární systému a v centrální nervové soustavě (Reiffenstein *et al.*, 1992, Zhao *et* Wang, 2002, Mancardi *et al.*, 2009). V roce 1982 byl sirovodík poprvé prokázán i v jaterní tkáni (Stipanuk *et* Beck, 1982). Počátkem devadesátých let byl sirovodík prokázán také v mozkové tkáni, kde byla zjištěna relativně vysoká hladina sirovodíku v mozku člověka, skotu a potkana (Goodwin *et al.*, 1989, Warenycia *et al.*, 1989).

1.3.2 Biochemické vlastnosti H₂S

Sirovodík je slabou kyselinou, která v organismu z jedné třetiny nedisociuje a ze dvou třetin disociuje do H⁺ a HS⁻ iontů a dále při vyšším pH disociuje na H⁺ a S²⁻ (Łowicka *et* Bełtowski, 2007, Stárka, 2009). H₂S se může vázat na hemoglobin, podobně jako NO, CO (Shibuya *et al.*, 2009). Permeabilita tkání pro H₂S je nižší než u NO a CO. Rozpustnost H₂S v lipofilním prostředí je ještě asi 5x vyšší než ve vodném prostředí, průchod H₂S tkáněmi probíhá pouhou difúzí bez přenašeče (Goodwin *et al.*, 1989, Stárka, 2009). Koncentrace H₂S ve tkáních jsou odlišné - v séru a tkáních okolo 50 μM (10-46 μmol/l u potkana – 10-110 μmol/l u člověka), v mozku bývají koncentrace vyšší (50-70 μmol/l u potkana – 160 μmol/l u člověka). Tato hladina H₂S je blízko toxické koncentraci (Łowicka *et* Bełtowski, 2007, Stárka, 2009, Elsey *et al.*, 2010).

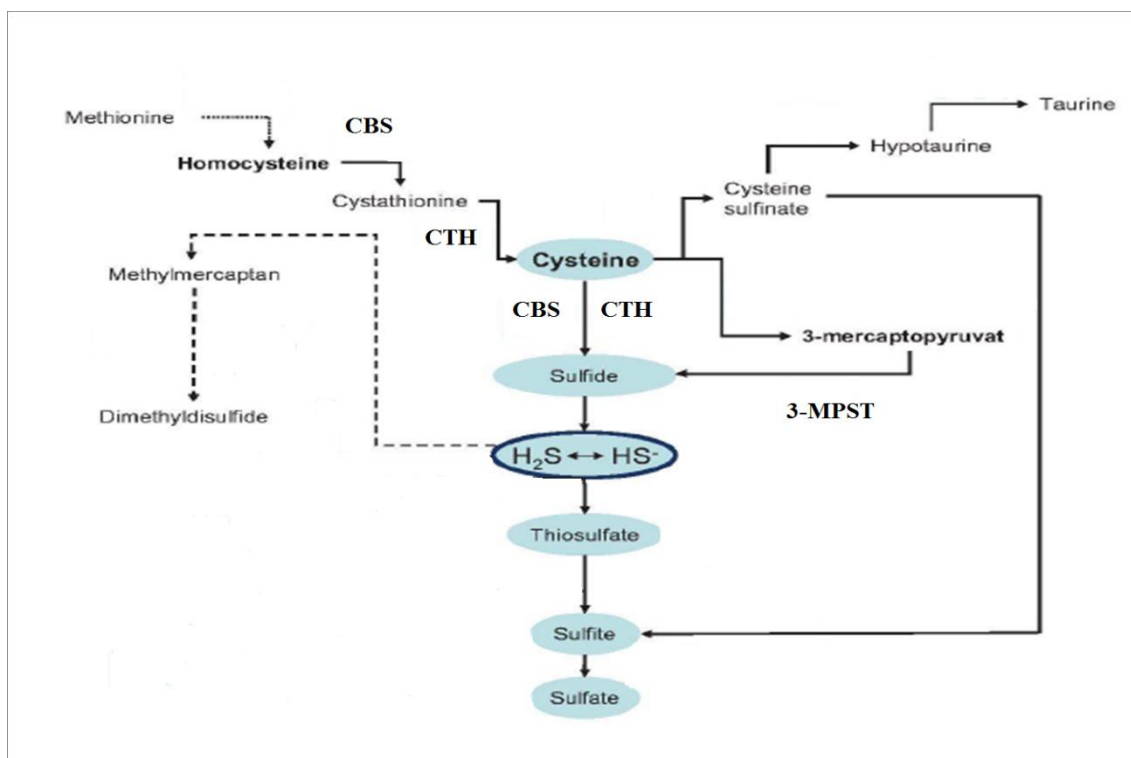
Endogenní hladina H₂S je zvyšována expresí některých faktorů – VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), IGF (Insulin-Like Growth Factor), TGF-α, -β, cytochrom c-oxidázy a cAMP (Mancardi *et al.*, 2009, Enokido *et al.*, 2005).

Endogenní signalizace sirovodíkem probíhá přes sulfhydrylaci proteinů, jež je obdobou nitrosylace (Mustafa *et al.*, 2009). Na cysteinech cílových proteinů se vytvoří skupina S-SH (Jaffrey *et al.*, 2001).

1.3.3 Biosyntéza H₂S

Sirovodík je endogenně produkován z L-cysteinu (Wang, 2002). L-cystein je neesenciální aminokyselina obsahující síru. L-cystein je syntetizován z methioninu přes homocystein a cystathionin (Stipanuk, 2004, Łowicka *et Beltowski*, 2007). Pro syntézu endogenního H₂S je substrátem L-cystein, který je buď alimentárního původu a nebo nasyntetizován z methioninu (Łowicka *et Beltowski*, 2007). Cesta vzniku L-cysteinu je na obrázku č. 7.

Obrázek č. 7: Biosyntéza H₂S (přepřacováno dle Elsey *et al.*, 2010)



Sirovodík je z L-cysteinu produkován třemi enzymy – cystathionin β -syntázou (CBS), cystathionin γ -lyázou (CTH) a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferázou (MPST) (Wang, 2002, Shibuya *et al.*, 2009). Dva z nich (CBS a CTH) jsou dependentní na kofaktoru pyridoxal 5'-fosfátu (PLP) a jejich substrátem je L-cystein (Stipanuk *et Beck*, 1982, Erickson *et al.*, 1990, Zhao *et al.*, 2001). Třetí enzym MPST je independentní na kofaktoru pyridoxal 5'-fosfátu a jeho substrátem je 3-mercaptopyruvát (Shibuya *et al.*, 2009).

CBS (EC 4.2.1.22) katalyzuje reakce substitučního typu mezi L-cysteinem, L-serinem, thioethery a některými L-aminokyselinami a merkaptany. Lidská CBS je homotetramer vázající pyridoxal 5'-fosfát a hem a skládající se ze dvou podjednotek o 63 kDa a 551 aminokyselinách, vytvářejících vazbu s homocysteinem a serinem (Patel *et al.*, 2009). CBS se skládá ze 3 funkčních domén, kde střední doména obsahuje katalytické jádro (vazba pyridoxal-5'fosfátu).

Negativní regulační oblasti C-terminální domény jsou odpovědné za aktivaci enzymu S-adenosylmethioninu (AdoMet). Poslední je N-terminální doména obsahující vazebné místo pro hem. Produkce H₂S prostřednictvím CBS ve své syntéze zahrnuje také kondenzaci homocysteinu s cysteinem s následným vznikem cystathioninu a uvolněním H₂S (Jhee *et* Kruger, 2005, Chen *et al.*, 2004). Vysoká aktivita CBS při syntéze H₂S byla detekována v centrální nervové soustavě (Szabó, 2007).

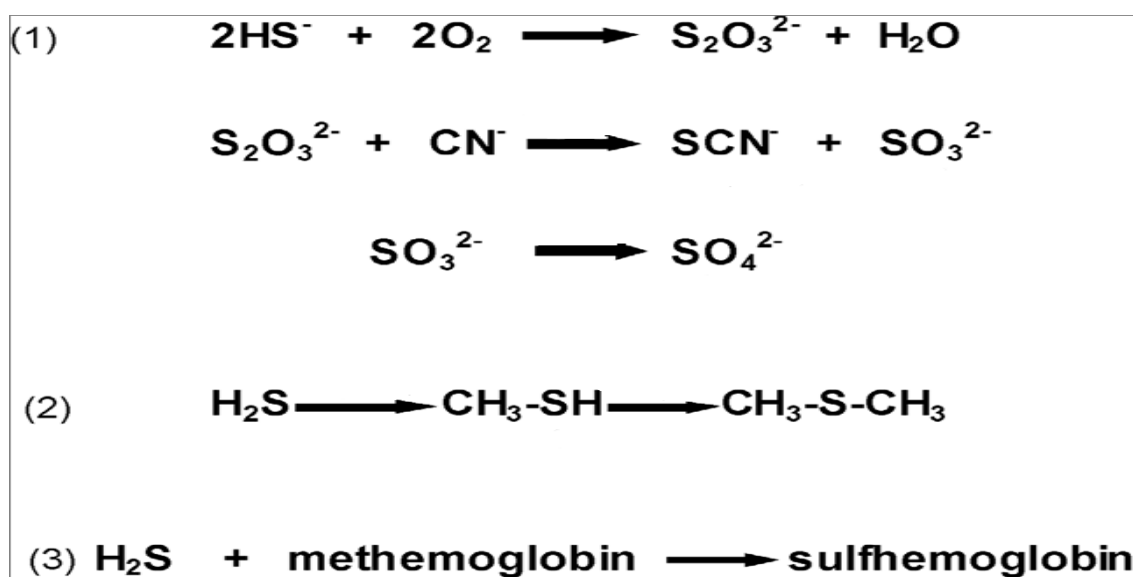
CTH (EC 4.4.1.1) je proteinem skládajícím se ze 405 aminokyselina je tvořena tetramerem ze dvou homodimerických částí. CTH má molekulovou hmotnost 45 kDa (Stárka, 2009). Je katalyzátorem přeměny cysteinu na thiocystein, pyruvát a NH₄⁺, kde thiocystein se pak rozloží na cystein a H₂S. CTH byla lokalizována hlavně v cévní soustavě a kardiovaskulárním systému (Szabó, 2007).

MPST je multifunkční enzym, jehož substrátem je 3-mercaptopyruvát, který vzniká pomocí enzymu cysteinaminotransferázy reakcí cysteinu a α -ketoglutarátu (Stipanuk *et* Beck, 1982, Shibuya *et al.*, 2009).

1.3.4 Katabolismus H₂S

Vytvořený sirovodík je v buňce oxidován hlavně v mitochondriích na thiosulfát a dále na sulfid a sulfát. Jedná se pravděpodobně o neenzymatický proces propojený s transportem elektronů přes vnitřní membránu mitochondrií. Druhou drahou je methylace methanthiolu na dimethylsulfid v cytosolu. V závěru výčtu katabolických drah H₂S je možné spojení s methemoglobinem za vzniku sulfhemoglobinu (Wang, 2002, Łowicka *et* Bełtowski, 2007, Stárka, 2009). (obr. č. 8). Tyto metabolity se vyloučí ledvinami, plícemi či gastrointestinálním traktem. Endogenní sirovodík se v organismu neakumuluje a není toxickým pro organismus (Du *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2007).

Obrázek č. 8: Katabolismus H₂S (přepřacováno dle Łowicka *et* Bełtowski, 2007)



1.3.5 H₂S versus apoptotické změny v organismu

Rodina jaderných faktorů (NF-κB) je skupina transkripčních faktorů stimulovaných prozánětlivými cytokiny Tumor Necrosis Factors alpha (TNF-α). TNF-α aktivují komplex IκB kináz (IKK) fosforylací IκB proteinů. Tento proces vede k degradaci a translokaci NF-κB do jádra (Delhase *et al.*, 1999, Karin *et* Ben-Neriah, 2000). Jaderné funkce NF-κB jsou regulovány mnoha látkami včetně ribozomálního proteinu S3 (RPS3) (Wan *et al.*, 2007). H₂S je zapojen do zánětlivých procesů, což naznačuje vztah s NF-κB. Anti-apoptotické účinky NF-κB jsou zprostředkovány H₂S, který je syntetizován CTH (Szabó, 2007). Ošetření TNF-α ztrojnásobuje účinek H₂S stimulací navázání SP1 (transkripční faktor aktivace TNF-α) na CTH. H₂S generovaný CTH také stimuluje vazby na DNA a genovou aktivaci NF-κB u myší s vyblokováným genem pro CTH (Gius *et al.*, 1999, Szabó, 2007). CTH knockout vede ke snížení hladiny glutathionu, což může vést k následným změnám způsobeným oxidačním stresem u CTH mutantních myší. H₂S působí tak, že sulfhydratuje podjednotku p65 na cysteinu-38 NF-κB, který posiluje jeho vazbu na ko-aktivátor ribozomálního proteinu S3 (RPS3). Sulfhydratace p65 brzy převládá po ošetření TNF-α, pak klesá a je následována recipročním zvýšením nitrosylace p65. U CTH mutantních myší nedochází k sulfhydrataci p65, antiapoptotické vlivy NF-κB jsou výrazně menší a myši jsou hypersenzitivní k apoptotickým změnám po ošetření TNF-α. Sulfhydratace NF-κB se jeví jako posttranslační modifikace p65 a zdá se určujícím fyziologickým determinantem jeho antiapoptotické transkripční aktivity (Sen *et al.*, 2012).

Pan *et al.* (2011) ve své studii zkoumali účinky a mechanismy hydrogen sulfidu sodného (NaHS, donoru H₂S) na Tumor Necrosis Factor (TNF) vyvolávající dysfunkce u endotelových buněk pupečnickových cév (HUVEC). Činnost TNF- α je spojená s aktivací více signálních drah, včetně MAPK (p38) a NF- κ B (Li *et al.*, 2005, 2008). Dále je činnost TNF- α spojena s expresí HO-1 v HUVEC. HO-1 je isoformahemoxygenázy, kontrolující degradaci hemu a hrající ústřední roli v regulaci zánětlivých reakcí prostřednictvím svých produktů bilirubinu a oxidu uhelnatého (Paine *et al.*, 2010). NaHS může v závislosti na dávce vyvolat expresi HO-1 v endoteliálních buňkách. Donorem sirovodíku lze patrně vyvolat expresi HO-1 a tím přispět k jeho protizánětlivým účinkům.

Rinaldi *et al.* (2006) se ve své studii zabývá přežitelností lidských neutrofilů v přítomnosti H₂S v *in vitro* podmínkách, kdy v důsledku inhibice štěpení kaspázou-3 (případně kaspázou-8) a inhibicí fosforylace p38 MAPkinázy, dochází k oddálení nástupu apoptózy.

1.3.6 Účinky H₂S ve tkáních

H₂S je jedním z klíčových regulačních mechanismů mnoha fyziologických procesů v organismu (Fiorucci *et al.*, 2006). V centrální nervové soustavě působí sirovodík jako neuromodulátor a neuroprotektor (Abe *et al.*, 1996, Wang, 2002, Łowicka *et al.*, 2007, Qu *et al.*, 2008, Tan *et al.*, 2009a), v kardiovaskulární soustavě se uplatňuje při vazodilataci a vazokonstrikci (Zhao *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2009, Mancardi *et al.*, 2009), působí na hladkosvalové buňky respiračního traktu (Reiffenstein *et al.*, 1992) a ovlivňuje motilitu střev relaxačním účinkem na ileum (Teague *et al.*, 2002). Kromě těchto funkcí se sirovodík uplatňuje i při zánětlivých procesech u probíhající pankreatitidy, endotoxémie, hemorhagickém šoku (Li *et al.*, 2009, Pae *et al.*, 2009) a podílí se i na řízení sekrece inzulinu (Yang *et al.*, 2005b, Cao *et al.*, 2006). V pohlavní soustavě proerektivně působí na kavernózní tělíska v penisu a u samic působí na vaginální a klitoriální vaskulární tkáň (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2009, Patel *et al.*, 2009, Srilatha *et al.*, 2006, 2007, 2009). Byly sledovány také jeho léčivé účinky využívané v sírných lázních (Stárka, 2009). H₂S je mimo jiné schopen zabránit poškození organismu hypoxií tím, že dokáže u některých savců navodit stav blízký hibernaci (Olson *et al.*, 2006, 2010), a to prostřednictvím inhibice cytochrom c-oxidázy v dýchacím řetězci mitochondrií (Collman *et al.*, 2009).

Podíl cystathionin β -syntázy, cystathionin γ -lyázy a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferázy na endogenní produkci sirovodíku je v různých tkáních odlišný.

V centrální nervové soustavě je za produkci sirovodíku zodpovědná zejména cystathionin β -syntáza a sirovodík zde působí spolu s vápenatými kationty (Eto *et al.*, 2002, Nagai *et*

al.,2004). Na produkci H₂S v mozku se podílí také 3-mercaptopyruvate sulfurtransferáza (Shibuya *et al.*, 2009).

V kardiovaskulární soustavě je sirovodík produkován hlavně cystathionin γ -lyázou a sirovodík zde působí zejména při vazokonstrikci.

V játrech, ledvinách, ileu, plicích, pankreatických ostrůvčích, děloze a varlatech byly zjištěny všechny tři enzymy endogenně produkující H₂S (Ogasawara *et al.*, 1994, Nagahara *et al.*, 1998, Zhao *et Wang*, 2002, Ichinohe *et al.*, 2005, Łowicka *et Bełtowski*, 2007, Mancardi *et al.*, 2009).

Enzymy CBS, CTH a 3-MPST působí v organismu rozdílně a různá je i jejich tkáňová distribuce (Zhao *et al.*, 2003, Olson *et al.*, 2006, Mustafa *et al.*, 2009).

Působení H₂S v organismu

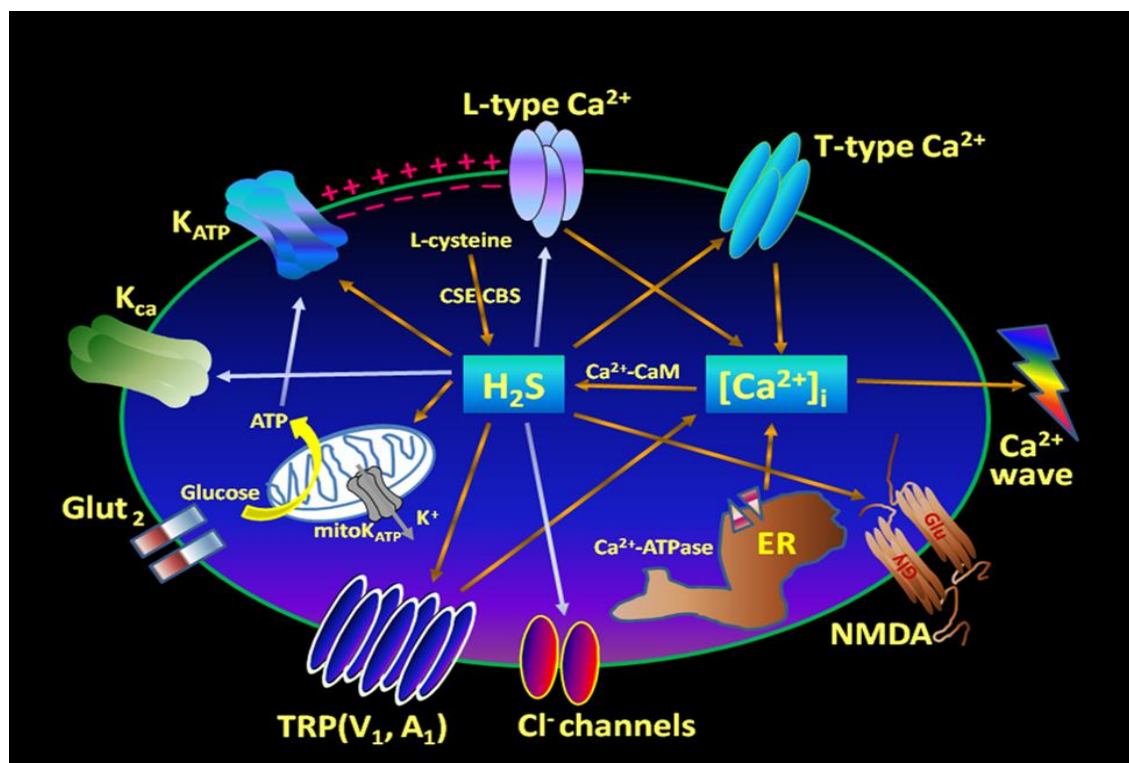
H₂S se v mozku projevuje jako signální molekula mající vliv na funkčnost neurotransmiterů a uplatňující se při vytváření paměťových stop (Abe *et Kimura*, 1996). H₂S má mimo jiné vliv na neurosignalizační dráhy a jeho účinek je neuromodulační a neuroprotektivní (Chen *et al.*, 2007). Angažuje se v ochraně proti oxidativnímu stresu prostřednictvím zvyšování hladin glutathionu (Kimura *et Kimura*, 2004) a při hyperpolarizaci membrán aktivací iontových kanálů: K⁺_{ATP} a Cl⁻ K⁺_{ATP} a T typ Ca²⁺ kanálů (Nagai *et al.*, 2004, Shibuya *et al.*, 2009). Na NMDA receptory působí H₂S stimulačně, na rozdíl od Cl⁻ kanálů, kde působí inhibičně (obr. č. 9). K aktivaci cAMP/PKA drah v mozku dochází vyplavením Ca²⁺ iontů a následnou stimulací ryanodinových receptorů (Tan *et al.*, 2009a, Tang *et al.*, 2010). H₂S je v mozku produkován hlavně v mozečku, mozkovém kmeni a hippokampu (Abe *et Kimura*, 1996, Chen *et al.*, 2007).

Hlavním enzymem, podílejícím se na endogenní produkci sirovodíku v mozku je CBS (Wang, 2002). CBS byla lokalizována v mikroglíích (Hu *et al.*, 2007) a v astrocytech (Ichinohe *et al.*, 2005). CBS je detekována v hippokampu a v mozečku. CBS zvyšuje aktivitu NMDA receptorů a účastní se na tzv. long term potentiation (LTP) – vytváření paměťových stop za spoluúčasti kalmodulinu a Ca²⁺ (Abe *et Kimura*, 1996, Wang, 2002, Łowicka *et Bełtowski*, 2007, Szabó, 2007). Díky působení H₂S na long-term potentiation je H₂S zesilujícím mechanismem synaptického přenosu signálu mezi neurony a glii (Abe *et Kimura*, 1996). Ke snížení intracelulárního H₂S dochází prostřednictvím abnormální exprese CBS (Eto *et al.*, 2002). V případě Downova syndromu není přítomna sekvence kódující CBS na 21. chromozómu, a tím se spolupodílí na patofyziologických projevech tohoto onemocnění (Abe *et Kimura*, 1996).

Exprese CTH je v centrální nervové soustavě nízká. CTH byla zjištěna pouze v mikroglíích (Tan *et al.*, 2009a).

MPST je dalším enzymem vyskytující se ve větší míře v mozku. Je lokalizována v pyramidálních buňkách hippocampu (Łowicka *et* Bełtowski, 2007) a v neuronech (Shibuya *et al.*, 2009).

Obrázek č. 9: H₂S versus iontové kanály (převzato z Tang *et al.*, 2010)



H₂S působí jako gasotransmitter také v cévní soustavě (Gadalla *et* Snyder, 2010). Má zde kardioprotektivní účinek (Zhao *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2004, Szabó, 2007, Sen *et al.*, 2009). Stimuluje proces proliferace, adheze, migrace a zformování endoteliálních buněk cév ve vaskulární tkáni savců (Cai *et al.*, 2007). H₂S působí hlavně na buňky hladkého svalstva, nikoliv na inervaci cév či jejich endotel (Łowicka *et* Bełtowski, 2007). Účastní se také inhibice proliferace a aktivace MAPK, jež je zapojena v programované buněčné smrti vaskulárního hladkého svalstva. Hlavní fyziologický vliv H₂S spočívá v regulaci cévní kontraktility ve tkáních a vasodilatační působení při regulaci buněčného růstu, tím je zprostředkován vliv na remodelaci cév (Zhao *et al.*, 2001, Stárka, 2009). Vasorelaxační účinek je spojen s otevřením K⁺ kanálů, konkrétně K⁺_{ATP} dependentních kanálů, čímž dochází k hyperpolarizaci plazmatické membrány buněk. Což také souvisí s omezením vstupu extracelulárních vápenatých kationtů do vaskulární tkáně (Zhao *et al.*, 2001). H₂S působí při vasorelaxaci buněk cév hladké svaloviny tím, že pomáhá vytvářet výstelku cév, a tak se nepřímou účastní i regulace krevního tlaku. Otvíráním K⁺_{ATP} kanálů při vasodilataci působí sirovodík podobně jako v centrální nervové soustavě

(Mancardi *et al.*, 2009). Ke zvýšení koncentrace H₂S a NO dochází při zánětu a hemorhagickém šoku (Mok *et al.*, 2004). Nízká koncentrace H₂S má protizánětlivé účinky, na rozdíl od vysokých koncentrací, které účinkují prozánětlivě (Pae *et al.*, 2009). H₂S se tedy podílí na stimulaci orgánové odezvy na zánět (Gadalla *et Snyder*, 2010). Dochází ke vzájemnému útlumu nebo zesílení účinků H₂S a NO – vasorelaxační cévní efekt či uvolňování H₂S v cévních tkáních (Zhao *et al.*, 2001). Mechanismus vztahu mezi jednotlivými gasotransmitery NO, CO a H₂S není zatím přesně popsán (Elseby *et al.*, 2010).

Hlavním enzymem spojeným s cévní soustavou a kardiovaskulárním systémem je CTH (Łowicka *et Bełtowski*, 2007). CTH působí v cévních tkáních konkrétně v plicních a mezenteriálních artériích, aortě, portální žíle a v srdci (Wang, 2002).

CBS nebyla téměř lokalizována v cévní soustavě, pouze v endoteliálních buňkách umbilikálních cév (Abe *et Kimura*, 1996).

Pokud je koncentrace H₂S v organismu vyšší než 250 ppm vyvolává plicní edém a koncentrace vyšší než 1000 ppm vede ke kómatu nebo smrti (Fiorucci *et al.*, 2006).

Relaxační účinek sirovodíku je pozorován i v gastrointestinálním traktu. Sirovodík působí relaxačně na ileum, což napovídá tomu, že by sirovodík mohl být zapojen do řízení kontraktilních funkcí v motilitě střeva (Teague *et al.*, 2002).

Působení H₂S v reprodukční soustavě

Podíl sirovodíku na řízení reprodukčních funkcí u savců není zatím příliš prozkoumán. U samic potkanů, myši a žen byla CBS a CTH detekována ve vaginální a klitoriální tkáni a u samců potkanů a myši byla CBS nalezena ve vaskulární tkáni (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2009, Patel *et al.*, 2009, Srilatha *et al.*, 2009). S vazodilatačními účinky sirovodíku a s relaxací hladkého svalstva působením H₂S souvisí i jeho role ve stimulaci erekce například u králíků. Patrně zde stimuluje i uvolnění oxidu dusnatého (Srilatha *et al.*, 2007, Maul *et al.*, 2003). CBS a CTH byla mimo jiné lokalizována ve varlatech potkanů. CBS byla ve varlatech detekována v Sertoliho buňkách a v nezralých spermatogoniích, přičemž CTH byla lokalizována v Sertoliho a Leydigových buňkách a také ve všech vývojových stádiích samčích zárodečných buněk (Sugiura *et al.*, 2005).

V samičí pohlavní soustavě byla CTH a CBS popsána v intrauterinních tkáních u samic potkanů, konkrétně v děloze, ve vaginální a placentární tkáni, dále v plodových obalech a mimo jiné se zde sirovodík podílí na relaxaci myometria (Patel *et al.*, 2009, Srilatha *et al.*, 2009). Tyto enzymy byly také detekovány v humánní placentě, amnionu a chorionu. H₂S je produkován placentou a dělohou potkana (Patel *et al.*, 2009).

Ve folikulární tekutině byl detekován homocystein a methionin. Do metabolismu homocysteinu a metioninu je zapojena CBS, působící jako možný mediátor v interakci oocyty s granulózními buňkami v antrálních folikulech. Aktivita CBS byla prokázána v myších ováriích, ale v oocyty CBS nebyla prokázána (Rong *et al.*, 2006). CBS byla detekována v granulózních buňkách antrálních folikulů, kde se účastní inhibice meiotického zrání oocyty (Liang *et al.*, 2006, Rong *et al.*, 2006). Hypoxie v placentární tkáni má souvislost s preeklampsií v těhotenství (Soleymanlou *et al.*, 2005, Patel *et al.*, 2009). Hromadění homocysteinu je pro buňky toxické, vede k hyperhomocysteinémii (Watanabe *et al.*, 1995, Owen *et al.*, 1997, Yamanishi *et al.*, 2006), což může být příčinou časných potratů, komplikací v těhotenství a vzniku právě preeklampsie. Může být také důvodem trombózy a embólie (Levy *et al.*, 2002). H₂S snižuje úspěšnost nidace a implantace zárodku, počet jedinců ve vrhu, způsobuje odloučení placenty a je příčinou vrozených vad u plodů (Aubard *et al.*, 2000, Kumar *et al.*, 2003, Patel *et al.*, 2009). Zvýšený obsah homocysteinu má tedy vliv na kvalitu oocytů a celkový průběh oogeneze. H₂S také v samičí reprodukční soustavě působí relaxačně na hladké svalstvo. Byl prokázán tokolytický účinek H₂S v *in vitro* podmínkách působící na kontrakce dělohy u potkanů, čímž dochází k oddálení porodu (Sidhu *et al.*, 2001, Yuo *et al.*, 2011).

O expresi cystathionin β -syntázy a cystathionin γ -lyázy v oocytech a o funkci sirovodíku při regulaci procesu stárnutí oocytů, nejsou zatím v dostupné literatuře žádné údaje. Proto jsme si stanovili za cíl prokázat přítomnost a vliv sirovodíku během procesu stárnutí oocytů.

1.4 Oxid dusnatý (NO)

1.4.1 Obecná charakteristika a katabolismus NO

Robert Furchgott v roce 1980 popsal biologický efekt endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF) a v roce 1987 bylo objeveno, že EDRF je identický s oxidem dusnatým.

Oxid dusnatý (NO) je v posledních letech jednou z nejvíce studovaných plyných molekul, tzv. gasotransmiterů. Oxid dusnatý je volný dvouatomový plyn vysoce difusibilního a lipofilního charakteru, jenž má schopnost prostupovat rychle a volně biomembránami a regulovat tak fyziologické funkce buněk v organismu. V signální kaskádě oxidu dusnatého funguje jako druhý posel. V organismu je zapojen jako významná signální molekula do regulace mnoha patologických a fyziologických procesů, včetně procesů reprodukčních (Jablonka-Shariff *et al.*, 1997, Rosselli *et al.*, 1998, Ding *et al.*, 2000, Calabrese, 2001, Dixit *et al.*, 2001, Bu *et al.*, 2003). V roce 1998 byla udělena Nobelova cena za fyziologii za objev vazodilatačních účinků oxidu dusnatého v kardiovaskulárním systému.

Oxid dusnatý je bezbarvý plyn a volný radikál. V přítomnosti dostatečného množství kyslíku jsou hlavním produktem rozkladu NO nitrity, které se oxidují až na nitráty v přítomnosti hemoproteinů. Jejich prostřednictvím se stanovuje úroveň endogenní produkce NO v organismu (Dixit *et al.*, 2001, Bian *et al.*, 2003). V tkáních je oxid dusnatý syntetizován ve stopovém množství a snadno reaguje s kyslíkem, peroxidy, oxyhemoproteiny, thioley a jinými látkami (Ignarro *et al.*, 1993). Je velice krátké životnosti, poločas rozpadu NO je 3-5 sekund (Moncada *et al.*, 1991, Ignarro *et al.*, 1993).

1.4.2 Biochemické vlastnosti a biosyntéza NO

V buňkách je syntéza NO katalyzována syntázou oxidu dusnatého (NO-syntázou, NOS, EC 1.14.13.39) (Nathan *et al.*, 1994). Vzniká oxidací dusíku L-argininu přes L-hydroxyarginin za vzniku L-citrulinu a také molekuly oxidu dusnatého (Palmer *et al.*, 1988, Stuehr *et al.*, 1991). Pro reakci je nutná přítomnost kyslíku a kofaktorů jako flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), nikotin adenin dinukleotid (NADPH), tetrahydrobiopterin (H4B = 6R-5,6,7,8 tetrahydrobiopterin), skupina hem obsahující železo (protoporfyrin IX) a kalmodulin (CaM) (Marletta, 1993, Knowles *et al.*, 1994, Masters, 1994, Stuehr *et al.*, 1999).

Syntéza oxidu dusnatého (NOS)

NO-syntázy jsou homodimerické molekuly ze dvou stejných monomerů obsahující vazebná místa na redukční doméně (karboxy-konec, C-konec) pro kofaktory FMN, FAD, NADPH a CaM, ale také pro pevně navázané kofaktory na oxidační doméně (amino-konec, N-

konec) protoporfyrin IX (hemová skupina) a tetrahydrobiopterin (H4B) (Hemmens *et Mayer*, 1998).

Syntáza oxidu dusnatého byla v organismu poprvé identifikována v roce 1989 (Palmer *et Moncada*, 1989). V letech 1991 až 1994 byly klasifikovány její tři základní izoformy: neuronová (nNOS), endoteliální (eNOS) a indukovatelná (iNOS). Klasifikace jednotlivých izoform jako produktů genů s různou lokalizací, katalytickými účinky, regulací a různou senzitivitou k inhibitorům (Furchgott, 1999, Ignarro, 1999, Murad, 1999).

Neuronová či nervová NO-syntáza (nNOS, také NOS-1, NOS-I) byla poprvé objevena v mozkové tkáni (Bredt *et Snyder*, 1990), dále také zjištěna i v periferním nervovém systému (Bredt *et al.*, 1991), v hypofýze (Wolff *et Datto*, 1992), v kosterním svalstvu (Nakane *et al.*, 1993), v β -pankreatických buňkách (Schmidt *et al.*, 1992) a v dřeni nadledvin (Afework *et al.*, 1994), v nefronech ledvin (Terada *et al.*, 1992, Wilcox *et al.*, 1992) a také v samčích pohlavních orgánech (Burnett *et al.*, 1992, Dixit *et Parvizi*, 2001). Ve varleční tkáni byla nalezena nNOS s odlišnou molekulovou hmotností, označovaná jako testikulární nNOS (tnNOS) (Wang *et al.*, 2002). U samic byla nNOS prokázána v kumulárních a granulózních buňkách a v prasečích oocytech (Chmelíková *et al.*, 2009). nNOS má molekulovou hmotnost 131 kDa a u člověka je kódována na 12. chromozomu (Janssens *et al.*, 1992).

Indukovatelná či makrofágová NO-syntáza (iNOS, též NOS-2, NOS-II) byla poprvé detekována v makrofázích u myši (Xie *et al.*, 1992). Produkována je ale i hepatocyty, hladkosvalovými buňkami, fibroblasty, β -pankreatickými buňkami, chondrocyty, keratinocyty a buňkami respiračního traktu (Nathan *et Xie*, 1994). Enzym iNOS se uplatňuje při stimulaci imunitního systému (Dixit *et Parvizi*, 2001) a byl zjištěn v samičích reprodukčních orgánech. iNOS je prokázána v oocytech, v ováriích a v preimplantačních embryích (Jablonka-Shariff *et Olson*, 1997, 1999). Konkrétně byl nalezen ve folikulárních a v luteálních buňkách u potkana (Tao *et al.*, 2004). Dále byla iNOS lokalizována v cytoplasmě myších oocytů ve stádiu metafáze II (Nishikimi *et al.*, 2001). Mitchell *et al.* (2004) detekovali iNOS i v granulózních buňkách a v buňkách *theca folliculi*. iNOS má molekulovou hmotnost 133 kDa a je lokalizována na 17. chromozomu (Dixit *et Parvizi*, 2001).

Endoteliální či endotelová NO-syntáza (eNOS, také NOS-3, NOS-III) byla objevena v endotelových buňkách cév (Pollock *et al.*, 1991, Lamas *et al.*, 1992, Alderton *et al.*, 2001), kde má důležitou roli ve vazorelaxaci cév. eNOS se také nachází v buňkách ledvin, průdušek, srdeční svaloviny a v neutrofilech (Su *et al.*, 2005), také v trombocytech (Mehta *et al.*, 1994),

v pyramidálním typu buněk mozku (Dinerman *et al.*, 1994) a i v reprodukčních orgánech (Dixit *et Parvizi*, 2001). V ováriích byla eNOS nalezena v krevních cévách, v ovariálním stromatu, v buňkách *theca folliculi*, v granulózních buňkách a na povrchu oocytů (Van Voorhis *et al.*, 1995, Zackrisson *et al.*, 1996, Jablonka-Shariff *et Olson*, 1997, Tao *et al.*, 2004). A u samců savců byla objevena v Sertoliho, Leydigových buňkách a ve spermatidách (Ambrosino *et al.*, 2003). eNOS má molekulovou hmotnost 133 kDa a u člověka je kódována na 7. chromozomu (Janssens *et al.*, 1992).

Konstitutivními izoformami jsou nNOS a eNOS – enzymy, které jsou v buňce přítomny neustále v téměř konstantní koncentraci a produkují NO stále v malém množství po krátkou dobu (Rosselli *et al.*, 1998, Alderton *et al.*, 2001, Herrero *et Gagnon*, 2001, Tao *et al.*, 2004, Su *et al.*, 2005). Jejich aktivita je závislá na navázání kalmodulinu, který je aktivován zvýšenou hladinou intracelulárních vápenatých iontů. Vytvořením komplexu kalcium-kalmodulin dochází k aktivaci konstitutivních izoform a syntéze malého množství NO. Konstitutivní izoformy jsou tedy Ca^{2+} a kalmodulin dependentní. iNOS na rozdíl od konstitutivních izoform obsahuje pevně navázaný kalmodulin a není závislá na intracelulárním množství vápenatých iontů, je tedy Ca^{2+} independentní (Rosselli *et al.*, 1998). Syntéza buňkami probíhá po dlouhou dobu ve vyšších koncentracích po stimulaci endotoxiny, prozánětlivými cytokiny či látkami různého charakteru na úrovni transkripce (Su *et al.*, 2005). Původní domněnkou bylo, že produkce iNOS je spouštěna pouze při patologických procesech. Nyní je dokázáno, že je iNOS zapojena i do běžných fyziologických procesů jako ovulace či březost (Herrero *et Gagnon*, 2001).

Regulace aktivity syntázy oxidu dusnatého

Pro aktivaci izoform NOS je nutná dimerizace k vytvoření funkčního enzymu. Regulace aktivity syntázy oxidu dusnatého se účastní řada faktorů. První byla popsána úloha kalmodulinu. Důležitým kofaktorem, regulující NOS, je H4B, který je přítomen při redukci železa v hemu při syntéze oxidu dusnatého (Stuehr, 1999). H4B se účastní reakce dvěma způsoby, a to stabilizací dimerové struktury NOS a podpořením navázání L-argininu, dále slouží jako donor elektronů (Werner *et al.*, 1998). Vliv na aktivitu NOS má i fosforylační efekt nNOS a eNOS protein kinázou C nebo A, což je spojováno se ztrátou enzymu z buněčné membrány a dále to souvisí se ztrátou aktivity (Bredt *et al.*, 1992, Michel *et al.*, 1993).

Na nNOS se nachází vazebné místo pro PIN (Protein Inhibitor of NOS), jehož role je zatím nejasná, ale zřejmě reguluje NOS v závislosti na své koncentraci (Jaffrey *et Snyder*, 1996). Podstatným bodem pro regulaci aktivit NOS je zachování stability její mRNA a regulaci její degradace (Nathan *et Xie*, 1994). Mezi mechanismy regulující degradaci syntázy oxidu

dusnatého patří i kaskády zahrnující systém ubiquitin-proteasom, proteázu kalpain a regulace HSP-90 chaperony (Osawa *et al.*, 2003). Do regulace aktivity NOS je zapojena svým účinkem i molekula chaperonu HSP-90 (Heat Shock Protein 90), jež dvojnásobně až třínásobně navyšuje aktivitu eNOS pomocí allostérického efektu (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). HSP-90 je zřejmě zapojen do degradace izoform syntázy oxidu dusnatého. Inhibice HSP-90 napomáhá k syntéze monomerní formy NOS, to vede ke zvýšení degradace enzymu.

1.4.3 Účinky NO ve tkáních

Účinky NO v organismu

Oxid dusnatý působí nejen jako neurotransmiter, vazodilatátor, inhibitor agregace trombocytů, ale také jako významný regulátor pohlavních funkcí. Při nadměrné či nedostatečné syntéze oxidu dusnatého může dojít k poruchám fyziologických funkcí. NO se v organismu podílí na mechanismu septického šoku, bolestech hlavy a stavech migrény či hypertenzi, infarktu myokardu, osteoporóze a i v diabetu (Kupková *et Beneš*, 2004).

Důležitou roli hraje oxid dusnatý svými vazodilatačními účinky v kardiovaskulárním systému. Navázáním na železo hemu s následným uvolněním histidinu stimuluje aktivitu rozpustné guanylát cyklázy (sGC), která se účastní přeměny guanosin trifosfátu (GTP) na cyklický guanosin monofosfát (cGMP). cGMP snižuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů a vyvolává hladkosvalovou relaxaci. Oxid dusnatý se účastní regulace krevního tlaku a tonusu cév, inhibice agregace krevních destiček a adheze neutrofilů k cévnímu endotelu, oslabuje aktivaci leukocytů a celistvost endoteliálních buněk endokardu (Moncada *et al.*, 1991, Murad, 1994).

Při S-nitrosylaci oxid dusnatý disponuje schopností se vázat v aminokyselinách, peptidech a proteinech na thiolovou skupinu (-SH) glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GADPH), což má za následek pokles glykolytické aktivity související s neurotoxicitou a potlačením mitochondriální respirace a zastavením kontrakcí myokardu (Moncada *et al.*, 1991, Rosselli *et al.*, 1998). S-nitrosylací dochází k modifikaci iontových kanálů, kináz, proteolytických enzymů či transkripčních faktorů a jejím prostřednictvím lze regulovat například apoptózu (Stamler, 1994, Kokkola *et al.*, 2005).

V centrálním nervovém systému je oxid dusnatý významnou signální molekulou (Dawson *et Dawson*, 1996), mající vliv na tvorbu synapsí a apoptózu (Hess *et al.*, 1993, Němcová, 1999). Oxid dusnatý se účastní fáze učení a vytváření paměťových stop (Yun *et al.*, 1997). NO je jedním z mediátorů bolesti, může mít důležitou úlohu při vzniku morfinové tolerance a při vzniku závislosti na kokainu a alkoholu (Němcová, 1999, Kupková *et Beneš*, 2004). Oxid dusnatý má významnou roli v nespecifické obraně organismu (Webb *et al.*, 2001).

Zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu (Kupková *et Beneš*, 2004). Při zánětlivých reakcích vyvolávají cytokiny expresi iNOS a syntézu NO.

Oxid dusnatý se také účastní obranyschopnosti mukózní vrstvy gastrointestinálního traktu (Kulkarni *et al.*, 2001) a regulace sekrece insulinu (Ort *et al.*, 2000).

Oxid dusnatý reguluje sekreci hormonů v hypotalamo-hypofyzární ose. Může se účastnit inhibice sekrece oxytocinu, luteinizačního hormonu a růstového hormonu (Garthwaite *et Boulton*, 1995). NO může mít vliv na sekreci GnRH a syntézu estradiolů. Má také vliv na sexuální chování (Dixit *et Parvizi*, 2001). NO funguje jako mediátor erekce penisu. Použitím inhibitorů NOS dochází kablokování erekce (Burnett *et al.*, 1992). Oxid dusnatý svým efektem ovlivňuje motilitu a životaschopnost spermií, akrozomovou reakci, kapacitaci, aktivaci spermií či fúzi gamet (Revelli *et al.*, 2001, Herrero *et Gagnon*, 2001).

Vliv NO na reprodukci samic

Oxid dusnatý se podílí jako významná signální molekula jak přímo prostřednictvím jeho syntézy ovariální tkáně (eNOS, iNOS), tak nepřímo přes centrální nervovou soustavu přes hypotalamo-hypofyzární osu (nNOS), kde NO stimuluje uvolňování gonadotropin releasing hormonů (GnRH) z hypotalamu pravděpodobně prostřednictvím cGMP (Dixit *et Parvizi*, 2001). GnRH reguluje sekreci hormonů řídících pohlavní cyklus samic, FSH a LH, majících vliv na růst a zrání oocytů a ovulaci. Vzrůstem hladiny oxidu dusnatého dochází ke vzrůstu LH indukující zahájení ovulace (Dixit *et Parvizi*, 2001). Do této regulace se zapojí i NO z ovariální tkáně. Přítomnost syntázy oxidu dusnatého byla prokázána v ováriích, kde je NOS zapojena do mnoha reprodukčních procesů jako je folikulogeneze, funkce *corpus luteum* a meiotické zrání oocytu a relaxaci děložního svalstva prostřednictvím působení cGMP (Mc Can *et al.*, 2003). Oxid dusnatý je známým faktorem podílejícím se na přežití folikulů na vaječniku potkana, který inhibuje fragmentaci DNA v granulózních buňkách (Bu *et al.*, 2003).

U člověka byla zaznamenána exprese eNOS v luteálních a granulózních buňkách (Van Voorhis *et al.*, 1994). eNOS byla také popsána u potkana v murálních granulózních buňkách (Jablonka-Shariff *et Olson*, 1997), v cévách dřeně vaječniku (Van Voorhis *et al.*, 1995), luteálních a thekálních buňkách potkana (Zackrisson *et al.*, 1996) a u prasete v granulózních buňkách (Ponderato *et al.*, 2000, Takesue *et al.*, 2001, Chmelíková *et al.*, 2009). Exprese iNOS byla prokázána také v granulózních buňkách primárních, sekundárních a malých antrálních folikulů (Van Voorhis *et al.*, 1995, Matsumi *et al.*, 1998, Chmelíková *et al.*, 2009). Avšak některé studie naopak přítomnost iNOS v granulózních buňkách potkana (Jablonka-Shariff *et Olson*, 1997) a prasete (Ponderato *et al.*, 2000) nepotvrdili. Exprese iNOS a eNOS je regulována gonadotropními hormony. Exprese iNOS v bovinních thekálních buňkách byla navozena TNF- α

faktorem (Brunswig-Spickenheier *et al.* Mukhopadhyay, 1997). Expres eNOS v ovárii potkana nebyla zaznamenána (Jablonka-Shariff *et al.* Olson, 1997). Expres eNOS byla potvrzena v bovinních oocytech (Tesfaye *et al.*, 2006) a prasečích oocytech (Chmelíková *et al.*, 2009).

V prasečích oocytech byla prokázána expres eNOS během vývoje folikulů. Oocyty z folikulů menších než 2 mm a větších než 7 mm v průměru byly podrobeny analýze (Takesue *et al.*, 2003), avšak velikost oocytů sledována nebyla. Množství eNOS bylo vyšší v oocytech izolovaných z velkých folikulů než v oocytech z malých a středně velkých folikulů (Takesue *et al.*, 2003, Tao *et al.*, 2004). Imunocytochemickou metodou byla eNOS lokalizována na periférii oocytů z primordiálních a z antrálních folikulů. Vztah exprese všech izoform NOS k meiotické kompetenci v rostoucích prasečích oocytech v průběhu růstové fáze oocytu a procesu získávání meiotické kompetence se množství NOS zvyšovalo (Chmelíková *et al.*, 2009).

Imunocytochemická lokalizace NOS v různých ovariálních buňkách prasete a potkana v průběhu folikulárního vývoje poukazuje na rozdílnou expresi NOS v jednotlivých typech buněk (Zackrisson *et al.*, 1996, Jablonka-Shariff *et al.* Olson, 1997, Kim *et al.*, 2005). Izoforma eNOS byla exprimována na povrchu epitelu ovária, ve stromatu ovárií, v endotelových a thekálních buňkách cév ovárií prasete. Při srovnání imunoreakce jednotlivých izoform byla aktivita eNOS intenzivnější oproti aktivitě iNOS a nNOS (Kim *et al.*, 2005). V prasečích oocytech oxid dusnatý není pravděpodobně důležitým faktorem při formování antra folikulu a ani v růstu folikulu v této fázi vývoje (Tao *et al.*, 2004). O vlivu oxidu dusnatého na růst folikulů svědčí studie, v níž Hattori *et al.* (1996) prokázali navýšení exprese receptorů epidermálního růstového faktoru v granulózních buňkách u potkanů.

Folikulogeneze je nejen proces růstu buněk, ale také proces programované buněčné smrti (apoptózu). Oxid dusnatý je regulátorem obou těchto procesů (Sugino *et al.*, 1996) NO pravděpodobně navozuje folikulární vývoj, ale ne apoptózu. I když nízké koncentrace oxidu dusnatého mohou apoptóze předcházet, patologicky vysoké koncentrace oxidu dusnatého mohou buněčnou smrt vyvolat (Rosselli *et al.*, 1998).

Vliv NO na zrání oocytů

Oxid dusnatý hraje důležitou roli v procesu meiotického zrání savčích oocytů. Studie provedené na myších s vyblokováním genu pro eNOS vedly k narušení zrání oocytů *in vitro* i *in vivo*, což se projevilo zpomalením procesu rozpadu zárodečného vaku a snížením počtu oocytů schopných dozrát do stádia metafáze II (Jablonka-Shariff *et al.* Olson, 1998, 2000).

Studie zaměřené na stimulaci donory oxidu dusnatého na meiotické zrání oocytů naznačují dvojitý účinek donorů NO (Thaler *et al.* Epel, 2003). Nitroprusid sodný (SNP), je-li použit v nízkých koncentracích, podporuje meiotické zrání oocytů (10 nmol/L-100 μmol/L, Sengoku *et al.*

al., 2001, Bu *et al.*, 2003). V případě použití vysokých koncentrací donorů NO (SNP, SNAP) dochází ke zpoždění meiotického zrání (Nakamura *et al.*, 2002, Bu *et al.*, 2004). V prasečích oocytech je produkce oxidu dusnatého podporována estradiolem v přítomnosti ionomycinu, což vede k přechodnému zvýšení hladiny intracelulárních vápenatých iontů (Hattori *et al.*, 2004). V prasečích oocytech jsou přítomny receptory estrogenu (ER α), ale v kumulárních buňkách jsou přítomny receptory estrogenu typu ER α a ER β (Hattori *et al.*, 2004).

Ve studii zabývající se vlivem nitroprusidu sodného na meiotické zrání bovinních oocytů v *in vitro* podmínkách (Viana *et al.*, 2007) se ukázalo, že při vysokých koncentracích (3-10 M) SNP oocyty setrvávají po 24 hodinové kultivaci v metafázi I a nebyla zaznamenána expanze kumulu. Nitroprusid sodný v koncentraci 5-10 M meiotické zrání podporoval, znásobila se migrace kortikálních granulí a počet blastocyst. Tyto výsledky u bovinních oocytů opět potvrzují dvojitý účinek NO na meiotické zrání oocytů.

Existuje mnoho mechanismů, prostřednictvím kterých může oxid dusnatý ovlivňovat meiotické zrání oocyty. Jedním z nich je pravděpodobně regulace intracelulární produkce cyklických nukleotidů. NO aktivuje rozpustnou guanylát cyklázu (sGC), tím dochází ke zvýšení hladiny cGMP v cílových buňkách (Schmidt *et al.*, 1993). cGMP byl nalezen v granulózních buňkách ovárií potkana a je zapojen do znovuzahájení meiotického zrání oocytů potkana (Dail *et al.*, 1980, Törnell *et al.*, 1984, 1991). cGMP snižuje hladinu cAMP v oocyty aktivací cAMP-fosfodiesterázy (cAMP-PDE), a tím umožní oocyty pokračovat v procesu meiotického zrání a GVBD (Hubbard *et al.*, 1988). Oxid dusnatý ovlivňuje hladinu cAMP, buď navýšením syntézy cGMP anebo stimulací cAMP-PDE během přestupu oocyty z metafáze I do metafáze II (Jablonka-Shariff *et al.*, 1998).

Role NO při partenogenetické aktivaci prasečích oocytů

Oxid dusnatý se účastní i aktivace savčích oocytů, neboť donory oxidu dusnatého jsou schopny aktivovat oocyty prasete. Použité donory (SNP, SNAP) v závislosti na své koncentraci aktivovaly oocyty prasete dozrálé v *in vitro* podmínkách. SNP aktivoval menší počet oocytů a při vyšší koncentraci oocyty poškozoval. SNAP je vhodnější donorem pro aktivaci oocytů prasete prostřednictvím působení přes NO-dependentní signální kaskádu. SNAP byl schopen aktivovat prasečí oocyty ale až po 10 hodinách (Petr *et al.*, 2005b). Pro aktivaci oocytů prasete prostřednictvím donoru SNAP je nutná poměrně dlouhá expozice oocytů tomuto donoru (Petr *et al.*, 2005b). Tím se odlišuje aktivace NO-dependentní signální kaskády od aktivace látkami zvyšujícími vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů, u kterých stačí kultivace oocytů jen po několik minut (Macháty *et al.*, 1997a, b, Jílek *et al.*, 2000). Zpomalený efekt NO mohl být ovlivněn prostupností donoru oxidu dusnatého do oocyty. Existuje možnost, že vystavení oocyty

účinku donoru NO delší dobu znemožňuje optimální buněčnou signalizaci. Opakovaná krátkodobá kultivace s donorem NO (SNAP) je pro aktivaci oocytů účinnější, výsledky studie prokazují zvýšenou vývojovou schopnost partenogenetických embryí (Petr *et al.*, 2010). Takovýto aktivační stimul je neplnohodnotný, o čemž svědčí i velmi nízká vývojová schopnost partenogeneticky aktivovaných embryí a velmi nízký podíl dělicích se embryí, kdy dělení nepokračuje za stádium 8 blastomer (Petr *et al.*, 2005b). Aktivace oocytů prasete prostřednictvím donorů NO nevykazuje ve své škále kompletní spektrum procesů, jež jsou typické pro oplození spermii, ale ani pro aktivaci oocytů pomocí jiných metod (např. calcium ionophorem – Jílek *et al.*, 2000 nebo elektrickými stimuly – Procházka *et al.*, 1992). Oocyty aktivované pomocí donorů NO nevykazují exocytózu kortikálních granúl, k níž by došlo do 6 hodin po penetraci spermie (Yoshida *et al.*, 1993).

Oocyty žab *Xenopus laevis* díky své podobnosti průběhu procesu meiotického zrání spolu se savčími oocyty byly zvoleny jako další biomedicínský model, kde jsme si stanovili za cíl prokázat vliv oxidu dusnatého prostřednictvím donoru SNAP na partenogenetickou aktivaci žabích oocytů.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hlavní hypotézou práce bylo, že gasotransmitery (NO a H₂S) jsou mediátory fyziologických procesů u oocytů modelových organismů prasete a žab *Xenopus laevis*:

a) U prasečích oocytů byla stanovena hypotéza, že signální molekula sirovodíku je aktivně zapojena do regulace procesu stárnutí prasečích oocytů.

K ověření této hypotézy bylo vytyčeno několik dílčích cílů:

- Prokázat přítomnost enzymů a popsat jejich zapojení do endogenní produkce sirovodíku během stárnutí prasečích oocytů.
- Ověřit vliv zvýšené hladiny sirovodíku prostřednictvím donoru na průběh stárnutí prasečích oocytů.
- Ověřit vliv inhibice enzymů zapojených do endogenní produkce sirovodíku na průběh stárnutí prasečích oocytů.

b) U oocytů žab *Xenopus laevis* byla stanovena hypotéza, že signální molekula oxidu dusnatého je aktivně zapojena do procesu partenogenetické aktivace žabích oocytů.

K ověření této hypotézy bylo vytyčeno několik dílčích cílů:

- Prokázat vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na změny probíhající během partenogenetické aktivace oocytů - na indukci kortikální reakce, na aktivitu MAPK a MPF a na kinetiku partenogenetické aktivace.
- Vliv NO-scavengeru CPTIO na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* prostřednictvím SNAP.
- Závislost efektu donoru oxid dusnatého SNAP na zvýšení intracelulární hladiny vápníku.

3 METODIKA PRÁCE

3.1 Prasečí oocyty

Získávání a výběr oocytů

Vaječníky prasat byly odebírány z prasníc poražených na jatkách v neznámém stádiu pohlavního cyklu a poté ihned transportovány ve fyziologickém roztoku (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 38-39 °C do laboratoře. Z vaječnicků byly získávány oocyty aspirací folikulární tekutiny z folikulů jehlou 20G (Sterican, Braun Melsungen, Německo). Oocyty byly vybírány o velikosti 120 μm s ukončeným růstem (z folikulů o průměru 2-5 mm) pomocí tenké skleněné kapiláry. Pro experimenty byly použity oocyty s kompaktním kumulem a neporušenou cytoplazmou.

Kultivace oocytů

Tyto oocyty byly kultivovány ve 3 ml modifikovaného média M199 (obsahujícím hydrogenuhličitan sodný, laktát vápenatý, pyruvát sodný, gentamycin, HEPES, 10% telecího séra) a s přídavkem PG 600 (eCG:hCG) v Petriho miskách (o průměru 3,5 cm) při teplotě 39 °C, ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem po dobu 48 hodin do metafáze druhého meiotického dělení (MII). Následně byly z oocytů odstraněny kumulární buňky mechanickým způsobem pomocí tenkostěnné skleněné kapiláry či automatické pipety, nasáváním a vysáváním oocytů a poté oocyty byly vystaveny prodloužené kultivaci (stárnutí).

Kultivace stárnoucích oocytů

Dozrálé oocyty, zbavené kumulárních buněk pomocí tenkostěnné skleněné kapiláry, byly kultivovány v modifikovaném médiu M199 bez přídavku PG 600. Kultivace probíhala v Petriho miskách o průměru 3,5 cm ve 3 ml kultivačního média při teplotě 39 °C, ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem po dobu 24, 48 a 72 hodin. V experimentech zaměřených na sledování vlivu zvýšené hladiny sirovodíku do pokusných skupin jsme přidávali do média donory sirovodíku Na₂S. V experimentech zaměřených na sledování vlivu inhibice enzymů, zodpovědných za endogenní produkci sirovodíku v oocytu, jsme přidávali u pokusných skupin do média příslušné specifické inhibitory. Jako inhibitor cystathionin β-syntázy (CBS) byla použita 1000 μM kyselina oxamová. Jako inhibitor cystathionin γ-lyázy (CTH) byl použit 100 μM D,L-propargylglycin.

Hodnocení oocytů

Po skončení prodloužené kultivace byly oocyty fixovány v roztoku etanol:kyselina octová (3:1) po dobu 48 hodin. Poté preparáty s nafixovanými oocyty obarveny 1 % vodným roztokem orceinu a vývojová stádia oocytů hodnocena pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

Do experimentu byly zařazeny dozrálé oocyty tehdy, pokud dosáhly MII v 85 % po 48 hodinách kultivace. Hodnocené oocyty byly rozřazeny do 4 skupin dle vývojové fáze, ve které se nacházely: MI (stárnoucí oocyty, které zůstaly v metafázi druhého meiotického dělení), spontánně partenogeneticky aktivované oocyty (stárnoucí oocyty s prvojádry a časná stádia embryí), fragmentované oocyty (apoptotické změny u stárnoucích oocytů) a lytické oocyty (nekrotické změny u stárnoucích oocytů).

Lokalizace enzymů, katalyzujících v oocytu syntézu H₂S, během stárnutí prasečích oocytů

Imunohistochemická analýza

Z oocytů byla odstraněna *zona pellucida* prostřednictvím manipulačního média s přidávkou 0,1 % pronázy. Dále byly oocyty opláchnuty v 0,1% BSA (bovinní sérový albumin) v PBS a poté nafixovány ve 2,5 % paraformaldehydu v PBS při teplotě 39 °C. Nafixované oocyty byly následně ošetřeny 0,5 % Tritonem X-100 v PBS při laboratorní teplotě. Poté byly oocyty opláchnuty v 0,1 % Tweenu 20 v PBS a inkubovány přes noc při teplotě 4 °C ve vlhkém prostředí v inkubačním médiu (0,1 % BSA a 0,01 % Tween 20 v PBS) s primární protilátkou (anti-CBS, anti-CTH, Sigma-Aldrich), naředěnou v poměru 1:100. Nenavázané protilátky byly z oocytů odmyty v roztoku 0,1 % Tween 20 v PBS při laboratorní teplotě. Poté oocyty inkubujeme ve tmě po dobu jedné hodiny se sekundárními protilátkami anti-králičí nebo anti-myší IgG konjugovanou s fluoresceinizothiokyanátem (FITC, Jackson ImmunoResearch). Po uplynutí inkubační doby byly oocyty třikrát promyty v roztoku 0,1 % Tween 20 v PBS a následně ještě ponechány v roztoku 0,1 % BSA. Pro zviditelnění chromatinu byly oocyty inkubovány po dobu 15 minut v barvivu Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Následně byly oocyty opláchnuty v ekvilibračním pufru a v kapce glycerolu přeneseny v PBS na podložní sklíčko a překryty krycím sklíčkem. Poté byly tyto preparáty hodnoceny na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu (Leica SPE, Německo).

Statistické hodnocení

Data byla analyzována Analýzou rozptylu/ANOVA, konkrétně byl použit t-test a test normality (Kolmogorov-Smirnovův test), použitím statistického softwaru (STATISTICA 9.0, StatSoft). Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Všechny dílčí experimenty byly prováděny minimálně ve 3 opakováních a v počtu minimálně 120 oocytů ve skupině.

3.2 Oocyty žab *Xenopus laevis*

Získávání a kultivace žabích oocytů

Žáby *Xenopus laevis* byly získávány z Univerzity v Rennes I (Francie). Po anestézii samic ponorením do vody s přidavkem 1 g/l MS222 (roztok tricaine metan sulfonátu, Sandoz) byly chirurgicky odstraněny ovariální laloky a umístěny do média ND96 (96 mM NaCl, KCl 2 mM, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES-NaOH, pH 7,5). Plně dorostlé oocyty (stádium VI) byly izolovány a částečně defolikulovány 30 minut kolagenózou (1 mg/ml kolagenázy, Roche Applied Science), po níž následovala ruční defolikulace. Oocyty byly kultivovány v médiu ND96 a uskladněny ve 14 °C až do začátku experimentu. Znovuzahájení meiózy bylo navozeno kultivací oocytů v médiu ND96 s progesteronem o koncentraci 10 μM (Sigma-Aldrich) v 19 °C. Proces meiotického zrání byl hodnocen podle výskytu bílé plochy na animálním pólu oocytu. Pro partenogenetickou aktivaci byla typická pigmentová přestavba při kortikální reakci.

Calcium Limited Medium = CaLim (120 mM NaCl, KCl 7,5 mM, 500 μM MgSO₄, 150 μM CaCl₂, HEPES 22,5 μM, 400 μM EDTA, pH 7,4) a Calcium Free Medium = CaFree (96 mM NaCl, KCl 2 mM, 5 mM MgCl₂, HEPES 5 mM, EGTA 500 μM, pH 7,4) obě média byla připravena 1 hodinu před použitím. Zásobní roztoky Calcium ionophoru A23187 (100 mM, Boehringer Mannheim), BAPTA-AM (100 mM, Sigma-Aldrich) byly rozředěny v DMSO a uskladněny při -20 °C. Donor oxidu dusnatého SNAP (Alexis Corp.) a také scavenger oxidu dusnatého-CPTIO (Alexis Corp.) byl připraven čerstvý ve vhodných médiích (1 hodinu před použitím).

Mikroinjekce

CPTIO a extrakty cytoplasmy z oocytů byly injikovány do nezralých oocytů prostřednictvím objemové digitální mikropipety (Nichiryo) a kultivovány v médiu ND96. Mikroinjekce CPTIO (15 nl 40 mM zásobního roztoku) by měla mít schopnost získat pro oocyty zpět alespoň 1 hodinu. Oocyty byly kultivovány s progesteronem během procesu meiotického zrání přes noc. Oocyty vybrané pro mikroinjekce cytoplasmy byly zastaveny ve stádiu MII, opláchnuty od progesteronu a použity jako dárci extraktů cytoplasmy, ty pak byly injikovány do nezralých oocytů (v dávce 50 nl/oocyt).

Cytologické analýzy

Pro cytologické analýzy byly oocyty fixovány přes noc ve Smith fixativu, poté dehydrovány a zality do parafínu. Řezy oocytů (o tloušťce 7 μm) byly obarveny barvivou Nuclear Red, sloužící k obarvení jádra a chromozomů a Picroindigo Carmine, zviditelňující cytoplazmatické struktury (Bodart *et al.*, 2005).

Imunoprecipitace

Imunoprecipitace Cdk1 byla provedena v dávce 30 lyzovaných oocytů ve 300 μl pufru (50 mM HEPES, pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,05 % SDS, 0,5 % Triton X100, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml bovinního sérového albuminu, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ inhibitoru sojového trypsinu, 10 $\mu\text{g/ml}$ benz-amidinu, 1 mM PMSF, 1 mM vanadičanu sodného). Po centrifugaci při 4 $^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut při otáčkách 10 000 g byly supernatanty inkubovány s protilátkami anti-Cdk1 (1:200, Invitrogen) po dobu 2 hodin při teplotě 4 $^\circ\text{C}$. Protein A-Sepharose (5 mg, Sigma) byl přidáván po dobu 1 hodiny při teplotě 4 $^\circ\text{C}$. Imunokomplexy byly nashromážděny centrifugací, třikrát opláchnuty, resuspendovány ve vzorkovém Laemmli pufru a vystaveny 10 % SDS-PAGE analýze metodou Western blot použitím protilátek anti-Cdk1 (A17, Santa Cruz Biotechnology, 1/10 000) a anti-cyklinu B2 (X121.10, Santa Cruz Biotechnology, 1/5 000).

Western blot

Oocyty byly lyzovány v homogenizačním pufru a centrifugovány 5 minut při 10 000 otáčkách při 4 $^\circ\text{C}$, aby došlo k odstranění žlutkových destiček. K supernatantům byl přidán stejným množstvím dílem Laemmli 2X pufr s přídavkem 4 % β -merkptoethanolu, směs byla zahřáta na 100 $^\circ\text{C}$ po dobu 3 minut a uskladněna při teplotě -20 $^\circ\text{C}$ až do analýzy. Proteiny z oocytů byly odděleny pomocí metody SDS-PAGE (gely o hustotě 15-17 %) a přeneseny na nitrocelulóзовé membrány (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie). Bloty byly blokovány 5 % nízkotučným sušeným mlékem a inkubovány se specifickými protilátkami. p90Rsk byl detekován pomocí polyklonální králičí protilátky (p90Rsk1 C-21sc231, Santa Cruz Biotechnology, 1/1 000), Xp42MPK1 byla zjištěna pomocí myší monoklonální protilátky (Erk2 D-2sc1647, Santa Cruz Biotechnology, 1/500), cyklin B byl detekován pomocí myší monoklonální protilátky (SC-53239, Santa Cruz Biotechnology, 1/1 250), anti-MOS (C237, Santa Cruz Biotechnology, 1/5 000), anti-P-H3 protilátky (S10, Cell Signaling, 1/5 000) a P-tyrozin 15 Cdk1 byly detekovány kultivací přes noc s myší monoklonální protilátkou (tyrozin 15 Cell, 1/10 000). Nitrocelulóзовé membrány po inkubaci s primárními protilátkami byly poté

inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami (1/2 500). Signály byly zjištěny pomocí chemiluminiscenčního testu (ECL Blotting Detection Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie).

Hodnocení Ca²⁺

Před samotnými experimenty bylo indukováno znovuzahájení meiotického zrání oocytů ve stádiu VI kultivací s progesteronem o koncentraci 10 μ M. Pro „zobrazení“ vápníku byly oocyty označeny vápník-senzitivními non-radiometrickými fluorescenčními sondami Fluo4 (acetoxy-methyl-ester derivát, Fluo4-AM, 25 μ M) a excitace se prováděla při 494 nm a emise při 516 nm. Barviva byla přítomna alespoň 5 hodin (Fluo4-AM).

Fluorescenční experimenty byly prováděny při pokojové teplotě (18-20 °C) v médiu ND96 spolu se SNAP o koncentraci 5 mM. Některé z experimentů byly provedeny se známým chelátorem vápníku BAPTA-AM. Oocyty ve stádiu MII byly inkubovány s BAPTA-AM o koncentraci 50 μ M po dobu 30 minut (Marin *et al.*, 2010, Marin, 2012). Každou minutu byla prováděna akvizice na animálním pólu oocytu použitím epifluorescenčního skenovacího systému namontovaného na mikroskopu Nikon (Paříž, Francie). Snímky byly získávány Nikon®softwarem (NIS Elements AR 3.00) a analyzovány pomocí Image J®softwarem (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Fluorescence byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách, ve kterých bylo pozadí a autofluorescence odečtena. Experimenty byly minimálně třikrát opakovány vždy v počtu 3 oocytů.

Měření metabolitů oxidu dusnatého

Produkce oxidu dusnatého byla stanovena pomocí kolorimetrického měření metabolitů NO, dusitanů a dusičnanů ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$). Dusičnany byly enzymaticky přeměněny NO-reduktázou na dusitany. Dusitany byly kvantifikovány pomocí Griessových činidel (p-aminobenzensulfonamid v 3,0 N-HCl a N-(1-naftyl) ethylendiamindichlorid). Množství dusitanů bylo měřeno spektrofotometricky na mikrotitračních destičkách použitím metody ELISA reader Rainbow o vlnové délce 520 nm (Rakousko, SLT).

Statistická analýza

Data byla analyzována Analýzou rozptylu (Schéffeho testem) použitím statistického softwaru (STATISTICA 8.0, StatSoft). Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

4 EXPERIMENTÁLNÍ SCHÉMA

4.1 Prasečí oocyty

Ke všem experimentům byla prováděna kontrola zrání oocytů. Do dalšího hodnocení byly zahrnuty výsledky z experimentů, ve kterých více než 85 % oocytů dosáhlo po 48 hodinách kultivace stádia MII. Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty dále kultivovány dle schématu konkrétních experimentů.

Detekce a lokalizace enzymů, zapojených do endogenní produkce sirovodíku během stárnutí prasečích oocytů

V tomto experimentu jsme se zaměřili na detekci a lokalizaci enzymů, zodpovědných za endogenní produkci sirovodíku, během stárnutí prasečích oocytů.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 po dobu 24, 48 a 72 hodin. Poté byla prováděna detekce enzymů imunohistochemickou analýzou.

Vliv zvýšené hladiny sirovodíku na stárnutí prasečích oocytů

V rámci tohoto experimentu bylo navrženo několik dílčích experimentů:

Sledování vlivu jednotlivých koncentrací donoru sirovodíku Na₂S

Tento experiment byl zaměřen na nalezení efektivní koncentrace donoru Na₂S.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem donoru Na₂S v koncentracích: 75 μM, 150 μM, 300 μM a 600 μM. Prodloužená kultivace probíhala 72 hodin. Kontrolní skupina byla kultivována pouze v čistém modifikovaném médiu M199.

Vliv donoru Na₂S v koncentraci 150 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů

Zde byla testována efektivní koncentrace donoru sirovodíku Na₂S – 150 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem 150 μM Na₂S po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Vliv donoru Na₂S v koncentraci 300 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů

V tomto experimentu byla testována druhá efektivní koncentrace donoru sirovodíku Na₂S - 300 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem 300 μM Na₂S po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Vliv inhibice enzymů, katalyzujících v oocytu syntézu sirovodíku, použitím specifických inhibitorů

Vliv inhibice cystathionin β -syntázy na průběh stárnutí prasečích oocytů

a) Experiment byl zaměřen na sledování vlivu inhibice enzymu katalyzujícího syntézu sirovodíku – cystathionin β -syntázy, působením inhibitoru kyseliny oxamové, na průběh stárnutí prasečích oocytů.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem 1000 μM kyseliny oxamové po dobu 24, 48 a 72 hodin.

b) V tomto experimentu byla také prováděna reverze účinku inhibitoru kyseliny oxamové pomocí donoru sirovodíku Na_2S ve své efektivní koncentraci 300 μM .

Oocyty v MII po odstranění kumulárních buněk byly rozděleny do čtyř skupin. V první skupině byly oocyty dále kultivovány pouze v modifikovaném médiu M199. Ve druhé skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván inhibitor kyselina oxamová v koncentraci 1000 μM . Ve třetí skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván donor sirovodíku Na_2S v koncentraci 300 μM . V poslední skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván inhibitor kyselina oxamová v koncentraci 1000 μM i donor sirovodíku Na_2S v koncentraci 300 μM . Oocyty ve všech skupinách byly dále kultivovány 24 hodin.

Vliv inhibice cystathionin γ -lyázy na průběh stárnutí prasečích oocytů

a) V tomto experimentu jsme se zaměřili na sledování vlivu inhibice enzymu katalyzujícího syntézu sirovodíku – cystathionin γ -lyázy působením inhibitoru D,L-propargylglycinu na průběh stárnutí prasečích oocytů.

Oocyty byly dále kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem 100 μM D,L-propargylglycinu po dobu 24, 48 a 72 hodin.

b) V tomto experimentu byla také prováděna reverze účinku inhibitoru D,L-propargylglycinu pomocí donoru sirovodíku Na_2S ve své efektivní koncentraci 300 μM .

Oocyty v MII byly po odstranění kumulárních buněk rozděleny do čtyř skupin. V první skupině byly oocyty kultivovány pouze v modifikovaném médiu M199. Ve druhé skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván inhibitor D,L-propargylglycin v koncentraci 100 μM . Ve třetí skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván donor sirovodíku Na_2S v koncentraci 300 μM . V poslední skupině byl do modifikovaného média M199 přidáván inhibitor D,L-propargylglycin v koncentraci 100 μM i donor sirovodíku Na_2S v koncentraci 300 μM . Oocyty ve všech skupinách byly následně kultivovány 24 hodin.

4.2 Oocyty žab *Xenopus laevis*

Vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na změny probíhající během partenogenetické aktivace oocytů

V tomto experimentu jsme se zaměřili na kultivaci oocytů ve stádiu MII s donorem oxidu dusnatého SNAP a sledování vlivu SNAP na partenogenetickou aktivaci oocytů žab *Xenopus laevis*.

Indukce kortikální reakce

V experimentu byl zjišťován vliv SNAP o koncentraci 2,5 mM a 5 mM na indukci kortikální reakce typické pro partenogenetickou aktivaci oocytů a uvolňování lektinů. Oocyty v kontrolních skupinách byly kultivovány v médiu ND96, jako kontrola spontánní partenogenetické aktivace a v médiu ND96 s přidavkem calcium ionophoru o koncentraci 10 μ M, jako kontrola indukované partenogenetické aktivace.

Aktivita MPF a MAPK

V experimentu byl zjišťován u oocytů v MII fázi během meiotického zrání vliv 5 mM SNAP na aktivitu MPF a MAPK, kdy oocyty byly shromažďovány v době od 0 do 120 minut oproti kontrolní skupině oocytů kultivovaných s calcium ionophorem o koncentraci 10 μ M, jako kontroly indukované partenogenetické aktivace, kdy oocyty byly shromažďovány v době od 0 do 70 minut. V kontrolní skupině byly kultivovány oocyty v médiu ND96, jako kontrola spontánní partenogenetické aktivace.

Pomocí imunoprecipitace a metody western blot byly stanoveny klíčové komponenty Xp42MPK1, p90Rsk, Mos, cyklin B, Cdk1 a P-H3.

Kinetika partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis*

V experimentu byl zjišťován vliv SNAP na kinetiku partenogenetické aktivace oocytů oproti oocytům v kontrolních skupinách, kdy byly oocyty kultivovány v médiu ND96, jako kontrola spontánní partenogenetické aktivace a v médiu ND96 s přidavkem calcium ionophoru o koncentraci 10 μ M, jako kontrola indukované partenogenetické aktivace v době od 0 do 240 minut.

Vliv NO-scavengeru CPTIO na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* prostřednictvím SNAP

Experiment byl zaměřen na vliv mikroinjekcí NO-Scavengeru CPTIO (15 nl 40 mM zásobního roztoku) na indukovanou partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis*

prostřednictvím účinku oxidu dusnatého. Do nezralých oocytů byly jako kontrola mikroinjikovány extrakty cytoplasmy oocytů (v dávce 50 nl/oocyt) nebo voda. Oocyty byly dále kultivovány v médiu ND96.

Experiment byl také zaměřen na účinek přidání CPTIO do média ND96 na morfogenezi dělicího vřeténka, tvorbu a migraci prvojádra u oocytů *Xenopus laevis* v MII fázi po stimulaci s progesteronem prostřednictvím účinku oxidu dusnatého.

Závislost efektu donoru oxid dusnatého SNAP na zvýšení intracelulární hladiny vápníku

V tomto experimentu jsme se zaměřili na účinek zvýšené hladiny intracelulárního vápníku na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* při kultivaci oocytů ve stádiu MII spolu s 5 mM SNAP nebo s 50 nebo 100 μ M chelátorem vápníku BAPTA-AM. Pro „zobrazení“ vápníku byly oocyty označeny vápník-senzitivními non-radiometrickými fluorescenčními sondami Fluo4 (acetoxy-methyl-ester derivát, Fluo4-AM, 25 μ M).

Dále byl testován vliv SNAP na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* v médiu ND96 a v médiích s omezeným přístupem vápníku CaFree a CaLim. Pomocí imunoprecipitace a metody western blot byly stanoveny klíčové komponenty Xp42MPK1 a p90Rsk.

5 VÝSLEDKY

5.1 Prasečí oocyty

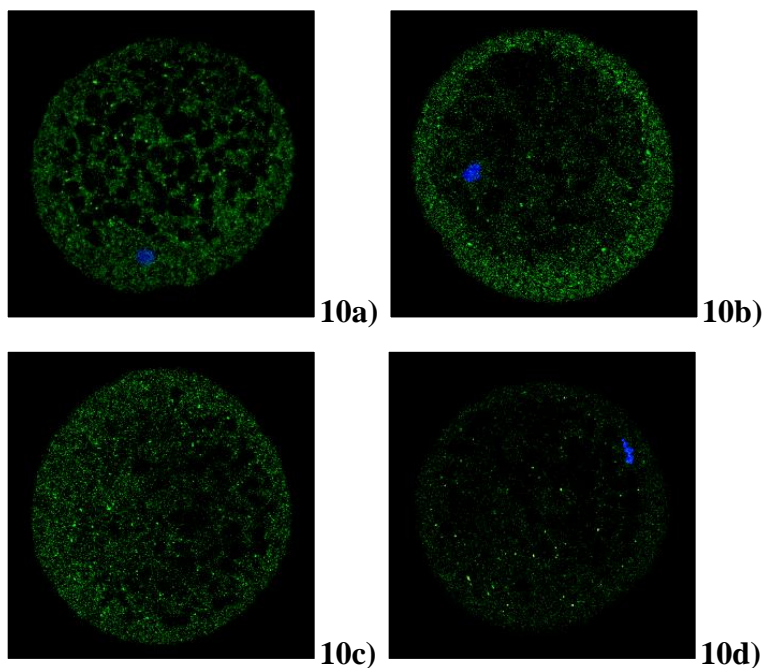
Detekce a lokalizace enzymů, zapojených do endogenní produkce sirovodíku, během stárnutí prasečích oocytů

V experimentu byla zjišťována přítomnost enzymů cystathionin β -syntázy (CBS) a cystathionin γ -lyázy (CTH, obr. č. 10 a-d) u oocytů v MII fázi a u oocytů kultivovaných 24, 48 a 72 hodin.

Enzym CBS nebyl nalezen.

Enzym CTH byl lokalizován v cytoplazmě oocytů v MII fázi a u oocytů kultivovaných 24, 48 a 72 hodin. Nejsilnější signál enzymu CTH byl sledován u oocytů v MII fázi, avšak intenzita signálu v průběhu procesu stárnutí slábla.

Obrázek č. 10: Přítomnost enzymu cystathionin γ -lyázy (CTH) u prasečích oocytů během procesu stárnutí.



10a) oocyt ve stádiu MII, 10b) oocyt kultivovaný 24 hodin, 10c) oocyt kultivovaný 48 hodin, 10d) oocyt kultivovaný 72 hodin. Zeleně byl označen enzym pomocí FITC, modře chromatin pomocí Hoechst 33528. Oocyty byly snímány v rovině jádra, zvětšení 400x.

Vliv zvýšené hladiny sirovodíku na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu byl zjišťován vliv zvýšené hladiny sirovodíku dodáním donoru Na₂S na průběh stárnutí prasečích oocytů.

V první fázi experimentu byl zjišťován **vliv prodloužené kultivace oocytů na změnu morfologického stavu oocytů prasete v *in vitro* podmínkách naší laboratoře**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace téměř všechny oocyty setrvaly ve stádiu MII a jen necelé 1 % oocytů podlelo spontánní partenogenetické aktivaci. Fragmentované a lytické oocyty po 24 hodinách stárnutí nebyly nalezeny.

Po 48 hodinách prodloužené kultivace bylo pozorováno statisticky významné snížení podílu oocytů ve stádiu MII a signifikantní zvýšení počtu spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů. Došlo k významnému zvýšení podílu fragmentovaných a lytických oocytů.

Po 72 hodinách prodloužené kultivace jsme pozorovali opět signifikantní snížení podílu oocytů ve stádiu MII a statisticky významné zvýšení podílu spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů, zvýšilo se i procento fragmentovaných oocytů. Podíl lytických oocytů se však statisticky významně neměnil.

Tabulka č. 1: Vliv prodloužené kultivace na změnu morfologického stavu oocytů prasete během procesu stárnutí v *in vitro* podmínkách naší laboratoře.

Doba stárnutí oocytů	24 hodin	48 hodin	72 hodin
MIII (%)	99,17 ^a	40,83 ^b	23,33 ^c
Aktivované oocyty (%)	0,83 ^a	37,50 ^b	47,50 ^c
Fragmentované oocyty (%)	0,00 ^a	18,33 ^b	25,83 ^c
Lytické oocyty (%)	0,00 ^a	3,34 ^b	3,34 ^b

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými hodinami prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

V druhé fázi experimentu byl sledován **vliv jednotlivých koncentrací donorů sirovodíku Na₂S na morfologický stav oocytů prasete po 72 hodinách prodloužené kultivace**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Oocyty byly podrobeny prodloužené kultivaci po dobu 72 hodin v přítomnosti donoru sirovodíku Na₂S v koncentracích: 75 μM, 150 μM, 300 μM a 600 μM.

Kontrolní skupina oocytů byla kultivována v čistém modifikovaném médiu M199 a po 72 hodinách stárnutí byla jedna pětina oocytů ve stádiu MII a jedna pětina oocytů fragmentovaných, téměř polovina oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována a 5,00 % oocytů bylo lytických.

V přítomnosti 75 μM Na₂S setrvala jedna pětina oocytů ve stádiu MII a jedna pětina oocytů fragmentovaných, polovina z počtu oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována a 4,17 % oocytů bylo lytických.

Po 72 hodinách kultivace v přítomnosti 150 μM Na₂S bylo statisticky významně více oocytů ve stádiu MII a spontánně partenogeneticky aktivovaných oproti předchozím skupinám. Fragmentace i lýza byla zcela potlačena.

V přítomnosti 300 μM Na₂S byla také zcela potlačena fragmentace i lýza po 72 hodinách stárnutí. Došlo k signifikantnímu zvýšení podílu oocytů ve stádiu MII a poklesu podílu spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů.

Po 72 hodinách stárnutí v přítomnosti 600 μM Na₂S setrval statisticky významný počet oocytů ve stádiu MII, polovina počtu oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována, desetina počtu oocytů byla fragmentována a necelé jedno procento oocytů bylo lytických.

Tabulka č. 2: Vliv donoru sirovodíku Na₂S na morfologický stav oocytů prasete po 72 hodinách prodloužené kultivace.

Donor sirovodíku	0 μM Na ₂ S	75 μM Na ₂ S	150 μM Na ₂ S	300 μM Na ₂ S	600 μM Na ₂ S
MII (%)	21,67 ^a	19,17 ^a	36,67 ^b	55,83 ^c	31,67 ^b
Aktivované oocyty (%)	46,67 ^{ab}	50,83 ^b	63,33 ^c	44,17 ^a	58,33 ^c
Fragmentované oocyty (%)	26,67 ^a	25,83 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	9,17 ^c
Lytické oocyty (%)	5,00 ^a	4,17 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,83 ^b

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly (P<0,05) mezi jednotlivými koncentracemi donoru sirovodíku Na₂S během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Ve třetí fázi experimentu byl zjišťován **vliv donoru Na₂S v koncentraci 150 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 150 μM Na₂S setrval plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 48 hodinách stárnutí v přítomnosti 150 μM Na₂S došlo k signifikantnímu snížení podílu oocytů na polovinu ve stádiu MII a signifikantnímu zvýšení podílu spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů na polovinu.

Po 72 hodinách stárnutí v přítomnosti 150 μM Na₂S se významně snížil podíl oocytů ve stádiu MII a významně zvýšil podíl oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných na více jak polovinu z počtu oocytů. Byla zde zcela potlačena fragmentace i lýza.

Tabulka č. 3: Vliv koncentrace donoru 150 μM Na₂S na průběh procesu stárnutí oocytů prasete.

150 μM Na ₂ S	24 hodin	48 hodin	72 hodin
MII (%)	100,00 ^a	50,00 ^b	36,67 ^c
Aktivované oocyty (%)	0,00 ^a	50,00 ^b	63,33 ^c
Fragmentované oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
Lytické oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly (P<0,05) mezi jednotlivými hodinami prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Ve čtvrté fázi experimentu byl zjišťován **vliv donoru Na₂S v koncentraci 300 μM na průběh stárnutí prasečích oocytů**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 300 μM Na₂S setrval plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 48 hodinách stárnutí v přítomnosti 300 μM Na₂S se statisticky významně snížil podíl oocytů ve stádiu MII a statisticky významně zvýšil podíl oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných.

Po 72 hodinách stárnutí setrvala více jak polovina oocytů ve stádiu MII a méně jak polovina oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována. Opět byla zcela potlačena fragmentace i lýza oocytů.

Tabulka č. 4: Vliv koncentrace donoru 300 μM Na₂S na průběh procesu stárnutí oocytů prasete.

300 μM Na₂S	24 hodin	48 hodin	72 hodin
MII (%)	100,00 ^a	76,67 ^b	55,00 ^c
Aktivované oocyty (%)	0,00 ^a	23,33 ^b	45,00 ^c
Fragmentované oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
Lytické oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými hodinami prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Vliv inhibice enzymů, katalyzujících v oocytu syntézu sirovodíku, použitím specifických inhibitorů

Cílem bylo ověřit vliv inhibice enzymů CBS a CTH zapojených do endogenní produkce sirovodíku na průběh stárnutí prasečích oocytů.

V první části experimentu byl zjišťován **vliv inhibice cystathionin β -syntázy prostřednictvím inhibitoru kyseliny oxamové o koncentraci 1000 μ M na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 1000 μ M kyseliny oxamové se nacházela většina oocytů ve stádiu MII, 6,67 % oocytů bylo spontánně partenogeneticky aktivováno a jedna pětina oocytů byla fragmentována.

Po 48 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 1000 μ M kyseliny oxamové došlo k významnému snížení podílu oocytů ve stádiu MII a statisticky významnému zvýšení podílu oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných.

Po 72 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 1000 μ M kyseliny oxamové došlo k navýšení podílu oocytů fragmentovaných a lytických.

Tabulka č. 5: Vliv 1000 μ M kyseliny oxamové (inhibitoru cystathionin β -syntázy) na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů.

CBS	24 hodin	48 hodin	72 hodin
MII (%)	71,67 ^a	25,83 ^b	20,83 ^b
Aktivované oocyty (%)	6,67 ^a	46,67 ^b	41,67 ^b
Fragmentované oocyty (%)	21,67 ^a	27,50 ^{ab}	33,33 ^b
Lytické oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	4,17 ^b

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými hodinami prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Ve druhé části experimentu byl zjišťován také vliv reverze účinku 1000 μM kyseliny oxamové (inhibitoru cystathionin β -syntázy) prostřednictvím 300 μM Na_2S . Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace bez přítomnosti 1000 μM kyseliny oxamové i 300 μM Na_2S se nacházel plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 1000 μM kyseliny oxamové došlo ke snížení podílu oocytů ve stádiu MII a mírnému nárůstu podílu oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných a oocytů fragmentovaných.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 300 μM Na_2S setrval plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 1000 μM kyseliny oxamové i 300 μM Na_2S setrval téměř plný počet oocytů ve stádiu MII, došlo k mírnému nárůstu podílu oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných, fragmentovaných i oocytů lytických.

Tabulka č. 6: Vliv reverze účinku 1000 μM kyseliny oxamové (inhibitoru cystathionin β -syntázy) prostřednictvím 300 μM Na_2S .

Skupina	M199	M199 + Oxamová kyselina 1000 μM	M199 + Na_2S 300 μM	M199 + Oxamová kyselina 1000 μM + Na_2S 300 μM
MI (%)	100,00 ^a	70,00 ^a	100,00 ^a	94,17^a
Aktivované oocyty (%)	0,00 ^b	8,33 ^b	0,00 ^b	4,17^a
Fragmentované oocyty (%)	0,00 ^a	21,67 ^a	0,00 ^a	0,83^a
Lytické oocyty (%)	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^a	0,83^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými experimentálními skupinami během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Ve třetí části experimentu byl zjišťován **vliv inhibice cystathionin γ -lyázy prostřednictvím inhibitoru D,L-propargylglycinu o koncentraci 100 μ M na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 7.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 100 μ M D,L-propargylglycinu zůstala polovina oocytů ve stádiu MII, pětina oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována a pětina oocytů fragmentována, 5,00 % oocytů bylo lytických.

Po 48 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 100 μ M D,L-propargylglycinu se snížilo procento oocytů ve stádiu MII a zvýšilo procento spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů. Fragmentovaných oocytů byla jedna čtvrtina a 3,33 % oocytů bylo lytických.

Po 72 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 100 μ M D,L-propargylglycinu došlo opět ke snížení podílu oocytů ve stádiu MII a zvýšení spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů. Zvýšil se podíl fragmentovaných oocytů. Podíl lytických oocytů se výrazně nezměnil.

Tabulka č. 7: Vliv 100 μ M D,L-propargylglycinu (inhibitoru cystathionin γ -lyázy) na průběh prodloužené kultivace prasečích oocytů.

CTH	24 hodin	48 hodin	72 hodin
MII (%)	54,17 ^a	37,50 ^b	21,67 ^c
Aktivované oocyty (%)	21,67 ^a	34,17 ^b	43,33 ^c
Fragmentované oocyty (%)	19,17 ^a	25,00 ^{ab}	30,00 ^b
Lytické oocyty (%)	5,00 ^a	3,33 ^a	5,00 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými hodinami prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Ve čtvrté části experimentu byl také zjišťován vliv reverze účinku 100 μM D,L-propargylglycinu (inhibitoru cystathionin γ -lyázy) prostřednictvím 300 μM Na_2S . Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 8.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace bez přítomnosti 100 μM D,L-propargylglycinu i 300 μM Na_2S setrval plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 100 μM D, L-propargylglycinu byla polovina oocytů ve stádiu MII, čtvrtina oocytů byla spontánně partenogeneticky aktivována a pětina byla fragmentována.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 300 μM Na_2S setrval plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace v přítomnosti 100 μM D,L-propargylglycinu i 300 μM Na_2S zůstala polovina oocytů ve stádiu MII a zbylé oocyty byly spontánně partenogeneticky aktivovány. Fragmentované ani lytické oocyty nebyly pozorovány.

Tabulka č. 8: Vliv reverze účinku 100 μM D,L-propargylglycinu (inhibitoru cystathionin γ -lyázy) prostřednictvím 300 μM Na_2S .

Skupina	M199	M199 + D,L-propargylglycin 100 μM	M199 + Na_2S 300 μM	M199 + D,L-propargylglycin 100 μM + Na_2S 300 μM
MII (%)	100,00 ^a	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^b
Aktivované oocyty (%)	51,67 ^a	25,00 ^b	20,00 ^a	3,33 ^c
Fragmentované oocyty (%)	100,00 ^a	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a
Lytické oocyty (%)	56,67 ^a	43,33 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými experimentálními skupinami během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Sledování vlivu přidavku donoru 300 μM Na_2S a inhibitorů po 24 hodinách prodloužené kultivace

V experimentu byl zjišťován vliv inhibitorů D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 24 hodinách prodloužené kultivace. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 9.

Po 24 hodinách prodloužené kultivace byl v kontrolní skupině téměř plný počet oocytů ve stádiu MII a nepatrný počet oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných.

Ve skupině s donorem sirovodíku 300 μM Na_2S se nacházel plný počet oocytů ve stádiu MII.

Po ošetření oocytů 1000 μM kyselinou oxamovou byl po 24 hodinách prodloužené kultivace podíl oocytů ve stádiu MII nižší oproti kontrolní skupině oocytů. Byl pozorován zvýšený výskyt fragmentovaných oocytů oproti kontrolní skupině.

Po ošetření oocytů 100 μM D,L-propargylglycinem se snížil podíl oocytů ve stádiu MII na polovinu, naopak podíl spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů byl oproti kontrolní skupině vyšší. Byl pozorován i zvýšený podíl fragmentovaných oocytů. Podíl lytických oocytů byl 5,00 %.

Tabulka č. 9: Vzájemné porovnání vlivu inhibitorů D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 24 hodinách prodloužené kultivace.

24 hodin	M199	Donor 300 μM Na_2S	Inhibitor CBS oxamová kyselina 1000 μM	Inhibitor CTH D,L-propargylglycin 100 μM
MII (%)	99,17 ^a	100,00 ^a	71,67 ^c	54,17 ^b
Aktivované oocyty (%)	0,83 ^a	0,00 ^a	6,67 ^c	21,67 ^b
Fragmentované oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	21,67 ^b	19,17 ^b
Lytické oocyty (%)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	5,00 ^b

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými experimentálními skupinami během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Sledování vlivu donoru 300 μM Na_2S a inhibitorů po 48 hodinách prodloužené kultivace

V experimentu byl zjišťován **vliv inhibitorů D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 48 hodinách prodloužené kultivace**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 10.

Po 48 hodinách prodloužené kultivace byly pozorovány rozdíly převážně ve skupině oocytů s 1000 μM kyselinou oxamovou. Podíl oocytů ve stádiu MII byl nižší oproti ostatním skupinám oocytů. Podíl spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů byl naopak vyšší oproti ostatním skupinám oocytů. I podíl fragmentovaných oocytů byl nejvyšší ve skupině s 1000 μM kyselinou oxamovou. Toto zvýšení však bylo významné ve srovnání s kontrolní skupinou oocytů a skupinou s donorem Na_2S . Podíl lytických oocytů se výrazně nelišil v kontrolní skupině a ve skupině oocytů s 100 μM D,L-propargylglycinem, jako ve skupině s donorem Na_2S a ve skupině oocytů s 1000 μM kyselinou oxamovou.

Tabulka č. 10: Vzájemné porovnání vlivu inhibitorů D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 48 hodinách prodloužené kultivace.

48 hodin	M199	Donor 300 μM Na_2S	Inhibitor CBS oxamová kyselina 1000 μM	Inhibitor CTH D,L- propargylglycin 100 μM
MIII (%)	40,83 ^a	76,67 ^b	26,00 ^a	37,50 ^a
Aktivované oocyty (%)	37,50 ^a	23,33 ^a	47,00 ^a	34,17 ^a
Fragmentované oocyty (%)	18,33 ^a	0,00 ^b	27,50 ^c	25,00 ^{ac}
Lytické oocyty (%)	3,33 ^a	0,00 ^b	0,00 ^c	3,33 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými experimentálními skupinami během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

Sledování vlivu donoru 300 μM Na_2S a inhibitorů po 72 hodinách prodloužené kultivace

V experimentu byl zjišťován vliv inhibitorů **D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 72 hodinách prodloužené kultivace**. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 11.

Po 72 hodinách prodloužené kultivace nebyly rozdíly mezi skupinami tak významné.

Ve skupině s donorem Na_2S se nacházela více jak polovina oocytů stále v MII a zbylé oocyty byly spontánně partenogeneticky aktivovány.

Po ošetření oocytů 1000 μM kyselinou oxamovou a 100 μM D,L-propargylglycinem byl oproti kontrolní skupině nižší podíl spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů a vyšší podíl fragmentovaných oocytů.

Tabulka č. 11: Vzájemné porovnání vlivu inhibitorů D,L-propargylglycinu a kyseliny oxamové a donoru Na_2S na změnu stavu prasečích oocytů po 72 hodinách prodloužené kultivace.

72 hodin	M199	Donor 300 μM Na_2S	Inhibitor CBS oxamová kyselina 1000 μM	Inhibitor CTH D,L- propargylglycin 100 μM
MII (%)	23,33 ^a	55,00 ^a	20,83 ^a	21,67 ^a
Aktivované oocyty (%)	47,50 ^b	45,00 ^a	41,67 ^b	43,33 ^b
Fragmentované oocyty (%)	25,83 ^a	0,00 ^a	33,33 ^a	30,00 ^{ac}
Lytické oocyty (%)	3,33 ^a	0,00 ^a	4,17 ^c	5,00 ^c

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými experimentálními skupinami během prodloužené kultivace (uvnitř řádků) jsou označeny rozdílnými superskripty.

5.2 Oocyty žab *Xenopus laevis*

Vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na partenogenetickou aktivaci oocytů žab *Xenopus laevis*

Experimenty na oocytech žab *Xenopus laevis* byly zaměřeny na sledování vlivu NO na partenogenetickou aktivaci. Byl zjišťován vliv na indukci kortikální reakce, na aktivitu MPF a MAPK a na kinetiku partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis*.

V první části experimentu byl zjišťován **vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na indukci kortikální reakce u partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis***. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 12 a na obrázku č. 11.

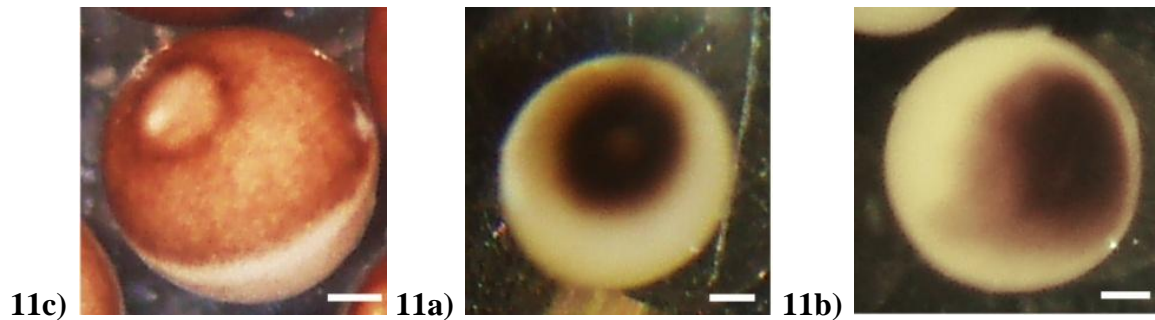
SNAP vyvolává morfologické změny podobné těm, které vznikají při kortikální reakci a jsou pozorovatelné u partenogenetické aktivace oocytů použitím calcium ionoforu A23187. Typická pro kontrolní pozorování při použití calcium ionoforu A23187 byla migrace pigmentových granul směřující k vrcholu animálního pólu oocyty (obr. č. 11b, 11c). Bílá plocha oocyty, indikátor meiotického zrání, byla pozorována u 40,04 % oocytů vystavených SNAP o koncentraci 2,5mM, zatímco u oocytů ošetřených 5 mM SNAP došlo k pigmentovému přesunu v 77,12 % (tab č. 12).

Tabulka č. 12: Vliv donoru NO SNAP na partenogenetickou aktivaci zralých oocytů *Xenopus laevis*.

Skupina	Počet oocytů (počet samic)	% oocytů s pigmentovými změnami	± SEM
Kontrola	255 (19)	0 ^a	0
SNAP 2,5 mM	312 (12)	40,04 ^b	6,27
SNAP 5 mM	540 (17)	77,12 ^c	3,02
A23187 10 μM	414 (19)	95,59 ^d	1,03

^{a,b,c,d} jsou statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v poměru partenogeneticky aktivovaných oocytů, jež jsou označeny různými superskripty.

Obrázek č. 11: Vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na indukci kortikální reakce u partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis*.



11a) oocyt *Xenopus laevis* zastavený v MII, 11b) partenogeneticky aktivovaný oocyt po ošetření ionoforem A23187, 11c) partenogeneticky aktivovaný oocyt po ošetření SNAP. Měřítka: 200 μ m.

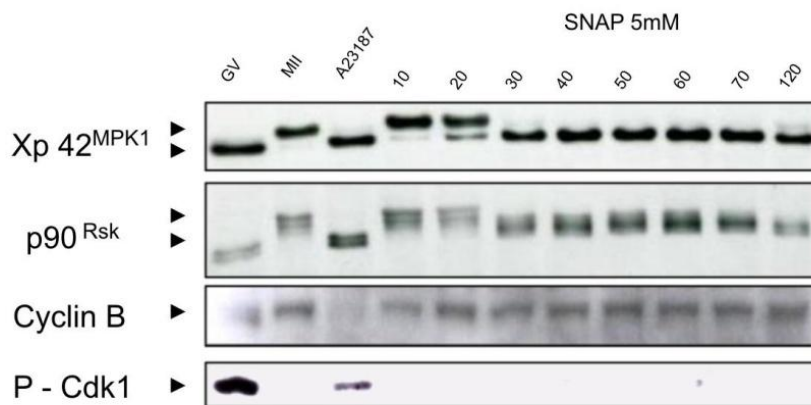
Ve druhé části experimentu byl zjišťován **vliv donoru oxidu dusnatého SNAP na aktivitu MPF a MAPK.**

SNAP inaktivoval MAPK, aniž by ovlivnil aktivitu MPF. Kontrolní oocyty po ošetření calcium ionoforem A23187 vykazovaly pokles aktivity MPF, cyklin B byl degradován a nebyl přítomen fosfo-histon H3. U oocytů vystavených působení SNAP došlo k inaktivaci MAPK (Xp42MPK1) a efektoru p90Rsk do 30 minut po ošetření (obr. č. 12).

Cyklin B a Mos nebyl degradován u zralých oocytů ošetřených SNAP. Oba proteiny byly zjištěny ještě 70 minut po začátku kultivace, na rozdíl od oocytů ošetřených A23187, kde byl Mos degradován po 70 minutách. Aktivita MPF byla sledována prostřednictvím fosforylace histonu H3. Po ošetření SNAP nebyla u oocytů snížena aktivita MPF. Hladina cyklinu B zůstala konstantní, Cdk1 nebyla fosforylována na tyrosinu 15 a histon H3 byl fosforylován, což dokazuje aktivitu MPF (obr. č. 13).

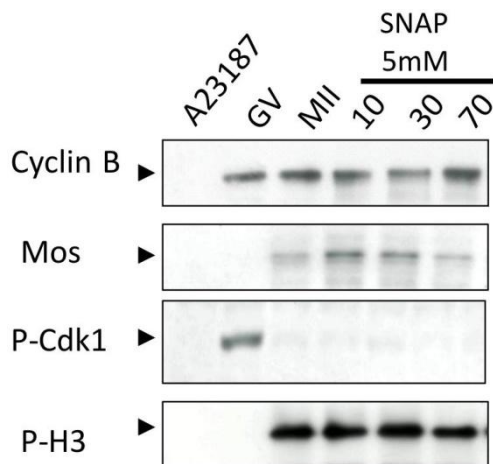
SNAP neindukoval oddělení Cdk1 a cyklinu B, které jsou nadále spojené v komplexu MPF. Bylo zjištěno, že obě podjednotky MPF nebyly disociované ani po 70 minutách kultivace (obr. č. 14).

Obrázek č. 12: Vliv partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis* indukované SNAP na kinetiku klíčových komponentů.



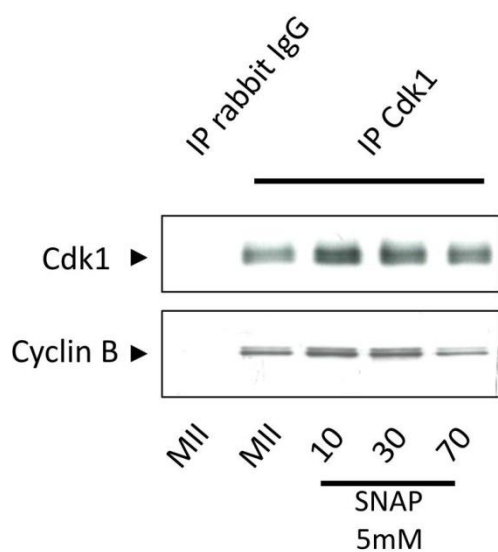
Xp 42^{MPK1}, p 90^{Rsk}, cyclin B a P-Cdk1 u nezralých oocytů (GV), u zralých oocytů (MII), oocytů aktivovaných calcium ionophorem (A23187, 10 μ M) a oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP po dobu 10 až 120 minut.

Obrázek č. 13: Vliv partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis* indukované SNAP na MPF, jeho aktivitu a protein Mos.



Cyclin B, Mos, P-Cdk1 a P-H 3 u oocytů aktivovaných calcium ionophorem (A23187, 10 μ M), u nezralých oocytů (GV) a u zralých oocytů (MII), a oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP po dobu 10, 30 a 70 minut.

Obrázek č. 14: Disociace podjednotek MPF po ošetření SNAP u oocytů *Xenopus laevis*.

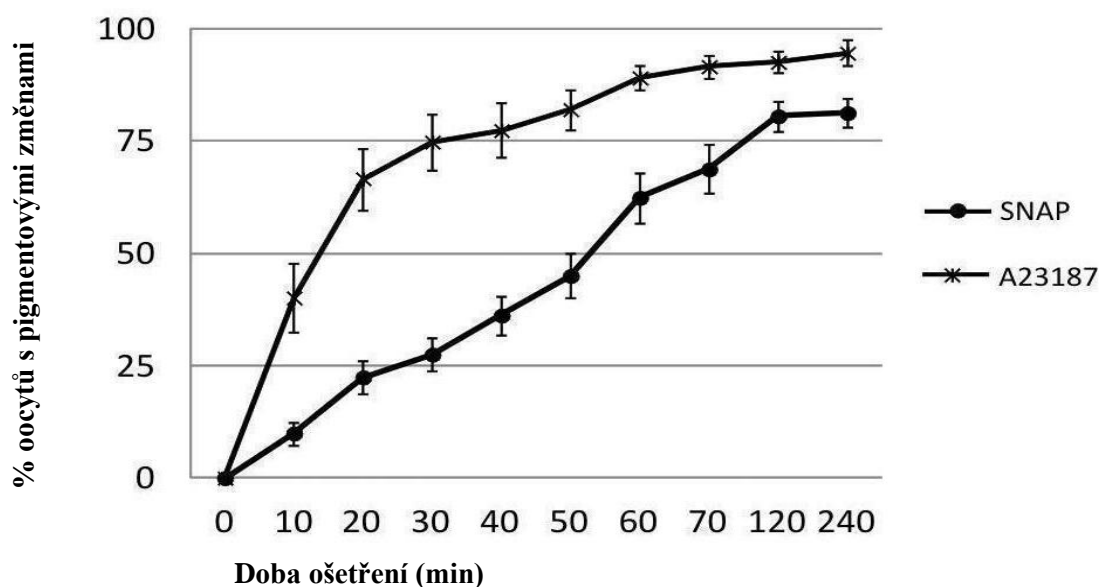


Cdk1 a cyklin B u kontrolní skupiny zralých oocytů (MII) po kultivaci s IP rabbit IgG a u zralých oocytů (MII) a oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP v čase 10, 30 a 70 minut kultivovaných s IP Cdk1.

Ve třetí části experimentu byla zjišťována **kinetika partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis* po ošetření SNAP.**

U partenogenetické aktivace oocytů indukované SNAP jsme pozorovali vnější znaky aktivace oocytů až po delší časové expozici 70,17 (\pm 20,11) min ve srovnání s kontrolní skupinou aktivovanou prostřednictvím calcium ionoforu (obr. č. 15).

Obrázek č. 15: Kinetika partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis* kultivovaných s donorem NO SNAP a calcium ionophorem A23187.



Kortikální reakce byla zaznamenávána v 10 minutových intervalech. Údaje jsou uváděny jako průměrné procento aktivace \pm SEM z pěti nezávislých experimentů.

Vliv NO-scavengeru CPTIO na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* prostřednictvím SNAP

V experimentu bylo ověřováno, zda vyvázání NO prostřednictvím NO-Scavengeru (CPTIO, 10mM) ovlivní partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis* pomocí SNAP .

U oocytů ošetřených SNAP byla pozorována prvojádra. 11,4 % na membráně a 34,3 % prvojader migrovalo do subkortikální oblasti (tab. č. 13). Dělicí vřeténka nebyla nalezena, což naznačuje desorganizaci oocytů v důsledku uvolnění NO.

V experimentu byl sledován vliv přítomnosti CPTIO v médiu ND96 spolu se stimulací meiotického zrání oocytů progesteronem. CPTIO neměl vliv na průběh meiotického zrání, ale potlačoval účinky SNAP na partenogenetickou aktivaci oocytů (obr. č. 16).

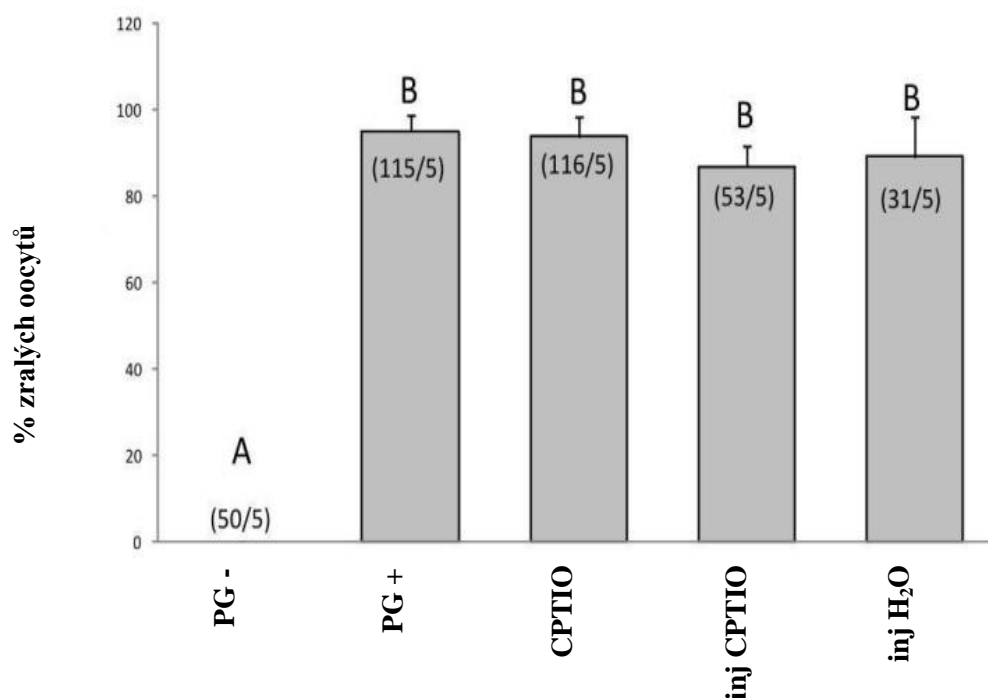
Při společném působení SNAP o koncentraci 5mM a CPTIO mikroinjekčně aplikovaného do oocytů nebyly pozorovány morfologické změny oocytů (obr. č. 17).

Xp42MPK1 a p90Rsk zůstávaly nadále fosforylovány (obr. č. 18) a CPTIO neblokoval účinky A23187. CPTIO potlačoval účinky SNAP jak na morfologické, tak na biochemické změny u oocytů, což potvrdilo předpoklad, že SNAP působí na oocyty prostřednictvím uvolnění NO (obr. č. 19 až 22).

Tabulka č. 13: Vliv SNAP, A23187 a CPTIO na tvorbu dělicího vřeténka a prvojádra po stimulaci meiotického zrání progesteronem.

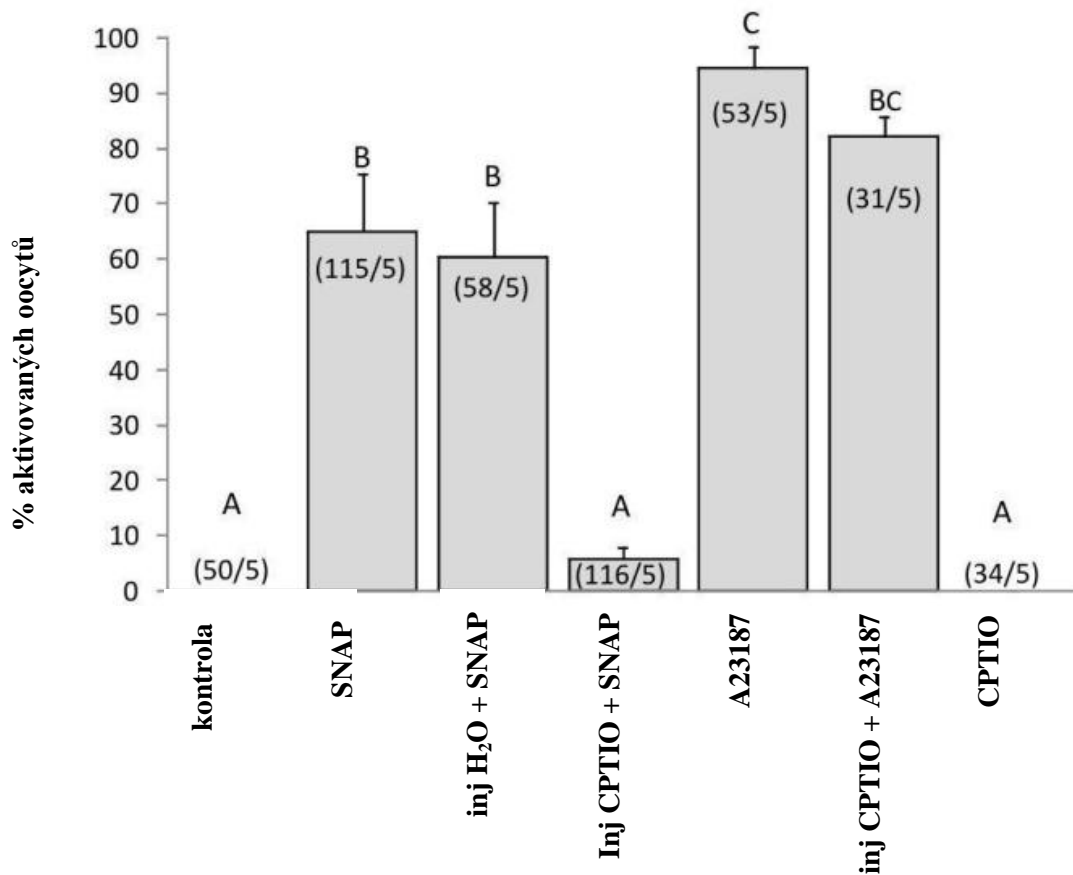
Ošetření	Dělicí vřeténko %	Migrace prvojádra %	Prvojádro %	Bez nálezu %
Kontrola	73.4	0	0	26.6
SNAP 5 mM	2.8	34.3	11.4	51.5
SNAP 5 mM/CPTIO 40 mM	78.3	0	0	21.7
A23187 10 μ M	0	11.1	66.7	22.2

Obrázek č. 16: Meiotické zrání oocytů *Xenopus laevis* po mikroinjekce CPTIO.



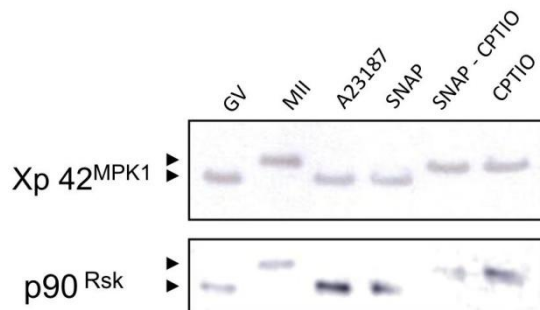
Procento zralých oocytů po mikroinjekci CPTIO. PG- (oocyty bez ošetření progesteronem), PG+ (oocyty ošetřené pouze progesteronem), CPTIO (oocyty po ošetření 10 μ M progesteronem v médiu ND96 doplněném o 10 mM CPTIO), injCPTIO (oocyty po ošetření 10 μ M progesteronem v čistém médiu ND96 po mikroinjekci 40 mM CPTIO) a injH₂O (oocyty ošetřené progesteronem a po mikroinjekci 15 nl vody). Chybové úsečky představují \pm SEM hodnoty. ^{A,B} jsou statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v poměru zralých oocytů, jež jsou označeny různými superskripty.

Obrázek č. 17: Partenogenetická aktivace oocytů *Xenopus laevis* pomocí SNAP po mikroinjekci CPTIO.



Procento partenogeneticky aktivovaných oocytů po 2 hodinách kultivace. Kontrola (oocyty v MII fázi), SNAP (oocyty kultivované s 5 mM SNAP), injH₂O + SNAP (oocyty kultivované s 5 mM SNAP injikovanými vodou), injCPTIO + SNAP (oocyty kultivované s 5 mM SNAP injikovanými 40 mM CPTIO), A23187 (oocyty aktivované calcium ionophorem 10 μ M A23187), injCPTIO + A23187 (oocyty aktivované calcium ionophorem 10 μ M A23187P injikovanými 40 mM CPTIO) a CPTIO (oocyty kultivované s 10 mM CPTIO). Chybové úsečky představují \pm SEM hodnoty. ^{A,B,C} jsou statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v poměru aktivovaných oocytů, jež jsou označeny různými superskripty. Údaje jsou uvedeny jako průměrné procento aktivace pěti nezávislých experimentů.

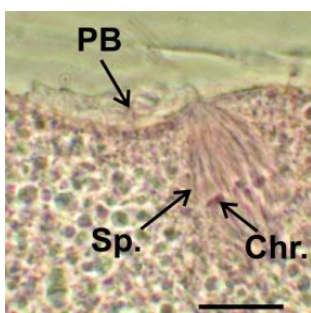
Obrázek č. 18: Vliv mikroinjekce CPTIO na Xp 42^{MPK1} a p90^{rsk} oocytů *Xenopus laevis* po ošetření SNAP.



Klíčové komponenty Xp 42^{MPK1} a p 90^{rsk} u nezralých oocytů (GV), u zralých oocytů (MII), oocytů aktivovaných 10 μ M calcium ionophorem (A23187), oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP (SNAP), u oocytů kultivovaných s 5 mM SNAPEM a mikroinjikovanými 40 mM CPTIO (SNAP – CPTIO) a oocytů kultivované s 10 mM CPTIO (CPTIO).

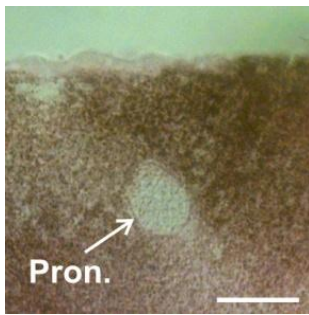
Histologická analýza ukázala, že oocyty ošetřené SNAP po mikroinjekci CPTIO zůstaly v MII (Obr. č. 19-22).

Obrázek č. 19: Dělicí vřeténko u oocytů v MII fázi.



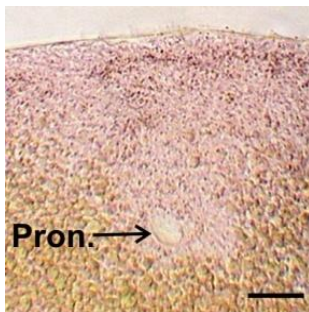
Sp. (dělicí vřeténko), Chr. (chromozomy) a PB (první polární tělísko). Nuclear Red/Picro-indigo karmínové barvení. Měřítko: 10 μ m.

Obrázek č. 20: Prvojádro oocytů po partenogenetické aktivaci oocytů ionoforem A23187.



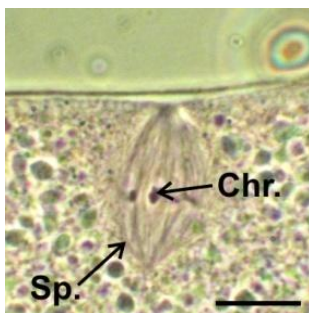
Pron. (prvojádro). Měřítko: 10 μ m.

Obrázek č. 21: Prvojádro oocytů po partenogenetické aktivaci oocytů SNAP.



Pron. (prvojádro). Měřítko: 10 μ m.

Obrázek č. 22: Dělicí vřeténko u oocytů v MII fázi po kultivaci se SNAP a CPTIO.



Sp. (dělicí vřeténko), Chr. (chromozomy) Měřítko: 10 μ m

Závislost efektu donoru oxidu dusnatého SNAP na zvýšení intracelulární hladiny

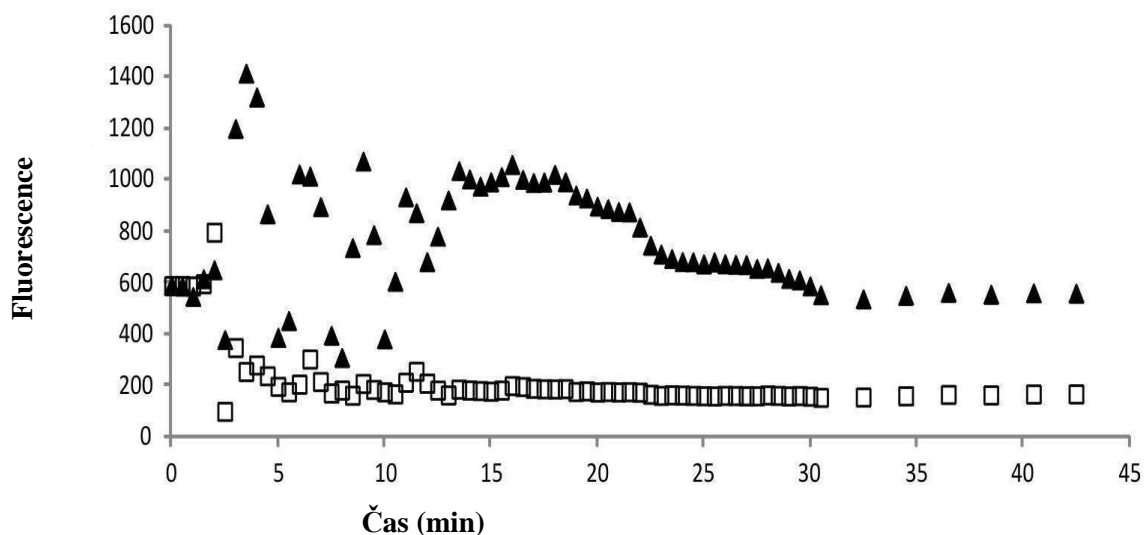
vápníku

V experimentu byla ověřována hypotéza, že partenogenetická aktivace oocytů *Xenopus laevis* pomocí SNAP byla zprostředkována zvýšením hladiny vápníku nebo jeho intracelulární mobilizací (obr. č. 23-28).

Aplikace SNAP vyvolala zvýšení intracelulárního vápníku. Byl pozorován nárůst intracelulárního vápníku během prvních 30 minut po ošetření SNAP (obr. č. 23). Efekt SNAP na hladiny intracelulárního vápníku byl zprostředkován uvolněním NO, protože ošetření CPTIO zcela narušilo zvýšení vápníku pozorované v přítomnosti SNAP (obr. č. 24).

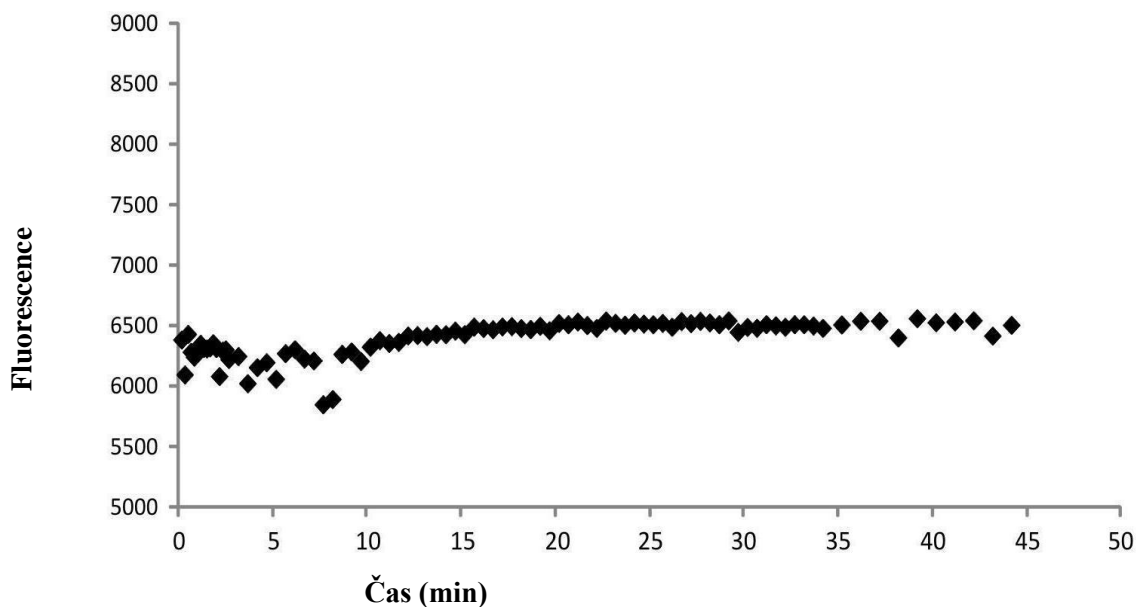
Ošetření oocytů chelátorem vápníku BAPTA-AM potlačilo efekt SNAP na intracelulární vápníkové změny, ale BAPTA-AM sám nedokázal zabránit SNAP indukované kortikální reakci a pigmentové přestavbě (obr. č. 25).

Obrázek č. 23: Efekt aplikace SNAP na hladinu vápníku u zralých oocytů v médiu ND96 nebo v médiu ND96 s 50 μ M BAPTA-AM.



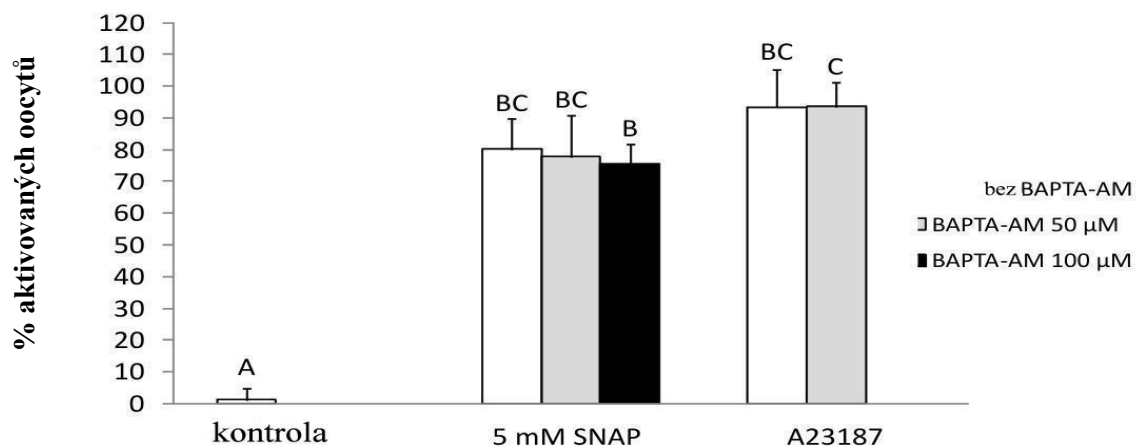
Hladina vápníku v médiu ND96 (černé trojúhelníky) a v médiu ND96 s 50 μ M BAPTA-AM (bílé čtverečky).

Obrázek č. 24: Efekt aplikace SNAP na hladinu vápníku u zralých oocytů v médiu ND96 v přítomnosti CPTIO.



Hladina vápníku v médiu ND96 v přítomnosti CPTIO.

Obrázek č. 25: Vliv chelátoru vápníku BAPTA-AM na SNAP indukovanou partenogenetickou aktivaci.



Procento partenogeneticky aktivovaných oocytů po 2 hodinách kultivace v médiu ND96 doplněném o 50 μM nebo 100 μM BAPTA-AM. Kontrola (oocyty kultivované pouze v médiu ND96), 5 mM SNAP (oocyty kultivované s 5 mM SNAP) a A23187 (oocyty aktivované calcium ionophorem 10 μM A23187). Chybové úsečky představují ± SEM hodnoty. ^{A,B,C} jsou statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v poměru aktivovaných oocytů, jež jsou označeny různými superskripty. Údaje jsou uvedeny jako průměrné procento aktivací minimálně čtyř nezávislých experimentů.

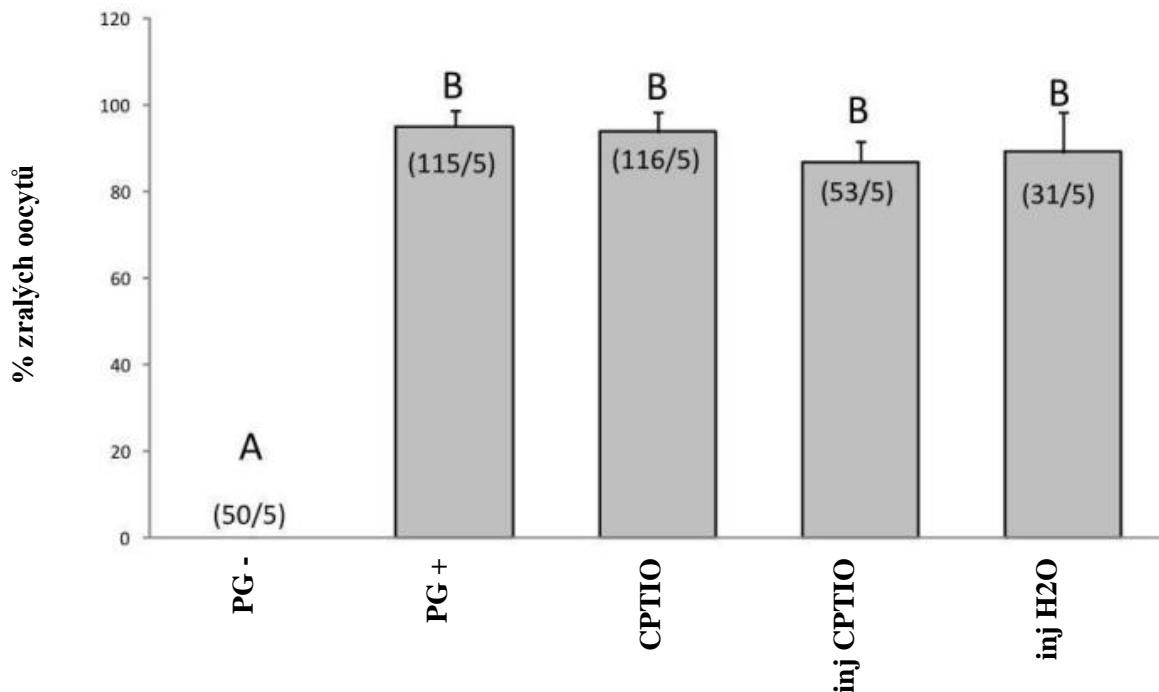
Dále byly testovány dva různé typy médií - médium bez vápníku (Calcium Free Medium CaFree) a médium s limitovaným vápníkem (Calcium Limited Medium CaLim) pro ověření vlivu extracelulárního vápníku na partenogenetickou aktivaci prostřednictvím SNAP. Médium CaLim je standardně využíváno pro prevenci mechanické a spontánní partenogenetické aktivace oocytů.

V obou médiích byl menší podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů pomocí SNAP. V médiu ND96 s přidavkem SNAP bylo aktivováno $57,2 \pm 5,9$ % oocytů, ale v médiu CaLim SNAP indukoval partenogenetickou aktivaci jen u $11,9 \pm 2,9$ % oocytů a v médiu CaFree nebyl nalezen žádný partenogeneticky aktivovaný oocyt (obr. č. 26).

Metoda western blot potvrdila, že p90Rsk a Xp42MPK1 zůstaly fosforylovány po 2 hodinách kultivace v aktivní formě v CaFree a CaLim (obr. č. 27).

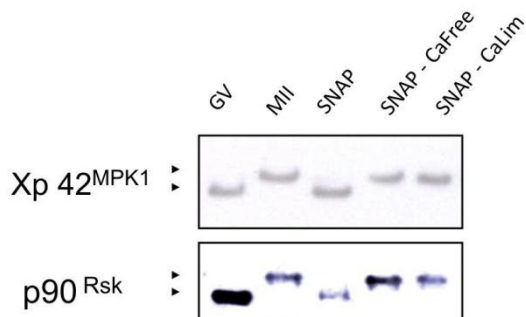
Uvolnění NO prostřednictvím působení SNAP si bylo podobné ve všech třech testovaných médiích (obr. č. 28).

Obrázek č. 26: Partenogeneticky aktivované oocyty - procentuální podíl oocytů po 2 hodinové kultivaci s 5 mM SNAP v médiích ND96, CaFree a CaLim.



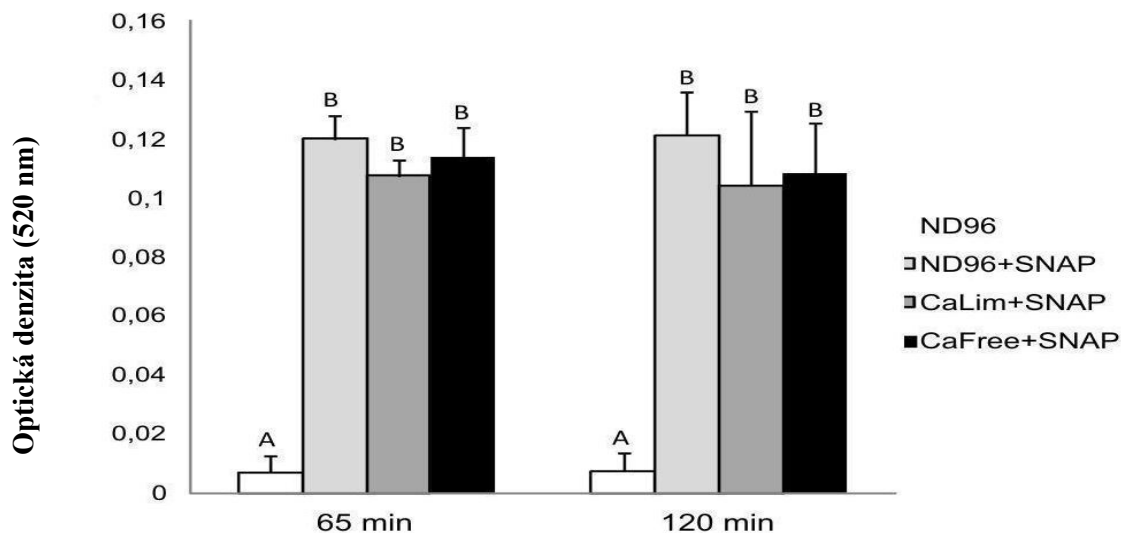
Chybové úsečky představují \pm SEM hodnoty. ^{A,B} jsou statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v poměru aktivovaných oocytů, jež jsou označeny různými superskripty. Údaje jsou uvedeny jako průměrné procento aktivací minimálně čtyř nezávislých experimentů.

Obrázek č. 27: Fosforylace p90Rsk a Xp42MPK1 po 2 hodinách kultivace v aktivní formě v médiích bez vápníku (CaFree) a v médiu s omezeným množstvím vápníku (CaLim).



Xp 42^{MPK1} a p 90^{Rsk} u nezralých oocytů (GV), u zralých oocytů (MII), u oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP (SNAP), u oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP (SNAP) v CaFree médiu a u oocytů kultivovaných s 5 mM SNAP (SNAP) v CaLim médiu.

Obrázek č. 28: Uvolňování NO v médiích s omezeným vápníkem nebo bez vápníku.



Obsah NO po ošetření SNAP byl stanoven v médiu ND96, CaLim a CaFree kolorimetrickým měřením metabolitů oxidu dusnatého, dusitanů a dusičnanů (NO₃/NO₂) po 65 a 120 minutách. Každé měření bylo opakováno třikrát. Různé indexy ukazují významné rozdíly (P < 0,05).

6 DISKUSE

Pro biotechnologické metody je nezbytné využití oocytů zrajících v *in vitro* podmínkách. Pokud jsou zralé oocyty vystaveny prodloužené kultivaci, snižuje se jejich kvalita a životaschopnost. Tento proces se označuje jako stárnutí.

V první části experimentů byl ověřen typický průběh procesu stárnutí prasečích oocytů v podmínkách naší laboratoře. Po 24 hodinách prodloužené kultivace naprostá většina oocytů zůstala ve stádiu MII (99,17 %) a jen 0,83 % oocytů bylo spontánně partenogeneticky aktivováno. Meiotický blok v MII je udržovaný aktivitou MAPK a MPF, komplexem cyklinu B a katalytické podjednotky cyklin-dependentní protein kinázy p34^{cdc2}. K prolomení bloku v MII je nutný pokles jejich aktivity (Motlík *et al.*, 1990). S pokračující prodlouženou kultivací oocytů při procesu stárnutí docházelo u prasečích oocytů k postupnému zvyšování podílu partenogeneticky aktivovaných oocytů a oocytů fragmentovaných nebo lytických. To je dáno komplexem funkčních a následných morfologických změn, které stárnutí provázejí. Stárnoucí oocyty postupně ztrácí schopnost udržet meiotický blok v MII a podléhají buď spontánní partenogenetické aktivaci, lýze nebo apoptotickým změnám, které se projevují morfologickou fragmentací oocytu (Petrová *et al.*, 2004, 2005). Za hlavní příčinu těchto změn u stárnoucích oocytů jsou považovány právě změny v aktivitě MPF a MAPK. Během procesu stárnutí oocytů dochází postupně k fosforylaci katalytické podjednotky MPF, cyklin-dependentní protein kinázy p34^{cdc2}, a tato forma MPF je katalyticky inaktivní. To pak vede spolu se změnou v aktivitě MAPK ke spontánní partenogenetické aktivaci a fragmentaci oocytů vystavených procesu stárnutí (Kikuchi *et al.*, 1995, 2000, Ma *et al.*, 2005).

Příčinou spontánní partenogenetické aktivace stárnoucích oocytů je zřejmě nejen snížení aktivity komplexu MPF, ale také narušení signalizace Ca²⁺, které proces stárnutí oocytů doprovází (Takahashi *et al.*, 2000, 2003). Narušení signalizace Ca²⁺ může vést k degradaci cyklinu B, a touto cestou pak k inaktivaci MPF. Podíl oocytů spontánně partenogeneticky aktivovaných byl v našich experimentech relativně nízký a až po 72 hodinách prodloužené kultivace byla necelá polovina oocytů partenogeneticky aktivována. Disbalance v signalizaci Ca²⁺ u stárnoucích prasečích oocytů může být zřejmě zároveň i příčinou indukce apoptózy, tedy fragmentace oocytu (Suzuki *et al.*, 2002, Perez *et al.*, 1997, Perez *et al.*, 1999). Byl popsán vliv volných radikálů, které při svém nahromadění ve stárnoucích oocytech, mohou být příčinou narušení funkce endoplazmatického retikula v signalizaci prostřednictvím Ca²⁺ a touto cestou aktivovat apoptotickou signální dráhu nebo vést až k lytickému zániku oocytů (Takahashi *et al.*, 2000, 2003, Orrenius *et al.*, 2003, Petrová *et al.*, 2004).

Možnost ovlivnění průběhu stárnutí u oocytů prostřednictvím sirovodíku nebyla zatím v odborné literatuře popsána, i když u somatických buněk myši je sirovodík zapojen do řízení apoptózy. Vyblokování genu pro CTH vede ke snížení hladiny glutathionu, což může vést k následným změnám způsobeným oxidačním stresem u CTH mutantních myši. H₂S působí tak, že sulfhydratuje podjednotku p65 na cysteinu-38 NF-κB, který posiluje jeho vazbu na koaktivátor ribozomálního proteinu S3 (RPS3). Sulfhydratace p65 brzy převládá po ošetření TNF-α, pak klesá a je následována recipročním zvýšením nitrosylace p65. U CTH mutantních myši nedochází k sulfhydrataci p65, antiapoptotické vlivy NF-κB jsou výrazně menší a myši jsou hypersenzitivní k apoptotickým změnám po ošetření TNF-α. Sulfhydratace NF-κB se jeví jako posttranslační modifikace p65 a zdá se určujícím fyziologickým determinanem jeho antiapoptotické transkripční aktivity (Sen et al., 2012).

Podobný mechanismus může být funkční i u prasečích oocytů, což ukazují i výsledky našich experimentů. Předpokladem pro to je i fakt, že v prasečím oocytu jsme našli enzym, který je zodpovědný za endogenní produkci sirovodíku, a to CTH, která byla lokalizována v jednotlivých ložiscích v cytoplazmě jak ve stádiu MII a tak v oocytech po 24, 48 a 72 hodinách prodloužené kultivace. Intenzita signálu však v průběhu procesu stárnutí slábne, což ukazuje i na postupnou ztrátu efektu sirovodíku. Exprese CTH byla popsána ve varlatech, v Sertolihových a Leydigových buňkách a také ve všech vývojových stádiích samčích zárodečných buněk (Sugiura et al., 2005). U samic byla CTH popsána v intrauterinních tkáních, konkrétně v děloze, v tkáni vaginální a placentární (Rong et al., 2006, d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009; Patel et al., 2009; Srilatha et al., 2006, 2007). I když byla v samčích i samičích pohlavní soustavě popsána exprese CBS, u potkanů ve vaskulární tkáni a ve varlatech (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009; Patel et al., 2009; Srilatha et al., 2009) a u samic byla popsána kromě intrauterinních tkání, dělohy, vaginální a placentární tkáni (Rong et al., 2006, d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2009; Patel et al., 2009; Srilatha et al., 2006, 2007), dále byla CBS detekována v amnionu a chorionu člověka a potkana a také v myších ováriích (Rong et al., 2006; Patel et al., 2009; Srilatha et al., 2009), My jsme ji však u prasečích oocytů nezjistili.

V dalších experimentech jsme ověřili hypotézu, že sirovodík je schopen u prasečích oocytů během prodloužené kultivace potlačit apoptotické změny, které se projevují morfologicky fragmentací oocytů. Z našich výsledků vyplývá, že efektivní koncentrace donoru sirovodíku Na₂S se pohybuje v rozmezí poměrně nízkých koncentrací 150–300 μM. Sirovodík má v organismu v těchto koncentracích patrně podíl na řízení mnoha fyziologických procesů. V lidském mozku např. byla prokázána koncentrace sirovodíku 160 μM (Else et al., 2010). Sirovodík však může vykazovat dvojitý efekt v závislosti na jeho koncentraci. Tento jev byl popsán při zánětlivých procesech v organismu. Nízké koncentrace sirovodíku mají

antiinflamační efekt, zatímco vysoké koncentrace sirovodíku mají efekt proinflamační (Pae *et al.*, 2009). Podstata pozitivního působení donoru sirovodíku na fragmentaci oocytů je zřejmě podobného charakteru.

Jedním možných dalších regulačních mechanismů apoptotického efektu sirovodíku je kromě sulfhydratace p53 i ovlivnění signalizace vápníkovými kationty. Tang *et al.* (2010) ve své studii prokázal, že sirovodík je schopen ovlivňovat vápníkové kanály, kdy působí jako inhibitor L-typu Ca^{2+} kanálů. U prasečích oocytů hraje významnou roli zřejmě L-typ Ca^{2+} kanálů, protože jejich zablokování je důvodem zastavení procesu meiotického zrání (Kaufman *et Homa*, 1993). Signální kaskáda Ca^{2+} iontů v organismu má schopnost indukovat apoptotické jevy (Orrenius *et al.*, 2003). Činnost Ca^{2+} kanálů je jedním z mechanismů složitějšího systému regulace vápníkové signalizace a roli sirovodíku v prasečích oocytech je nezbytné do budoucna objasnit.

Průběh procesu stárnutí naopak akcelerovala inhibice enzymů zodpovědných za endogenní produkci sirovodíku, CBS a CTH. Při kultivaci oocytu s D,L-propargylglycinem, inhibitorem CTH, byl pozorován dřívější nástup apoptotických jevů, který se projevoval zvýšením podílu fragmentovaných oocytů v časnějších fázích stárnutí. Již po 24 hodinách prodloužené kultivace bylo u prasečích oocytů pozorováno 19,17 % fragmentovaných oocytů. Při kultivaci s kyselinou oxamovou, inhibitorem CBS, byly pozorovány podobné výsledky jako při použití inhibitoru CTH. Opět byl zřejmý nárůst podílu fragmentovaných oocytů v časnějších fázích stárnutí prasečích oocytů. Z těchto výsledků experimentů vyplývá, že endogenní produkce sirovodíku je nutná pro řízení apoptózy. Mechanismus působení však zatím zůstává nejasný, i když bylo popsáno, že v granulózniích buňkách antrálních folikulů se CBS účastní inhibice meiotického zrání oocytu (Liang *et al.*, 2006, Rong *et al.*, 2006) díky přítomnosti homocysteinu a methioninu ve folikulární tekutině, do jejichž metabolismu je CBS zapojena a působí tak jako možný mediátor kvality oocytů a celkového průběhu oogeneze (Yamanishi *et al.*, 2006, Sidhu *et al.*, 2001, Yuo *et al.*, 2011). Výsledky naznačují, že na řízení procesu stárnutí se u prasečích oocytů podílí produkcí sirovodíky oba enzymy, jak CBS, tak i CTH. Nám se však CBS nepodařilo prokázat. O důvodech lze spekulovat. Inhibitory CBS a CTH nemusí být přísně specifické, nebo může být důvod v použité protilátce, jejíž reaktivita výrobce dokladuje pouze pro myš a pro člověka.

Význam endogenní produkce sirovodíku pro regulaci apoptózy u oocytů dokládá i fakt, že v našich experimentech u oocytů ošetřeným inhibitory enzymů CBS a CTH došlo po přidání donoru sirovodíku znovu k úplnému potlačení apoptotických jevů a fragmentované oocyty se v těchto skupinách nevyskytovaly.

Zapojení sirovodíku do řízení apoptotických procesů u prasečích oocytů se nám podařilo jasně prokázat. V dalších experimentech je třeba se zaměřit na mechanismus působení sirovodíku.

Další skupina experimentů byla cílena na úlohu NO během aktivace oocytů žáby *Xenopus laevis*. Přesná funkce NO-dependentní signální kaskády během aktivace oocytu zůstává nadále neobjasněna a je předmětem intenzivního výzkumu. Donory NO byly použity k navození partenogenetické aktivace u oocytů mořských ježovek (Kuo *et al.*, 2000) a prasat (Petr *et al.*, 2005b). U oocytů mořských ježovek (Leckie *et al.*, 2003) a myši (Yang *et al.*, 2005a) může být NO také zapojen do řízení oplození. Funkce NO, jako signální molekuly, v partenogenetické aktivaci oocytů byla studována v *in vitro* podmínkách na různých modelech. Oocyty žáby *Xenopus laevis* jsou vhodným biologickým modelem zejména díky snadné manipulaci s oocyty, kultivaci nezávislé na folikulárních buňkách a možnosti využít pro stanovení pouze jednu buňku. Z těchto důvodů byly použity k testování hypotézy, že donor NO (SNAP) by mohl indukovat partenogenetickou aktivaci a výstup z 2. meiotického bloku právě oocyty *Xenopus laevis*.

Jako donor oxidu dusnatého byl vybrán SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicilamin), který je vhodnější než jiné donory, zejména díky jednoduchosti použití, vhodnému uvolňování NO (Butler *et al.*, 1987, Marks *et al.*, 1995) a také díky tomu, že při jeho použití nedochází k uvolňování kyanidových iontů, jako je tomu např. u inhibitoru SNP (Bates *et al.*, 1991, Marks *et al.*, 1995).

SNAP je stabilním analogem endogenních S-nitrosothiolů a oxid dusnatý je uvolňován endogenními enzymy po průniku SNAP do oocytu (Megson, 2000, Yamamoto *et al.*, 2000). Na fyziologické úrovni může být produkován endogenní NO třemi různými izoformami NOS. Přítomnost eNOS a iNOS izoform byla popsána u plně dorostlých oocytů potkana (Jablonka-Shariff *et al.*, 1997), myši (Nishikimi *et al.*, 2001), prasat (Hattori *et al.*, 2000, Chmelíková *et al.*, 2009) a u bovinních oocytů (Pires *et al.*, 2009). U oocytů *Xenopus laevis* byla nalezena jen nNOS (Peunova *et al.*, 2001). Podobně jako u prasečích oocytů i u oocytů *Xenopus laevis* byla třeba dlouhá doba kultivace v přítomnosti SNAP, aby došlo k partenogenetické aktivaci, která se projevuje přesunem pigmentu typickým pro kortikální reakci (Petr *et al.*, 2005a). Pomalý nástup kortikální reakce, kterou jsme pozorovali u oocytů, může být ovlivněn propustností oocytů pro SNAP nebo množstvím NO. V našem experimentu ale SNAP indukoval exocytózu kortikálních granul, na rozdíl od prasečích oocytů, kde exocytóza kortikálních granul při partenogenetické aktivaci SNAP nebyla pozorována (Petr *et al.*, 2005a,b).

Vzhledem k tomu, že kortikální reakce nemusí být spojena s výstupem z bloku v MII fázi, byla ověřována aktivita MPF a MAPK. MAPK byla defosforylována do 30 minut po

přidání SNAP stejně tak, jako kináza p90RSK, která je součástí signální dráhy aktivované MAPK. MPF zůstal aktivní, tzn., že tyrozin 15 nebyl fosforylován a hladina cyklinu B byla vysoká a nepoklesla. Inhibice aktivity MPF může být v podmínkách donoru SNAP vyvolána disociací Cdk1. Disociace komplexu Cdk1 - cyklin B je dostatečná pro pokles aktivity MPF (Lorca *et al.*, 1991, Chesnel *et al.*, 2006). V našich experimentech u oocytů vystavených působení SNAP jsme nepozorovali disociaci MPF, obě podjednotky heterodimeru MPF - Cdk1 a cyklin B imunoprecipitovaly společně. Udržení aktivity MPF je podporováno fosforylací histonu H3 a ochranou proteinu Mos před degradací samotným MPF. MPF fosforyluje Mos na serinovém zbytku a tak protein brání jeho degradaci (Doran *et al.*, 2003). U oocytů vystavených působení SNAP klesla aktivita MAPK, ale MPF zůstal aktivní. Je zajímavé, že snížení MAPK aktivity bylo spojené s desorganizací dělicího vřeténka u oocytů, spolu s pigmentovou přestavbou při migraci prvojádra a tvorbou prvojader. Podobně byl přechod do interfáze pozorován u prasečích oocytů ve stádiu MII ošetřených inhibitorem MEK1 - U0126 (Castro *et al.*, 2001, Fan *et al.*, 2003).

CPTIO, Scavenger NO, váže NO a je využíván u zárodečných buněk a embryí k vyvázání uvolněného NO (Tatemoto *et Muto*, 2001, Kumar *et al.*, 2010, Stricker, 2011). U savčích oocytů byl popsán dvojitý efekt NO na meiotické zrání oocytů v závislosti na použité koncentraci. Vysoká dávky NO potlačovaly jaderné zrání u bovinních (Viana *et al.*, 2007) a prasečích oocytů (Tichovská *et al.*, 2011). Nízké dávky NO podporovaly jaderné zrání u myších (Bu *et al.*, 2007) a bovinních oocytů (Viana *et al.*, 2007). Úplné omezení produkce NO prostřednictvím inhibitorů NOS potlačovalo jaderné zrání u prasečích (Chmelíková *et al.*, 2009) a myších oocytů (Sengoku *et al.*, 2001). U oocytů *Xenopus laevis* v našich experimentech vyvázání NO prostřednictvím CPTIO neovlivnilo vstup do M fáze ani meiotické zrání oocytů *Xenopus laevis*. Oocyty po ošetření CPTIO byly schopné po stimulaci progesteronem znovu zahájit a dokončit meiotické zrání podobně jako kontrolní skupina oocytů. Výsledky ukazují, že NO není rozhodující pro proces zrání oocytů *Xenopus laevis* při regulaci meiotického zrání narozdíl od savčích oocytů. Mikroinjekce CPTIO nicméně zvrátila účinky SNAP u oocytů *Xenopus laevis*, což ukazuje, že efekt SNAP je specifický. Působení CPTIO narušilo SNAP vyvolanou inaktivaci MAPK, dezorganizaci dělicího vřeténka a tvorbu prvojádra.

Signální dráhy Ca^{2+} a NO jsou u zralých oocytů propojeny a vápníkové kationty hrají stěžejní roli, protože NO dependentní signální kaskáda je regulována Ca^{2+} (Kuo *et al.*, 2000, Leckie *et al.*, 2003, Petr *et al.*, 2005b). Toto potvrdily i naše experimenty, které prokázaly, že partenogenetická aktivace navozená oxidem dusnatým je narušena v médiích neobsahujících vápníkové kationty (CaFree) nebo s jeho limitovaným množstvím (CaLim). Produkce NO v buňce je závislá na aktivaci NOS kalmodulinem, který je sám aktivován ionty Ca^{2+} (Lamas *et*

al., 1992, Nathan, 1992). NO ovlivňuje hladinu intracelulárního vápníku prostřednictvím regulace Ca^{2+} kanálů a pump, které moduluji výměnu Ca^{2+} mezi buňkou a extracelulárním prostorem (Tichovská *et al.*, 2011). NO má schopnost regulovat uvolnění Ca^{2+} iontů z intracelulárních zásob. Ca^{2+} se z těchto zdrojů uvolňuje prostřednictvím ryanodinových (RyR) nebo inositol trifosfátových receptorů (IP3). NO dependentní partenogenetická aktivace prasečích oocytů je závislá na mobilizaci intracelulárních Ca^{2+} zdrojů z RyR a přes IP3 (Clapham, 1995). U prasečích oocytů je partenogenetická aktivace NO závislá pouze na RyR, k partenogenetické aktivaci není nutná mobilizace vápníkových kationtů z úložišť v endoplazmatickém retikulu prostřednictvím IP3 receptorů (Tichovská *et al.*, 2011).

Studium signalizace vápníkovými kationty u oocytů *Xenopus laevis* je usnadněno faktem, že endoplazmatické retikulum postrádá RyR a vápník je uvolňovaný pouze prostřednictvím IP3 receptory (Marin, 2012). RyR se v malém množství nachází pouze blízko jádra oocytu *Xenopus laevis*, a proto hrají u oocytu *Xenopus laevis* na rozdíl od prasečích oocytů, spíše druhotnou roli (Erickson *et al.*, 2004, Ajmat *et al.*, 2011). Naše výsledky ukazují, že NO indukuje partenogenetickou aktivaci u oocytů *Xenopus laevis*, která je závislá na signální dráze Ca^{2+} kationtů, i když mechanismus uvolňování Ca^{2+} je třeba ještě určit.

Fakt, že MAPK je v MII inaktivována, zatímco MPF zůstává aktivní během partenogenetické aktivace oocytů prostřednictvím NO, je velmi zajímavý. Na jednu stranu NO indukuje inaktivaci MAPK a exocytózu kortikálních granul prostřednictvím zvýšení hladiny vápníkových kationtů, ale na druhou stranu zvýšení vápníkových kationtů blokuje inaktivaci MPF. Příčina proč zvýšení hladiny vápníkových kationtů nevede k inaktivaci MPF, tkví zřejmě v nitrosylaci prostřednictvím NO. Nitrosylace snižovala aktivitu CaMKII (Song *et al.*, 2008, Takata *et al.*, 2011). Zvýšení hladiny NO může vést k inaktivaci CaMKII a zabránit tak aktivaci APC, která je nezbytná pro inaktivaci MPF a degradaci cyklinu B. Vzhledem k tomu, že média neobsahující vápník (CaFree) nebo s jeho limitovaným množstvím (CaLim) zabránila inaktivaci MAPK vyvolanou SNAP, je zřejmé, že inaktivace MAPK je Ca^{2+} dependentní. Tato média však nebrání nitrosylaci. Bylo zjištěno, že partenogenetická aktivace savčích oocytů indukovaná NO je ovlivňována alternativními signálními kaskádami, které nejsou zapojeny do partenogenetické aktivace oocytů calcium ionophorem, tradičním aktivačním stimulem. Detailnější mechanismus účinku NO na zralé oocyty je třeba ještě určit.

7 ZÁVĚR

Oocyty dozrálé v *in vitro* podmínkách do stádia metafáze II, které se využívají v reprodukčních biotechnologiích, podléhají v průběhu prodloužené kultivace procesu stárnutí. Na proces stárnutí oocytů má vliv řada faktorů.

Disertační práce se zabývala vlivem sirovodíku na stárnutí prasečích oocytů a vlivem oxidu dusnatého na partenogenetickou aktivaci oocytů *Xenopus laevis*. Sirovodík a oxid dusnatý jsou gasotransmitery patřící mezi endogenní signální molekuly, které v organismu plní roli druhých posílů. Během procesu stárnutí oocytů dochází k mnoha funkčním a strukturním změnám, které ovlivňují kvalitu a životaschopnost oocytů a které mohou vyústit ve spontánní partenogenetickou aktivaci, fragmentaci či lýzu oocytů. S délkou doby prodloužené kultivace oocytů dochází ke zvyšování podílu spontánně partenogeneticky aktivovaných, fragmentovaných ale i lytických oocytů a spolu s těmito změnami dochází ke snižování podílu oocytů ve stádiu MII, oocytů zastavených ve 2. meiotickém bloku. Příčinou je inaktivace faktorů majících vliv na udržení oocytů ve 2. meiotickém bloku, hlavně inaktivace MAPK a MPF.

Během stárnutí prasečích oocytů se nám nepodařilo lokalizovat CBS. CTH však byla lokalizována v jednotlivých ložiscích v cytoplazmě jak ve stádiu MII a tak v oocytech po 24, 48 a 72 hodinách prodloužené kultivace. Intenzita signálu však v průběhu stárnutí slábne.

Výsledky experimentů se sirovodíkem dále potvrzují, že sirovodík je aktivně zapojen do regulace procesů spojených se stárnutím prasečích oocytů. Bylo prokázáno, že u stárnoucích prasečích oocytů, které jsou vystaveny donoru sirovodíku, dochází zcela k potlačení indukce apoptózy, tedy k fragmentaci oocytu. Inhibicí enzymů endogenně produkujících sirovodík v oocytech prasety, cystathionin β -syntázy (CBS) a cystathionin γ -lyázy (CTH), dochází v průběhu procesu stárnutí prasečích oocytů k dřívějšímu nástupu fragmentace oocytů. Účinek inhibitorů, kyseliny oxamové (CBS) a D,L-propargylglycinu (CTH), lze zvrátit použitím donoru sirovodíku Na_2S .

Tato disertační představa je jednou z prvních studií zaměřenou na efekt působení sirovodíku na průběh stárnutí prasečích oocytů. Je vhodné dalšími experimenty navázat a rozšířit hypotézy k objasnění mechanismů souvisejících s procesem stárnutí prasečích oocytů pod vlivem působení sirovodíku.

Oxid dusnatý je zapojen do regulace signální kaskády partenogenetické aktivace oocytů *Xenopus laevis*, jeho role však zůstává i nadále neobjasněna.

Donor oxidu dusnatého (SNAP) je schopen navodit partenogenetickou aktivaci oocytu. Partenogenetická aktivace oocytu nevykazuje spektrum procesů typických pro fertilizaci vajíčka spermií. Po delší době kultivace oocytů se SNAP jsou k vidění vnější známky partenogenetické aktivace, o čemž svědčí pigmentová přestavba typická pro kortikální reakci. V našem

experimentu SNAP indukoval exocytózu kortikálních granul. Kortikální reakce může být považována za uvolnění oocytů ze stádia MII. MAPK a kináza p90^{rsk} byly do 30 minut po přidání SNAP defosforylovány, zatímco MPF zůstal aktivní, tyrozin 15 nebyl fosforylován a úroveň cyklinu B byla stabilní. Aktivita MPF byla potvrzena fosforylací histonu H3 a absencí degradace Mos. U oocytů ošetřených SNAP aktivita MAPK klesá, ale MPF zůstává aktivní. Pokles aktivity MAPK souvisí s deorganizací dělicího vřeténka, pigmentovou přestavbou při migraci prvojádra a tvorbou prvojader.

CPTIO byl úspěšně použit k inhibici uvolňování NO. V našem experimentu CPTIO nenarušil vstup do MII fáze a meiotické zrání oocytů *Xenopus laevis*, protože oocyty stimulované progesteronem po ošetření CPTIO znovu zahájily a dokončily meiotické zrání podobně jako kontrolní skupina oocytů. Mikroinjekce CPTIO blokovala účinky SNAP na oocyty, tedy i inaktivaci MAPK, desorganizaci dělicího vřeténka a tvorbu prvojádra.

Ca²⁺ a NO dependentní signální dráhy jsou u zralých oocytů propojeny a Ca²⁺ pro ně hraje stěžejní roli. Jeho důležitou roli potvrdily i naše experimenty, jež prokázaly, že oxidem dusnatým indukovaná partenogenetická aktivace je narušena v médiích CaLim a CaFree. Naše výsledky naznačují, že NO specificky indukuje partenogenetickou aktivaci u oocytů *Xenopus laevis*, a to prostřednictvím mechanismu dependentním na Ca²⁺, i když detailnější mechanismus působení NO je třeba ještě určit.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, A. L., Ducibella, T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience*. 6. D792-806.
- Abbott, A. L., Xu, Z., Kopf, G. S., Ducibella, T., Schultz, R. M. 1998. *In vitro* culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in *in vivo* unfertilized mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 59 (6). 1515–1521.
- Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience*. 16. 1066-1071.
- Abrieu, A., Lorca, T., Labbé, J. C., Morin, N., Keyse, S., Dorée, M. 1996. MAP kinase does not inactivate, but rather prevents the cyclin degradation pathway from being turned on in *Xenopus* egg extracts. *Journal of Cell Science*. 239-246.
- Adams, J. M., Cory, S. 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*. 281. 1322–1326.
- Afework, M., Tomlinson, A., Burnstock, G. 1994. Distribution and co-localisation of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in adrenal gland of developing, adult and ageing sprague Dawley rats. *Cell and Tissue Research*. 276. 133-141.
- Ajmat, M. T., Bonilla, F., Zelarayán, L., Bühler, M. I. 2011. Participation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors in *Bufo arenarum* oocyte activation. *Zygote*. 19. 171-180.
- Alderton, W. K., Cooper, Ch. E., Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*. 357. 593-615.
- Ambrosino, A., Russo, D., Lamanna, C., Assisi, L., Rizzo, M., Vittoria, A., Cecio, A. 2003. Isoforms of nitric oxide in the pig testis. *Acta Veterinaria*. 72. 493–498.
- Anguiano, O. L., Caballero de Castro, A., Pechen de D'Angelo, A. M. 2001. The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 128 (1). 35-43.
- Armstrong, D. T. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 55 (6). 1303–1322.
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M. 1998. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*. 281. 1305–1308.
- ASTM. 1998. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – *Xenopus* (FETAX). *ASTM*. E 1439-98.

- Aubard, Y., Darodes, N., Cantaloube, M. 2000. Hyperhomocysteinemia and pregnancy – review of our present understanding and therapeutic implications. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 93 (2). 157–165.
- Balakier, H., Czolowska, R. 1977. Cytoplasmic control of nuclear maturation in mouse oocytes. *Experimental Cell Research*. 110. 466-469.
- Bates, J. N., Baker, M. T., Guerra, R. Jr, Harrison, D. G. 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical Pharmacology*. 42. 157-165.
- Berridge, M. J. 1995. Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays*. 17 (6). 491-500.
- Berridge, M. J. 1996. Microdomains and elemental events in calcium signaling. *Cell Calcium*. 20. 95-96.
- Berridge, M. J. 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium*. 40. 405-412.
- Bhatt, R. R., Ferrell, J. E., Jr. 1999. The protein kinase p90 rsk an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*. 286. 1362-1365.
- Bian, K., Murad, F. 2003. Nitric oxide (NO) – Biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Frontiers in Bioscience*. 8. 264-278.
- Bielanska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6. 161-193.
- Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anatomical Record*. 161. 45-56.
- Bleil, J. D., Beall, C. F., Wassarman, P. M. 1981. Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology*. 86 (1). 189-197.
- Bodart, J. F. L., Gutierrez, D. V., Nebreda, A. R., Buckner, B. D., Resau J. R., Duesbery, N. S. 2002a. Characterization of MPF and MAPK Activities during Meiotic Maturation of *Xenopus tropicalis* Oocytes. *Developmental Biology*. 245. 348-361.
- Bodart, J. F., Beart, F. Y., Sellier, S., Duesbery, N. S., Flament, S., Vilain, J. P. 2005. Differential roles of p39(Mos)-Xp42(Mpk1) cascade proteins on Raf1 phosphorylation and spindle morphogenesis in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology*. 283. 373-383.
- Bodart, J. F., Flament, S., Vilain, J. P. 2002b. Minireview : Metaphase arrest in amphibian oocytes: interaction between CSF and MPF sets the equilibrium. *Molecular Reproduction and Development*. 61. 570-574.

- Bornslaegr, J. L., Mattei, P. M., Schultz, R. M. 1986. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse maturation. *Developmental Biology*. 114. 453–462.
- Bredt, D. S., Ferris, C. D., Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and 111 calcium/calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 10976-10981.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351 (6329). 714-718.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87. 682-685.
- Briggs, D., Miller, D., Gosden, R. 1999. Molecular biology of female gametogenesis. In: *Molecular Biology In Reproductive Medicine*. Eds.: Fauser J. M., 255. The Partheon Publishing Group, New York.
- Brunswig-Spickenheier, B., Mukhopadhyay, A. K. 1997. Stimulation of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in bovine ovarian theca cells by tumor necrosis factor α (TNF α). Is this pathway implicated in the TNF α -induced inhibition of luteinizing hormone-stimulated prorenin production? *Biology of Reproduction*. 57. 700-706.
- Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207. 21-30.
- Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2007. Dual effect of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207. 21-30.
- Bu, S., Xie, H., Tao, Y., Wang, J., Xia, G. 2004. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 223. 85-93.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543–547.
- Bukovský, A. 2005. Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovary-derived germ cells? *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3. 36.

- Burnett, A. L., Lowenstein, C. J., Brecht, D. S., Chang, T. S., Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 257 (5068). 401-403.
- Busa, W. B., Nuccitelli, R. 1985. An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. *The Journal of Cell Biology*. 100. 1325-1329.
- Butler, A. R., Glitwell, C. 1987. Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. *Chemical Society Reviews*. 16. 361-380.
- Cai, W. J., Wang, M. J., Moore, P. K., Jin, H. M., Yao, T, Zhu, Y. C., 2007. The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovascular Research*. 76 (1). 29-40.
- Cailliau, K., Browaeys-Poly, E. 2009. A Microinjectable Biological System, the *Xenopus* Oocyte, as an Approach to Understanding Signal Transduction Protein Function. *Methods in Molecular Biology*. 518. 43-55. DOI:10.1007/978-1-59745-202-1_4.
- Calabrese, E. J. 2001. Nitric oxide: biphasic dose response. *Critical Reviews in Toxicology*. 31 (4&5). 489-501.
- Cao, Y., Adhikari, S., Ang, A. D., Moore, P. K., Bhatia, M. 2006. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 291. C503-C510.
- Castro, A., Peter, M., Magnaghi-Jaulin, L., Vigneron, S., Galas, S., Lorca, T., Labbé, J. C. 2001. Cyclin B/cdc2 induces c-Mos stability by direct phosphorylation in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell*. 2. 2660-2671.
- Clapham, D. E. 1995. Calcium signalling. *Cell*. 80. 259-268.
- Clarke, P. R. 1995. Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation. *Current Biology*. 5 (1). 40-42.
- Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*. 326. 1-16.
- Coleman, T. R., Dunphy, W. G. 1994. Cdc2 regulatory factors. *Current Opinion in Cell Biology*. 6. 877-882.
- Collman, J. P., Ghosh, S., Dey, A., Decréau, R. A., Yang, Y. 2009. Catalytic Reduction of O₂ by Cytochrome c Using a Synthetic Model of Cytochrome c Oxidase. *Journal of the American Chemical Society*. 131 (14). 5034-5035.
- Cory, S., Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2 (9). 647-656.
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., De Palma, R., Ignarro, L. J., Cirino, G. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human

- corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (11). 4513–4518.
- Dail, W. G., Sanborn, C. R., Ratner, A. 1980. Immunocytochemical localization of cyclic AMP and cyclic GMP in rat ovarian tissue. *Biology of Reproduction*. 22. 281-288.
- Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell*. 103. 239–252.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L. 1996. Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annual Review of Medicine*. 47. 219-227.
- de Vantéry, C., Stutz, A., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine, S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology*. 187. 43-54.
- Debnath, J., Baehrecke, E. H., Kroemer, G. 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*. 1 (2). 66-74.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M. 1999. Positive and negative regulation of Ikappa B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science*. 284. 309–313.
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., Snyder, S. H. 1994. Endothelial nitric oxide synthase localised in hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91. 4214-4218.
- Ding, D. Ch., Liou, S. M., Huang, L. Y., Liu, J. H., Wu, G. J. 2000. Effects of four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide 114 concentration in laboratory-prepared oligospermia. *Chinese Medical Journal*. 63. 822-827.
- Ding, J., Clarke, N., Nagai, T., Moor, R. M. 1992. Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 31 (4). 287-296.
- Dixit, V. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65. 1-16.
- Doran, S. A., Tran, C. H., Eskicioglu, C., Stachniak, T., Ahn, K. Ch., Goldberg, J. I. 2003. Constitutive and permissive roles of nitric oxide activity in embryonic ciliary cells. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 285. 348-355.
- Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J., Beach, D. 1989. Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*. 56. 829–838.
- Du, J., Yan, H., Tang, C. 2003. Endogenous H₂S is involved in the development of spontaneous hypertension. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 35 (1). 102.

- Ducibella, T. 1998. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology*. 49. 53-65.
- Dumont, J. N. 1971. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). *The Journal of Morphology*. 136. 153-180.
- Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., Newport, J. 1988. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. 54. 423–431.
- Dupont, G. 1998. Link between fertilization-induced Ca²⁺ oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: A model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophysical Chemistry*. 72 (1-2). 153-167.
- Dupré, A., Haccard, O., Jessus, C. 2011. Mos in the Oocyte: How to Use MAPK Independently of Growth Factors and Transcription to Control Meiotic Divisions. *Journal of Signal Transduction*. 15. DOI:10.1155/2011/350412.
- Edwards, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 208. 349–351.
- El-Jouni, W., Jang, B., Haun, S., Machaca, K. 2005. Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Developmental Biology*. 288. 514-525.
- Else, D. J., Fowkes, R. C., Baxter, G. F. 2010. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochemistry and Function*. 28. 95-106. DOI:10.1002/cbf.1618.
- Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H., Kimura, H. 2005. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *The FASEB Journal*. 19. 1854–1856.
- Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte – granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 45. 824-838.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122 (6). 829-838.
- Eppig, J. J., Schroeder, A. C., O'Brien, M. J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journal of Reproduction and Fertility*. 95. 119-127.
- Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Bivens, C., De La Fuente, R. 2004. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In Leung, P., Adashi, E. Y. (eds.). *The Ovary*. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 113-129.

- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F. L. 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States of America*. 99 (5). 2890-2894.
- Erickson, E. S., Mooren, O. L., Moore-Nichols, D., Dunn, R. C. 2004. Activation of ryanodine receptors in the nuclear envelope alters the conformation of the nuclear pore complex. *Biophysical Chemistry*. 112 (1). 1-7.
- Erickson, P. F., Maxwell, I. H., Su, I. J., Baumann, M., Glode, L. M. 1990. Sequence of cDNA for rat cystathionine γ -lyase and comparison of deduced amino acid sequence with related *Escherichia coli* enzymes. *Biochemical Journal*. 269. 335-340.
- Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T., Kimura, H. 2002. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293 (5). 1485-1488 (4).
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78. 203-216.
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greeve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195. 327-336.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation of maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*. 42. 437-442.
- Fan, H. Y., Li, M. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 63. 480-487.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535-47.
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Roles of protein kinase C in oocyte meiotic maturation and fertilization. *Progress in Natural Science*. 13. 401-406.
- Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34 cdc2 and a mikrotubule associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular and Cellular Biology*. 11. 1965-1971.
- Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Doree, M., Cavadore, J. C. 1993. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *The EMBO Journal*. 12. 3111-3121.

- Fiorucci, S., Distrutti, E., Cirino, G., Wallace, J. 2006. The Emerging Roles of Hydrogen Sulfide in the Gastrointestinal Tract and Liver. *Gastroenterology*. 131 (1). 259-271.
- Fisher, D. L., Brassac, T., Galas, S., Doree, M. 1999. Dissociation of MAP kinase activation and MPF activation in hormone-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Development*. 126. 4537-4546.
- Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory aging. *Reproduction*. 124. 745-754.
- Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S., Ito, F., Matsuoka, I., Hayashi, E., Nakamura, H., Ogita, S., Sato, E., Inoue, M. 1996. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction*. 11. 1480-1483.
- Fulka, J. Jr., Jung, T., Moor, R. M. 1992. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 32. 378-382.
- Furchgott, R. F. 1999. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Angewandte Chemie International Edition*. 38. 1870-1880.
- Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., Sagata, N. 1994. Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*. 13. 2399-2410.
- Furuno, N., Ogawa, Y., Iwashita, J., Nakajo, N., Sagata, N. 1997. Meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes is independent of cdk2 kinase. *The EMBO Journal*. 16. 3860-3865.
- Gabrielli, B. G., Roy, L. M., Maller, J. L. 1993. Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science*. 259. 1766-1769.
- Gadalla, M. M., Snyder, S. H. 2010. Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter. *Journal of Neurochemistry*. DOI:10.1111/j.1471-4159.2010.06580x.
- Gaffré, M., Martoriati, A., Belhachemi, N., Chambon, J. P., Houliston, E., Jesus, C., Karaiskou, A. 2011. A critical balance between Cyclin B synthesis and Myt1 activity controls meiosis entry in *Xenopus* oocytes. *Development*. 138. 3735-3744.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by hsp90. *Nature (London)*. 392. 821-824.
- Garthwaite, J., Boulton, C. L. 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*. 57. 683-706.
- Gautier J., Maller J. 1988. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *The EMBO Journal*. 10. 177-182.

- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Maller, J. L. 1988. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle gene *cdc2*. *Cell*. 54. 433–439.
- Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1999. A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Current Biology*. 9. 281–284.
- Gilbert, S. F., Raunio, A. M. 1997. *Embryology, Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. ISBN 0-87893-237-2.
- Gius, D., Botero, A., Shah, S., Curry, H. A. 1999. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicology Letters*. 106. 93–106.
- Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., Warenycia, M. W., Reiffenstein, R. J., Dowling, G. 1989. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *Journal of Analytical Toxicology*. 13. 105–109.
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19. 875–882.
- Gotoh, Y., Masuyama, N., Suzuki, A., Ueno, N., Nishida, E. 1995. Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *The EMBO Journal*. 14. 2491–2498.
- Goudet, G., Belin, F., Bezar, J., Gerard, N. 1998. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*. 4. 563–570.
- Green, D. R., Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281. 1309–1312.
- Green, L. S. 2010. *The Laboratory Xenopus sp.* CRC Press Taylor & Francis Group. ISBN:978-1-4200-9109-0.
- Green, S. L., Parker, J., Davis, C., Bouley, D. M. 2007. Ovarian hyperstimulation syndrome in gonadotropin-treated laboratory South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 46 (3). 64–7.
- Greenwald, G. S., Terranova, P. F. 1988. Follicular selection and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. 445.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 1999. Induction of metaphase arrest in clearing *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science*. 286. 1365–1367.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian Y. W., Maller, J. L. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90Rsk. *Current Biology*. 10. 430–438.
- Gundersen, C. B., Kohan, S. A., Chen, Q., Iagnemma, J., Umbach, J. A. 2002. Activation of

- protein kinase C triggers cortical granule exocytosis in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Cell Science*. 115. 1313-1320.
- Guraya, S. S. 2000. Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals Fundamentals and Applications. Science Publishers, New Hampshire, USA and Oxford IBH, New Delhi.
- Haccard, O., Jesus C. 2006. Oocyte maturation, Mos and cyclins-a matter of synthesis: two functionally redundant ways to induce meiotic maturation. *Cell Cycle*. 5 (11). 1152–1159.
- Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R. S., Erikson, E., Maller, J. L. 1995. Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Developmental Biology*. 168. 677–682.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. In: Hafez E. S. E., Hafez B. (ed.). *Reproduction in Farm Animals*. 7. vydání. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore. USA. 68-81.
- Hagting, A., Jackman, M., Simpson, K., Pines, J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology*. 9. 680–689.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase-I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925–933.
- Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okomura, E., Kishimoto, T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature Communications*. 3 (1059). 1-9. DOI:10.1038/ncomms2062.
- Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*. 126. 242-252.
- Hattori, M. A., Nishidam N., Takesue, K., Kato, Y., Fujihara, N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24. 65-73.
- Hattori, M., Arai, M., Saruwatari, K., Kato, Y. 2004. Estrogen regulation of nitric oxide synthesis in the porcine oocyte. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 260. 13-19.
- Hattori, M., Sakamoto, K., Fujihara, N., Kojima, I. 1996. Nitric oxide: a modulator for the epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. *The American Journal of Physiology*. 270 (3). C812-C818.
- Hausen, P., Riebesell, M. 1991. The Early Development of *Xenopus laevis*. Springer Verlag. 142. ISBN:3540537406.
- Hemmens, B., Mayer, B. 1998. Nitric oxide Protocols, vol. 100. Edited by Tiherridge MA, Totowa, New Jersey: Humana.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407 (6805). 770-776.

- Herrero, M. B., Gagnon, C. 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology*. 22 (3). 349-355.
- Hess, D. T., Patterson, S. I., Smith, D. S. 1993. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature*. 366. 562-565.
- Hochegger, H., Klotzbucher, A., Kirk, J., Howell, M., Le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M., Hunt, T. 2001. Requirements for B-type cyclin synthesis during *Xenopus* oocyte maturation (New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation). *Development*. 128 (19). 3795-807.
- Hollinger, T. G., Schuetz, A. W. 1976. „Cleavage“ and cortical granule breakdown in *Rana pipiens* oocytes induced by direct microinjection of calcium. *The Journal of Cell Biology*. 71. 395-4021.
- Hu, L. F., Wong, P. T., More, P. K., Bian, J. S. 2007. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide – induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *Journal of Neurochemistry*. 100. 1121.
- Huang, W., Kessler, D. S., Erikson, R. L. 1995. Biochemical and biological analysis of Mek1 phosphorylation site mutants. *Molecular Biology of the Cell*. 6. 237–245.
- Hubbard, C. J., Price, J. 1988. The Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Cyclic Guanosine 3', 5'-Monophosphate on Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Phosphodiesterase and Resumption of Meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*. 39. 829–838.
- Hunter, M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122-130.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T. 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 447-454.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47. 23–32.
- Chen, Ch., Xin, H., Zhu, Y. 2007. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacologica Sinica*. 28. 1709-1716.
- Chen, X., Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (50). 52082–52086.
- Chesnel, F., Bazile, F., Pascal, A., Kubiak, J. Z. 2006. Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of *Xenopus laevis* embryos. *Cell Cycle*. 5. 1687-1698.

- Chian, R. C., Nakahara, H., Niwa, K., Funahashi, H. 1992. Fertilization and early cleavage *in vitro* of aging bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology*. 37. 665–672.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Kott, T., Lánská, V., Tůmová, L., Tichovská, H., Ješeta, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (4). 137-149.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Rajmon, R., Petr, J., Švestková, D., Jílek, F. 2004. Effect of proteasome inhibitor MG132 on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Zygote*. 12. 157–162.
- Cho, W. K., Stern, S., Biggers, J. D. 1974. Inhibition effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 187. 383–386.
- Choi, T., Fukusawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borrer, K., Resau, J., Vande – Woude, G., 1996. The Mos / mitogen proteinkinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93. 7032-7035.
- Igarashi, A., Segoshi, K., Sakai, Y., Pan, H., Kanawa, M., Higashi, Y., Sugiyama, M., Nakamura, K., Kurihara, H., Yamaguchi, S., Tsuji, K., Kawamoto, T., Kato, Y. 2007. Selection of common markers for bone-marrow stromal cells from various bones using real-time RT-PCR: Effects of passage number and donor age. *Tissue Engineering*. 13. 2405-2417.
- Ignarro, L. J. 1999. NO in vascular biology. *Angewandte Chemie International Edition*. 38. 1882–1892.
- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., Byrns, R. E. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90. 8103-8107.
- Ichinohe, A., Kanaumi, T., Takashima, S., Enokido, Y., Nagai, Y., Kimura, H. 2005. Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338. 1547–1550.
- 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. 1100-1104.
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265–271.
- Inoue, M., Naito, K., Nakazma, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58. 130-136.

- Ishida, N., Tanaka, K., Tamura, T., Nishizawa, M., Okazaki, K., Sagata, N., Ichihara, A. 1993. Mos is degraded by the 26S proteasome in a ubiquitin-dependent fashion. *FEBS Letters*. 324 (3). 345-348.
- Iwamoto, M., Onishi, A., Fuchimoto, D., Somfai, T., Suzuki, S., Yazaki, S., Hashimoto, M., Takeda, K., Tagami, T., Hanada, H., Noguchi, J., Kaneko, H., Nagai, T., Kikuchi, K. 2005. Effects of caffeine treatment on aged porcine oocytes: Parthenogenetic activation ability, chromosome condensation, and development to the blastocyst stage after somatic cell nuclear transfer. *Zygote*. 13. 335-345.
- Jablonka-Shariff, A., Basuray, R., Olson, L. M. 1999. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 6. 387-393.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460-468.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139 (6). 2944-2954.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 55. 412-421.
- Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. 1996. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*. 274. 774-777.
- Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. 2001. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Science's STKE*. 86. 1. http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC_sigtrans,2001/86/pl1.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., Bloch, K. D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 14519-14522.
- Jessus, C., Rime, H., Ozon, R. 1998. Ras family proteins: new players involved in the diplotene arrest of *Xenopus* oocytes. *Biology of the Cell*. 90 (8). 573-83.
- Jeřeta, M., Bodart, J. F. 2012. Comparing Pig and Amphibian Oocytes: Methodologies for Aneuploidy Detection and Complementary Lessons for MAPK Involvement in Meiotic Spindle Morphogenesis. *Aneuploidy in Health and Disease*. (InTech, DOI: 10.5772/34070). 193-216. ISBN:978-953-51-0608-1.

- Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2005. The Role of Cystathionine β -Synthase in Homocysteine Metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (5&6). 813-822.
- Jílek, F., Hüttelová, R., Petr, J., Holubová, M., Rozinek, J. 2000. Activation of Pig oocytes using calcium ionophore: Effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Animal Reproduction Science*. 63 (1-2). 101-111.
- Jílek, F., Hüttelová, R., Petr, J., Holubová, M., Rozinek, J. 2001. 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.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122 (2). 303-315.
- Johnson, J., Bierle, B. M., Gallicano, G. I., Capco, D. G. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Developmental Biology*. 204 (2). 464-477.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 6979. 145-150.
- Jolliff, W. J., Prather, R. S. 1997. Parthenogenetic development of *in vitro*-matured, *in vivo* cultured porcine oocytes beyond blastocyst. *Biology of Reproduction*. 56. 544-548.
- Jones, E. G. 2007. Calcium channels in higher-level brain function. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (46). 17903-17904.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 1. 1-5.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130 (6). 813-823.
- Jones, K. T., Carroll, J., Merriman, J. A., Whittingham, D. G., Kono, T. 1995. Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development*. 121 (10). 3259-3266.
- Josefsberg, L. B., Galiani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 68. 1282-1290.
- Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jesus, C., Ozon, R. 1998. MPF Amplification in *Xenopus* Oocyte Extracts Depends on a Two-Step Activation of Cdc25 Phosphatase. *Experimental Cell Research*. 244, 491-500.

- Karaiskou, A., Lepretre, A. C., Pahlavan, G., Du Pasquier, D., Ozon, R. Jesus, C. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development*. 131. 1543-1552.
- Karin, M., Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *The Annual Review of Immunology*. 18. 621–663.
- Kaufman, M. L., Homa, S. T. 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 265. 69-76.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26. 239-257.
- Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furukawa, T., Daen, F. P., Naito, K., Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105. 325–330.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., Toyoda, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: A regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 715–722.
- Kim, H. P., Ryter, S. W., Choi, A. M. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 46. 411-449.
- Kim, H., Moon, Ch., Ahn, M., Lee, Y., Kim, H., Kim, S., Ha, T., Jee, Y., Shin, T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of Veterinary Science*. 6 (2). 97-101.
- Kim, N. H., Moon, S. J., Prather, R. S., Day, B. N. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 43. 513–518.
- Kimura, H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267. 129-133.
- Kimura, Y., Kimura, H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal*. 18 (10). 1165-7. DOI:10.1096/fj.04-1815fje.
- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., Kirschner, M. W. 1995. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*. 81 (2). 279-288.
- King, R., Deshaies, R., Peters, J., Kirschner, M. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 274. 1652-1658.
- Kishimoto, T. 1994. Cell reproduction: Induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *The International Journal of Developmental Biology*. 38. 185-191.

- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15. 654–663.
- Kloc, M., Etkin, L. D. 2005. RNA localization mechanisms in oocytes. *Journal of Cell Science*. 118. 269-82.
- Knowles, R. G., Moncada, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*. 298. 249-258.
- Knox, R. V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 29 (2). 385-97.
- Kobel, H. R., Loumont, C., Tinsley, R. C. 1992. The extant species. In *The biology of Xenopus*, ed. R. C. Tinsley and H. R. Kobel. New York: Oxford University Press. 263-278.
- Kokkola, T., Savinainen, J. R., Mönkkönen, K. S., Retamal, M. D., Laitinen, J. T. 2005. S-nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. *BMC Cell Biology*. 25. 6 (1). 2.
- Kosako, H., Gotoh, Y., Nishida, E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal*. 13. 2131-2138.
- Kovář, J. 2000. Buněčná proliferace a mechanismy její regulace II. 3.vyd. Nakladatelství Karolinum. 74s.
- Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., Peters, J. M. 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell*. 11. 1555-1569.
- Kubelka, M., Motlík, J., Fulka, J., Procházka, R., Rimkevičová, Z., Fulka, J. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and paminobenzamidine block. *Gamete Research*. 19. 423–431.
- Kubiak, J. Z. 1989. Mouse oocytes gradually develop the capacity for activation during the metaphase II arrest. *Developmental biology*. 136. 537-545.
- Kulkarni, S. K., Jain, N. K., Singh, A. 2001. Nitric oxide-releasing NSAIDs: a new dimension in nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drugs of the Future*. 26. 485.
- Kumar, K. S., Govindaiah, V., Naushad, S. E., Devi, R. R., Jyothy, A. 2003. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 23 (1). 55-58.
- Kumar, S., Barthwal, M. K., Dikshit, M. 2010. Cdk2 nitrosylation and loss of mitochondrial potential mediate NO-dependent biphasic effect on HL-60 cell cycle. *Free Radical Biology and Medicine*. 48. 851-861.
- Kuo, R. C., Baxter, G. T., Thompson, S. H., Stricker, S. A., Patton, C., Bonaventura, J., Epel, D.

2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*. 406. 633-636.
- Kupková, Z., Beneš, L. 2004. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické Listy*. 98. 116-122.
- Kurosaka, K, Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology*. 171. 4672-4679.
- Labbé, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A., Doree, M. 1989. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *The EMBO Journal*. 8. 3053–3058.
- Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., Michel, T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterisation of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*. 89. 6348-6352.
- Lánská, V., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Rajmon, R., Jeřeta, M., Rozinek, J. 2006. Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. *Animal Reproduction Science*. 96. 154–164.
- Lawrence, T. S., Dekel, N., Beers, W. H. 1980. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: A comparative study. *Endocrinology*. 106. 1114-1118.
- Lawrence, Y, Whiteker, M., Swann, K. 1997. Spermegg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development*. 124. 233-241.
- Lazar, S., Galiani, D., Dekel, N. 2002. cAMP-Dependent PKA Negatively Regulates Polyadenylation of c-mos mRNA in Rat Oocytes. *Molecular Endocrinology*. 16 (2). 331-341.
- Leckie, C., Empson, R., Becchetti, A., Thomas, J., Galione, A., Whitaker, M. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *Journal of Biological Chemistry*. 278. 12247-12254.
- Levy, H. L., Varga, J. E., Waisbren, S. E., Kurczynski, T. W., Roeder, E. R., Schwartz, R. S., Rosengren, S., Prasad, C., Greenberg, C. R., Gilfix, B. M., MacGregor, D., Shih, V. E., Bao, L., Kraus, J. P. 2002. Reproductive fitness in maternal homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 25. 299-314.

- Li, J. M., Fan, L. M., Christie, M. R., Shah, A. M. 2005. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Molecular and Cellular Biology*. 25. 2320–2330.
- Li, L. Y., Luo, X., Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412 (6842). 95-99.
- Li, L., Hsu, A., Moore, P. K. 2009. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! *Pharmacology & Therapeutics*. 123. 386-400.
- Li, L., Moore, P. K. 2008. Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends in Pharmacological Sciences*. 29. 84–90.
- Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Shang, M., Guo, J. Z. 2006. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119 (22). 1877–83.
- Liebfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L., First, N. L. 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction*. 36. 376-383.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. Q., Piwnicka-Worms, H. 1997. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Molecular Cell Biology*. 17. 571-583.
- Liu, J., Grimison, B., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor Emi2 Is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *Journal of Biological Chemistry*. 281. 46. 34736–34741.
- Liu, J., Maller, J. L. 2005. Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytosstatic factor. *Current Biology*. 15. 16. 1458–1468.
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104 (4). 487-501.
- Lohka, M. J., Hayes, M. K., Maller, J. L. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(9). 3009-30013.
- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Mery, J., Means, A. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366. 211–212.
- Lorca, T., Fesquet, D., Zindy, F., Le Bouffant, F., Cerruti, M., Brechot, C., Devauchelle, G., Doreé, M. 1991. An okadaic acid-sensitive phosphatase negatively controls the cyclin

- degradation pathway in amphibian eggs. *Molecular and Cellular Biology*. 11. 1171-1175.
- Lorca, T., Labbe', J. C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J. P., Cavadore, J. C., Le Bouffant, F., Dore'e, M. 1992. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *The EMBO Journal*. 11. 2381-2390.
- Łowicka, E., Bełtowski, J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports. PR*. 59 (1). 4-24.
- 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. 871-885.
- Ma, W., Zhang, D., Hou, Y., Li, Y. H., Sun, Q. Y., Sun, X. F., Wang, W. H. 2005. Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after *in vitro* aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biology of Reproduction*. 72. 373-393.
- Machatková, M., Hulínská, P., Horáková, J., Řečková, Z., Hanzalová, K. 2008. Oestrus cycle stage influences the morphology and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Veterinarni Medicina*. 53 (2). 70-76.
- Macháty, Z., Funahashi, H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997a. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 54 (4). 921-930.
- Macháty, Z., Wang, W. H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997b. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biology of Reproduction*. 57 (5). 1123-1127.
- Maller, J. L., Butcher, F. R., Krebs, E. G. 1979. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 254. 579-582.
- Maller, J. L., Krebs, E. G. 1980. Regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Cellular Regulation*. 16. 271-311.
- Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., Del Soldato, P., Wink, D. A., Pagliaro, P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1787 (7). 864-72.
- Marin, M. 2012. Calcium Signaling in *Xenopus* oocyte. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 740. 1073-94.
- Marin, M., Sellier, C., Paul-Antoine, A. F., Cailliau, K., Browaeys-Poly, E., Bodart, J. F., Vilain, J. P. 2010. Calcium dynamics during physiological acidification in *Xenopus* oocyte. *The Journal of Membrane Biology*. 236. 233-245.

- Marks, G. S., McLaughlin, B. E., Jimmo, S. L., Poklewsakozziell, M., Brien, J. F., Nakatsu, K. 1995. Time-dependent increase in nitric oxide formation concurrent with vasodilatation induced by sodium-nitropruside, 3-morpholinosydnonimine, and S-nitroso-N-acetylpenicillamine but not by glyceryl trinitrate. *Drug Metabolism and Disposition*. 23. 1248-1252.
- Markström, E., Svensson, E. C., Shao, R. J., Svanberg, B., Billig, H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123. 23–30.
- Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 268. 12231-12234.
- Masters, B. S. S. 1994. Nitric oxide synthases: Why so complex? *Annual Review of Nutrition*. 14. 131-145.
- Masui, Y. 1967. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Zoology*. 166. 365–375.
- Masui, Y., Markert, C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 177. 129-146.
- Matova, N., Cooley, L. 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. *Developmental Biology*. 231. 291–320.
- Matsuda, S., Kosako, H., Takenaka, K., Moriyama, K., Sakai, H., Akiyama, T., Gotoh, Y., Nishida, E. 1992. *The EMBO Journal*. 11. 973-982.
- Matsumi, H., Yano, T., Koji, T., Ogura, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Esumi, H. 1998. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 243. 67-72.
- Matsumoto, Y., Maller, J. L. 2002. Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in *Xenopus* egg extracts. *Science*. 295. 499-502.
- Matten, W., Daar, I., Woude, G. F. V. 1994. Protein kinase a acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular and Cellular Biology*. 14. 4419–4426.
- Mattioli, M., Galeati, G., Seren, E. 1988. Effect of follicle static cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Research*. 20. 177-184.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G. R., Garfield, R. E. 2003. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Current Pharmaceutical Design*. 9 (5). 359–380.

- Mc Cann, S. M., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W. H. 2003. The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Current Pharmacological Design*. 9. 381-390.
- Megson, I. L. 2000. Nitric oxide donor drugs. *Drug Future*. 25. 701-715.
- 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. 607-615.
- Mehta, J. L., Lopez, L. M., Chen, L., Cox, O. E. 1994. Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. *The American Journal of Cardiology*. 74. 901-905.
- Miao, Y. L., Kikuchi, K., Sun Q. Y., Schatten, H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*. 15 (5). 573-585.
- Michel, T., Li, G. K., Busconi, L. 1993. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90. 6252-6256.
- Mitchell, L. M., Kennedy, C. R., Hartshorne, G. M. 2004. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. *Human Reproduction* (Oxford, England). 19 (1). 30-40.
- Miyano, T. 2003. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*. 59. 61-72.
- Miyano, T., Dai, Y., Lee, J., Kano, K., Moor, R. M. 2000. Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase dephosphorylation during fertilization of the oocytes. *Zygote*. 8 (2). 153-158.
- Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12. 205-216.
- Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammalian eggs. *Developmental Biology*. 158. 62-78.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to repress *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature Letters*. 449. 336-341.
- Mok, Y. Y. P., Atan, M. S. B. M., Yoke Ping, Ch. Y., Jing, W. Z., Bhatia, M., Mochhala, S., Moore, P. K. 2004. Role of hydrogen sulfide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulfide biosynthesis. *British Journal of Pharmacology*. 143 (7). 881-889.

- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43. 109-141.
- Mood, K., Bong, Y. S., Lee, H. S., Ishimura, A., Daar, I. O. 2004. Contribution of JNK, Mek, Mos and PI-3K signaling to GVBD in *Xenopus* oocytes. *Cell Signaling*. 16. 631-642.
- Moore, G. 1978. RNA synthesis in fixed cells by endogenous RNA polymerase. *Experimental Cell Research*. 111. 317-326.
- 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., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47 (3). 485-491.
- Motlík J., Kubelka M. 1990. Cell-Cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27. 366-37.
- Motlík, J. 1989. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 38. 17-25.
- 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 GV in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 198. 155-162.
- Motlík, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.
- Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 49. 461-469.
- Mowry, K. L., Cote, C. A. 1999. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *The FASEB Journal*. 13. 435-445.
- Müller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1995. Myt1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*. 270. 86-90.
- Murad, F. 1994. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Advances in Pharmacology*. 26. 19-33.
- Murad, F. 1999. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Angewandte Chemie International Edition*. 38. 1856-1868.
- Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 116. 221-234.

- Murray, A. W., Solomon, M. J., Kirschner, M. W. 1989. The role cyclin synthesis and degradation in the kontrol of maturation promoting factor aktivty. *Nature*. 339. 280-286.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Snyder, S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling*. 2 (68). re2. DOI:10.1126/scisignal 268re2.
- Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., Nishino, T. 1998. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology*. 110. 243–250.
- Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J., Kimura, H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *The FASEB Journal*. 18. 557–9.
- Nakajo, N., Yoshitome, S., Iwashita, J., Iida, M., Uto, K., Ueno, S., Okamoto, K., Sagata, N. 2000. Absence of Wee1 ensures the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Genes & Development*. 14. 328-338.
- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67. 1588-1592.
- Nakane, M., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Forstermann, U., Murad, F. 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters*. 316. 175-180.
- Nathan, A. K., Xie, Q. W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 269. 13275-13278.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*. 6. 3051-3064.
- Nebreda, A. R., Gannon, J. V., Hunt, T. 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*. 14. 5597-5607.
- Němcová, V. 1999. Kysličník dusnatý a jeho působení v centrálním nervovém systému. *Psychiatrie*. 3. 174.
- Nishikimi, A., Matsukawa, T., Hoshino, K., Ikeda, S., Kira, Y., Sato, E. F., Inoue, M., Yamada, M. 2001. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction*. 122. 957-963.
- Nishiyama, T., Ohsumi, K., Kishimoto, T. 2007a. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446. 7139. 1096–1099.

- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007b. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 341-346. DOI:10.1038/nature06136.
- Norberg, H. S. 1972. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* (Vienna, Austria, 1948). 131. 497-517.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344. 503-508.
- Ogasawara, Y., Isoda, S., Tanabe, S. 1994. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 17 (12). 1535-1542.
- Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., Sagata, N. 2007. Erp1/Emi2 is Essentials for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology*. 303. 157-164.
- Okamoto, K., Nakajo, N., Sagata, N. 2002. The existence of two distinct Wee1 isoforms in *Xenopus*: implications for the developmental regulation of the cell cycle. *The EMBO Journal*. 21. 2472-2484.
- Olson, K. R., Dombkowski, R. A., Russell, M. J., Doellman, M. M., Head, S. K., Whitfield, N. L., Madden, J. A. 2006. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/ transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilatation. *Journal of Experimental Biology*. 209 (20). 4011-4023.
- Olson, K. R., Whitfield, N. L., Bearden, S. E., St. Leger, J., Nilson, E., Gao, Y., Madden, J. A. 2010. Hypoxic pulmonary vasodilation: a paradigm shift with a hydrogen sulfide mechanism. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*. 298 (1). R51-R60.
- Orrenius, S., Thivotovsky, B., Nicoretta, P. 2003. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 4 (7). 552-565.
- Ort, T., Maksimova, E., Dirkx, R., Kachinsky, A. M., Berghe, S., Froehner, S. C., Solimena, M. 2000. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of β 2-syntrophin and nNOS in pancreatic β -cells. *European Journal of Cell Biology*. 79. 621-630.
- Osawa, Y., Lowe, E. R., Everett, A. C., Dunbar, A. Y., Billecke, S. S. 2003. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase: effect of inhibitors and role of hsp90-based chaperones. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 304 (2). 493-497.

- Owen, E. P., Human, L., Carolissen, A. A., Harley, E. H., Odendaal, H. J. 1997. Hyperhomocysteinemia – A risk factor for sbruptio placentae. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 20. 359-362.
- Pae, H. O., Lee, Y. Ch., Jo, E. K., Chung, H. T. 2009. Subtitle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research*. 32 (8). 1155-1162.
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., Immenschuh, S. 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*. 80. 1895–1903.
- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R., 1998. link between MAP kinase and p34(cdc2) cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17. 5037–5047.
- Palmer, R. M. J., Ashton, D. S., Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (London)*. 33. 664-668.
- Palmer, R. M. J., Moncada, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 158. 348-352.
- Pan, L. L., Liu, X. H., Gong, Q. H., Wu, D., Zhu, Y. Z. 2011. Hydrogen Sulfide Attenuated Tumor Necrosis Factor- α -Induced Inflammatory Signaling and Dysfunction in Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE*. 6 (5). e19766. DOI:10.1371/journal.pone.0019766.
- Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues eproductive. *Biology and Endocrinology*. 7 (10). 1-9.
- Patra, D., Dunphy, W. G. 1998. Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is Essentials for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes & Development*. 12. 2549-2559.
- Pavlok, A., Kaláb, P., Bobák, P. 1997. Fertilisation competence of bovine normally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and Mbp kinase activity. *Zygote*. 5. 235–246.
- Perez, G. I., Knudson, C. M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J., Tilly, J. L. 1997. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nature Medicine*. 3. 9893–9898.
- Perez, G. I., Tao, X. J., Tilly, J. L. 1999. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 5. 414–420.

- Perez, G. I., Tilly, J. L. 1997. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Human Reproduction*. 12. 2781-2783.
- Peters, J. M. 1994. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends in Biochemical Sciences*. 19. 377-382.
- Peters, J. M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7. 644–656.
- Petr, J., Chmelíková, E., Krejčová, T., Řehák, D., Novotná, B., Jílek, F. 2010. Parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with a nitric oxide donor. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (3). 493-499.
- Petr, J., Rajmon, R., Chmelíková, E., Tománek, M., Lánská, V., Přibáňová, M., Jílek, F. 2006. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*. 14. 9-16.
- Petr, J., Rajmon, R., Lánská, V., Sedmíková, M., Jílek, F. 2005b. Nitric oxide-dependent activation of pig oocytes: Role of calcium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 242. 16-22.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005a. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71 (1). 115-122.
- Petr, J., Rozinek, J., Fulka, J. Jr., Jílek, F. 1994. Influence of cytoplasmic microinjection on meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 34 (1). 81-7.
- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during *in vitro* culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 196–204.
- Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of *in vitro* matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*. 70. 235–249.
- Petrová, I., Rajmon, R., Sedmíková, M., Kuthanová, Z., Jílek, F., Rozinek, J. 2005. Improvement of developmental competence of aged porcine oocytes by means of the synergistic effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal growth factor (EGF). *Czech Journal of Animal Science*. 50. 300–310.
- Petrová, I., Sedmíková, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Rajmon, R. 2004. *In vitro* aging of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49. 93–98.
- Petrová, I., Sedmíková, M., Petr, J., Vodková, Z., Pytloun, P., Chmelíková, E., Řehák, D., Čtrnáctá, A., Rajmon, R., Jílek, F. 2009. The Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK)

- and p38 Mitogen-activated Protein Kinase (p38 MAPK) in Aged Pig Oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 55. 75-82.
- Peunova, N., Scheinker, V., Cline, H., Enikolopov, G. 2001. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *The Journal of Neuroscience*. 21. 8809-8818.
- Phillips, K. P., Petrunewich, M. A. F., Collins, J. L., Booth, R. A., Liu, X. J., Baltz, J. M. 2002. Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos parthenogenotes. *Developmental Biology*. 247. 1. 210–223.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27–37.
- Pires, P. R., Santos, N. P., Adona, P. R., Natori, M. M., Schwarz, K. R., de Bern, T. H., Leal, C. L. 2009. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Animal Reproduction Science*. 116. 233-243.
- Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. W., Nakane, M., Murad, F. 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88. 10480-10484.
- Ponderato, N., Grasselli, F., Saleri, R., Tamanini, C. 2000. Factors modulating apoptosis: an *in vitro* study in swine granulosa cells. *Reproduction in Domestic Animals*. 35. 213-219.
- Poon, R. Y., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., Shuttleworth, J. 1993. The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *The EMBO Journal*. 12. 3123–3132.
- Procházka, R., Kaňka, J., Sutovský, P., Fulka, J., Motlík, J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 96 (2). 725-734.
- Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E., Maller, J. L. 2001. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell*. 12. 1791–1799.
- Qu, K., Lee, S. W., Bian, J. S., Low, C. M., Wong, P. T. H. 2008. Hydrogen sulfide: Neurochemistry and neurobiology. *Neurochemistry International*. 52. 155-165.
- Ratner, A. 1976. Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries *in vitro*. *Endocrinology*. 99. 1496–1500.

- Rauh, N. R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2005. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*. 437. 7061. 1048–1052.
- Reiffenstein, R. J., Hubert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 32. 109-134.
- Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Ochetti, S., Bosia, A., Massobrio, M., Lindblom, B., Ghigo, D. 2001. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 64. 1708-1712.
- Rime, H., Haccard, O., Ozon, R. 1992. Activation of p34cdc2 kinase by cyclin is negatively regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology*. 151. 105–110.
- Rime, H., Huchon, D., De Smedt, V., Thibier, C., Galaktionov, K., Jesus, C., Ozon, R. 1994. Microinjection of Cdc25 protein phosphatase into *Xenopus* prophase oocyte activates MPF and arrests meiosis at metaphase I. *Biology of the Cell*. 82. 11–22.
- Rime, H., Talbi, N., Popoff, M. R., Suziedelis, K., Jesus, C., Ozon, R. 1998. Inhibition of small G proteins by *Clostridium sordellii* lethal toxin activates cdc2 and MAP kinase in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology*. 204 (2). 592-602.
- Rinaldi, L., Gobbi, G., Pambianco, M., Micheloni, C., Mirandola, P., Vitale, M. 2006. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Laboratory Investigation*. 86. 391-397.
- Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Nedvídek, J., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Sefert J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V. 1988. *Obecná Biologie*. SPN Praha 695.
- Rong, L., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Shang, M., Guo, J. Z. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119 (22). 1877-1883.
- Rosselli, M., Keller, P. J., Dubey, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*. 4 (1). 3-24.
- Rozinek, J., Antalíková, L., Birkeová, P., Herčík, J. 1995. Ovarian differentiation in the cat and dog during prenatal period. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 26 (4). 301-316.
- Rudner, A. D., Murray, A. W. 2000. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *The Journal of Cell Biology*. 149. 1377-1390.
- Sagata, N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes. Its mechanisms and biological significance. *Trends in Cell Biology*. 6. 22-28.

- Sagata, N., Daar, I., Oskarson, M., Showalter, S. D., Vande Woude, G. F. 1989. The product of the mos proto-oncogene as a candidate „initiator“ for oocyte maturation. *Science*. 245. 643-646.
- Sato, E., Koide, S. S. 1987. Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocyte. *International Review of Cytology*. 106. 1-33.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. 2002. PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129 (15). 3533-3544.
- Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S. H. 2012. Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF- κ B Mediates Its Antiapoptotic Actions. *Molecular Cell*. 45. 13–24.
- Sen, U., Basu, P., Abe, O. A. 2009. Hydrogen sulphide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Animal Journal Physiology Renal Physiology*. 297 (2). F410-419.
- Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast out growth *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 58 (3). 262-68.
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11. 703-714.
- Schmidt, A., Duncan, P. I., Rauh, N. R., Sauer, G., Fry, A. M., Niqq, E. A., Mayer, T. U. 2005. *Xenopus* pololike kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes and Development*. 19 (4). 502–513.
- Schmidt, H. H., Warner, T. D., Ishii, K., Sheng, H., Murad, F. 1992. Insulin secretion from pancreatic β -cells caused by L-arginine derived nitrogen oxides. *Science*. 255. 721-723.
- Schmidt, K., Klatt, P., Mayer, B. 1993. Hypercholesterolemia is associated with a reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 13 (8). 1159-1163.
- Schramm, R. D., Bavister, B. D. 1999. A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates *Human Reproduction*. 14. 2544-2555.
- Schuler, M., Green, D. R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*. 29 (6). 684-688.

- Sidhu, R., Singh, M., Samir, G., Carson, R. J. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolate pregnant rat uterine strips *in vitro*. *Pharmacology and Toxicology*. 88 (4). 198–203.
- Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfriedrutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L., First, N. L. 1989. Timing of nuclear progression and protein-synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 40. 1257–1263.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 65. 126–136.
- Sive, H. L., Grainger, R. M., Harland, R. M. 2000. Early development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 338. ISBN:978-087969942-0.
- Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia. Praha. 478s. ISBN:21 088 86.
- Smith, L. D., Ecker, R. E., Subtelny, S. 1968. *In vitro* induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. *Developmental Biology*. 17. 627–643.
- Soleymanlou, N., Jurisica, I., Nevo, O., Ietta, F., Zhan, X., Zamudio, S., Post, M., Caniqqia, I. 2005. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90 (7). 4299–4308.
- Solomon, M. J. 1993. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Current Opinion in Cell Biology*. 5. 180–186.
- Song, T., Hatano, N., Kambe, T., Miyamoto, Y., Ihara, H., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Kume, K., Yamaguchi, F., Sugimoto, K., Kume, K., Yamaguchi, F., Tokuda, M., Watanabe, Y. 2008. Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Biochemical Journal*. 412. 223-231.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., Li, L. and Moore, P. K. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile fiction. *Journal of Sexual Medicine*. 4. 1304–1311.
- Srilatha, B., Adaikan, P. G., Moore, P. K. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulfide in erectile dysfunction – a pilot study. *European Journal of Pharmacology*. 535. 280-282.
- Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, G. P., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6 (7). 1875–1884.
- Staigmiller, R. B., Moor, R. M. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outsider the follicle. *Gamete Research*. 9. 221-229.

- Stamler, J. S. 1994. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 23. 78 (6). 931-6.
- Stárka, L. 2009. Sulfan - další plynný hormon? *Chemické Listy*. 103. 28-31.
- Steinhardt, R. A., Epel, D., Carroll, E. J., Jr. Yanagimachi, R. 1974. Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature*. 252. 41-43.
- Steuerwald, N. M., Steuerwald, M. D., Mailhes, J. B. 2005. Post-ovulatory aging of mouse oocytes Leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Molecular Human Reproduction*. 11 (9). 623-630.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *The Annual Review of Nutrition*. 24. 539-577.
- Stipanuk, M. H., Beck, P. W. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratase in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*. 206. 267-277.
- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *The Reproduction in Domestic Animals*. 34. 335-342.
- Stricker, S. 2011. Inhibition of germinal vesicle breakdown by antioxidants and the roles of signaling pathways related to nitric oxide and cGMP during meiotic resumption in oocytes of a marine worm. *Reproduction*. 143. 261-270.
- Stricker, S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology*. 211. 157-176.
- Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411. 217-230.
- Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Friffiths, O. W., Feldman, P. L., Wiseman, J. 1991. NG-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Biological Chemistry*. 266. 6259-6263.
- Su, Y., Kondrikov, D., Block, E. R. 2005. Cytoskeletal regulation of nitric oxide synthase. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 43. 439-449.
- Sugino, N., Takiguchi, S., Ono, M., Tamura, H., Shimamura, K., Nakamura, Y., Tsuruta, R., Sadamitsu, D., Ueda, T., Maekawa, T., Kato, H. 1996. Nitric oxide concentration in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Human Reproduction and Embryology*. 11 (11). 2484-2487.
- Sugiura, Y., Kashiba, M., Maruyama, K., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Goda, N., Suematsu, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7 (5-6). 781-787.

- Sun, Q. Y., Lai, L., Bonk, A., Prather, R. S., Schatten, H. 2001a. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size and protein synthesis inhibition. *Molecular Reproduction and Development*. 59. 131-137.
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001b. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 64. 871–889.
- Sun, Q., Nagai, T. 2003. Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 49. 347–359.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-including factor. *Nature*. 397. 441-446.
- Suzuki, H., Jeong, B. S., Yang, X. Z. 2000. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 723–729.
- Suzuki, H., Takashima, Y., Toyokawa, K. 2002. Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. *Journal of Reproduction and Development*. 48. 293–301.
- Suzuki, T., Suzuki, E., Yoshida, N., Kubo, A., Li, H., Okuda, E., Amanai, M., Perry, A. C. 2010. Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. *Development*. 137. 3281-3291.
- Szabó, C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature*. 6. 917-935.
- Taieb, F. E., Gross, S. D., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 2001. Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from meiosis I to II in *Xenopus* oocytes. *Current Biology*. 11 (7). 508-513.
- Takahashi, S., Mendelsohn, E. 2003. Synergistic Activation of Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) by HSP90 and Akt. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (33). 30821-30827.
- Takahashi, T., Saito, H., Hiroi, M., Doi, K., Takahashi, E. 2000. Effects of Aging on Inositol 1,4,5-Triphosphate-Induced Ca²⁺ Release in Unfertilized Mouse Oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 55. 299-306.
- Takase, K., Ishikawa, M., Hoshiai, H. 1995. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 175. 69–76.

- Takata, T., Kimura, J., Tsuchiya, Y., Naito, Y., Watanabe, Y. 2011. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 25. 145-152.
- Takesue, K., Hattori, M. A., Nishida, N., Kato, Y., Fujihara, N. 2001. Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 26. 259-265.
- Takesue, K., Tabata, S., Sato, F., Hattori, M. 2003. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 135-140.
- Tan, B. H., Wong, P. T. H., Bian, J. S. 2009a. Hydrogen Sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochemistry International*. 56 (1). 3-10. DOI: 10.1016/j.neuint.2009.08.008.
- Tan, X., Chen, D. Y., Yang, Z., Wang, Y. C., Li, M. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2009b. Phosphorylation of p90rsk during meiotic maturation and parthenogenetic activation of rat oocytes: correlation with MAP kinases. *Zygote*. 9. 269–276.
- Tang, W., Wu, J. Q., Guo, Y., Hansen, D. V., Perry, J. A., Freel, Ch. D., Nutt, L., Jackson, P. K., Kornbluth, S. 2008. Cdc2 and Mos regulate Emi2 stability to promote the meiosis I-meiosis II transition. *Molecular Biology of the Cell*. 19. 8. 3536–3543.
- Tang., G., Wu, L., Wang, R. 2010. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 37. 753–763.
- Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J., Xie, H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222. 93-103.
- Tarín, J. J., Albala-Perez, S., Cano, A. 2001. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biology of Reproduction*. 65. 141–150.
- Tarín, J. J., Albala-Perez, S., Perez-Hoyos, S., Cano, A. 2002. Postovulatory aging of oocyte decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biology of Reproduction*. 66. 495–499.
- Tatemoto, H., Muto, N. 2001. Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote*. 9. 15-23.
- Teague, B., Asiedu, S., Moore, P. K. 2002. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide *in vitro*: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *British Journal of Pharmacology*. 137. 139-145.

- Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., Marumo, F. 1992. Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNA in microdissected rat nephron segments. *The Journal of Clinical Investigation*. 90. 659-665.
- Tesfaye, D., Kadanga, A., Rings, F., Bauch, K., Jennen, D., Nganvongpanit, K., Hölker, M., Tholen, E., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Montag, M., Gilles, M., Kirfel, G., Herzog, V., Schellander, K. 2006. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during *in vitro* development of bovine pre-implantation embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 41 (6). 501-509.
- Thaler, C. D., Epel, D. 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Current Pharmaceutical Design*. 9 (5). 399-409.
- Thibault, C., Szollosi, D., Gerard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, Nutrition, Development*. 27. 865-896.
- Thomenius, M. J., Distelhorst, C. W. 2003. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance. *Journal of Cell Science*. 116. 4493-4499.
- Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 267. 1456-1462.
- Thompson, E. M., Legouy, E., Renard, J. P. 1998. Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development. *Developmental Genetics*. 22 (1). 31-42.
- Tichovská, H., Petr, J., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Tůmová, L., Krejčová, M., Dörflerová, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. 5. 1398-1405.
- Tinsley, R. C., Kobel, H. R. 1996. "The Biology of *Xenopus*." New York: Oxford University Press. Tinsley, R. C., Loumont, C. Kobel, H. R. 1996. Geographical distribution and ecology. In *The biology of Xenopus*, ed. R. C. Tinsley and H. R. Kobel. New York: Oxford University Press. 81-94.
- Tong, C, Fan, H. Y., Chen, D. Y., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*. 13. 375-385.
- Törnell, J., Billig, H., Hillensjö, T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human Reproduction* (Oxford, England). 6. 411-422.

- Törnell, J., Brännström, M., Hillensjö, T. 1984. Different effects of cyclic nucleotide derivatives upon the rat oocyte-cumulus complex *in vitro*. *Acta Physiologica Scandinavica*. 122. 507-513.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17. 683–710.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595-604.
- Van Blerkom, J., Bell, H. 1986. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. 93. 213-38.
- Van de Wiel, D. F. M., Bar-Ami, S., Tsafriri, A., de Jong, F. H. 1983. Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 68. 247-252.
- Van den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E. E., Bevers, M. M. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction*. 6. 457–74.
- Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Beckers, J. F. 1997. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*. 47. 73–82.
- Van Voorhis, B. J., Dunn, M. S., Snyder, G. D., Weiner, C. P. 1994. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 135. 1799-1806.
- Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbos, P. J. L. M., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C. P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *The Journal of Clinical Investigation*. 96. 2719-2726.
- Vanderhyden, B. C. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. 2006-2022.
- Vanderhyden, B. C., Armstrong, D. T. 1990. Effects of gonadotrophins and granulosa cell secretions on the maturation and fertilization of rat oocytes *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 26. 337-346.
- Vanderhyden, B. C., Cohen, J. N., Morley, P. 1993. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 133 (1). 423-426.
- Vaux, D. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90. 786-789.

- Viana, K. S., Caldas-Bussiere, M. C., Matta, S. G. C., Faes, M. R., Paes de Carvalho, C. S., Quirino, C. R. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 102. 217-227.
- Vorlaufer, E., Peters, J. M. 1998. Regulation of the cyclin B degradation system by an inhibitor of mitotic proteolysis. *Molecular Biology of the Cell*. 9. 1817-1831.
- Wallace, R. A., Jared, D. W., Nelson, B. L. 1970. Protein incorporation by isolated amphibia oocytes. I. Preliminary studies. *Journal of Experimental Zoology*. 175. 259-270.
- Wan, F., Anderson, D. E., Barnitz, R. A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L. T., Staudt, L. M., Levens, D., Deutsch, W. A., Leonardo, M. J. 2007. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell*. 131. 927-939.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd - Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. 16. 1792-1798.
- Wang, X. 2001. The expanding role of the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 15. 2922-2933.
- Wang, Y., Newton, D. C., Miller, T. L., Teichert, A. M., Phillips, M. J., Davidoff, M. S., Marsden, P. A. 2002. An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *The American Journal of Pathology*. 160 (1). 369-380.
- Warenycia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D., Dieken, F. P. 1989. Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical Pharmacology*. 38. 973-981.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil E., Neil J., editors.: *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press. 70-102.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. 1994. The Mammalian Ovum. In: Knobil E., Neil J. editors. *The Physiology of Reproduction*. New York. Raven Press. 69-102.
- Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M. R. 1995. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92 (5). 1585-9.
- Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y., Sagata, N. 1991. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 352. 247-248.
- Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y., Sagata, N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 342 (6249). 505-511.

- Webb, J. L., Harvey, M. W., Holden, D. W., Evans, T. J. 2001. Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but is not recruited to phagosomes. *Infection and Immunity*. 69. 6391-6400.
- Webb, M., Howkett, S., Moor, R. M. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*. 95. 131-145.
- Weber, M., Kubiak, J. Z., Arlinghaus, R. B., Pines, J., Maro, B. 1991. C-mos Proto-oncogene product is partly degraded after release from meiotic arrest and persists during interphase in mouse zygotes. *Developmental Biology*. 148 (1). 393-397.
- Wehrend, A., Meinecke, B. 2001. 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. 175-184.
- Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A., Hunter, T. 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *Journal of Cell Science*. 112. 3361-3371.
- Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Mayer, B. 1998. Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*. 219 (3). 171-182.
- Whitaker, M. 2006. Calcium at Fertilization and Early Development. *Physiological Reviews*. 86. 25-88.
- Whitaker, M.J. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*. 1. 127-135.
- Wilcox, C. S., Welch, W. J., Murad, F., Gross, S. S., Taylor, G., Levi, R., Schmidt, H. H. 1992. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89. 11993-11997.
- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Mateo, L., Alviggi, C., Pissature, M. L., Lombardi, L., De Placido, G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 16. 909-917.
- Williams, C. J. 2002. Signalling mechanism of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*. 8 (4). 313-321.
- Winder, C. V., Winder, H. O., Gesell, R. 1933. The seat of action of sulfide on pulmonary ventilation. *American Journal Physiology*. 105. 337-352.
- Winston, N. J., Maro, B. 1995. Calmodulin-dependent protein kinase II is activated transiently in ethanol-stimulated mouse oocytes. *Developmental Biology*. 170 (2). 350-352.

- Wolff, D. J., Datto, G. A. 1992. Identification and characterisation of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH3 pituitary cells. *The Biochemical Journal*. 285. 201-206.
- Wu, G. M, Sun, Q. Y., Mao, J. D., Lai, L., McCauley, T. C., Park, K. W., Prather, R. S., Didion, B. A., Day, B. N. 2002. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. *Biology of Reproduction*. 67. 170-177.
- Wu, J. Q., Hansen, D. V., Guo, Y., Wang, M. Z., Tang, W., Freel, C. D., Tung, J. J., Jackson, P. K., Kornbluth, S. 2007. Control of Emi2 activity and stability through Mos-mediated recruitment of PP2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104. 16564–16569.
- Wu, J. Q., Kornbluth, S. 2008. Across the meiotic divide – CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *Journal of Cell Science*. 21. 3509-3514.
- Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*. 57. 585-630.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270. 1326–1331.
- Xie, Q., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256. 225-228.
- Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G. S., Schultz, R. M., Ducibella, T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5,-triphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction*. 57. 743-750.
- Yamamoto, T., Bing, R. J. 2000. Nitric oxide donors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 22. 200-206.
- Yamanishi, M., Kabil, O., Sen, S., Banerjee, R. 2006. Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathione β -synthase. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 100. 1988-1995.
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., Hunt, T. 2004. Cell Cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell*. 16. 13 (1). 2-3.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization, in Kuobil, E., Neil, J. (eds.), *Physiology of the Reproduction*. Raven Press, New York. 189-280.

- Yanagimachi, R. 2005. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reproductive Biomedicine online*. 10 (2). 247-248.
- Yang, G., Sun, X., Wang, R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *The FASEB Journal*. 18. 1782-1784.
- Yang, J. Z., Ajonuma, L. C., Rowlands, D. K., Tsang, L. L., Ho, L. S., Lam, S. Y., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Chung, Y. W., Cho, C. Y., Tse, J. Y., James, A. E., Chan, H. C. 2005a. The role of inducible nitric oxide synthase in gamete interaction and fertilization: a comparative study on knockout mice of three NOS isoforms. *Cell Biology International*. 29. 785-791.
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., Wang, R. 2005b. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *Journal Physiology*. 569 (2). 519-531.
- Yoshida, M., Cran, D. G., Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 36 (4). 462-468.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M. 1997. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*. 2. 300-310.
- Yuo, X. J., Xu, C., Lu, J. Q., Zhu, X. Y., Gao, L., Cui, X. R., Li, Y., Gu, H., Ni, X. 2011. Expression of Cystathionine beta-synthase and Cystathionine gamma-lyase in Human Pregnant Myometrium and Their Roles in the Control of Uterine Contractility. *PLoS ONE*. 6 (8). e23788. DOI:10.1371/journal.pone.0023788.
- Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Subramanian, M. G. 1987. Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*. 262 (2). 564-571.
- Zackrisson, U., Mikuni, M., Wallin, A., Delbro, B., Hedin, L., Brannstrom, M. 1996. Cell specific localization of nitric oxide in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Human Reproduction* (Oxford, England). 11. 2667-2673.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu Y, Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*. 20 (21). 6008-16.
- Zhao, W., Ndisang, J. F., Wang, R. 2003. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 81 (9). 848-853.

Zhao, W., Wang R. 2002. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 283. H474-H480.

Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J. 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*. 11 (5). 631-6.