

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých
a časně stárnoucích oocytech prasete ovlivněných donory
sulfanu**

Diplomová práce

**Bc. Kristýna Melounová
Reprodukční biotechnologie**

Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých a časně stárnoucích oocytech prasete ovlivněných donory sulfanu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. dubna 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou mnohokrát poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za obrovskou ochotu, vstřícnost, přátelský přístup a především odbornou pomoc při zpracování této diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala svým rodičům a rodině za podporu a podmínky, které mi ke studiu vytvořili.

Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých a časně stárnoucích oocytech prasete ovlivněných donory sulfanu

Souhrn

Rozvoj reprodukčních biotechnologií s sebou nese vysoké nároky na kvalitu a kvantitu savčích oocytů. Zisk takových oocytů je ovlivněn zejména správným průběhem jejich *in vitro* kultivace. Ta je ovšem spojena i s řadou rizik, která mohou kvalitu oocytů narušovat a snižovat tak jejich vývojový potenciál. Velmi problematické je v tomto směru zejména vystavení oocytů prodloužené kultivaci, během které dochází k aktivaci procesu stárnutí.

Stárnutí oocytů je zahájeno již několik hodin po dosažení bloku meiózy v metafázi druhého meiotického dělení. Oocyty v této fázi setrvávají pouze omezenou dobu, neboť za fyziologických podmínek dochází k jejich oplození poměrně brzy po ovulaci. V případě, že k oplození nedojde, prochází stárnoucí oocyty řadou biochemických a strukturních změn, které vedou ke snížení jejich kvality a životaschopnosti. Důsledkem těchto změn může být spontánní partenogenetická aktivace, lýza či fragmentace oocytu, která je projevem apoptózy.

Programovaná buněčná smrt neboli apoptóza, je v buňkách řízena přes vnitřní a vnější signální dráhy. Do složité regulace apoptózy je zapojena celá řada molekul, mimo jiné i proteiny z rodiny Bcl-2, jejichž hlavní úlohou je regulace aktivity kaspáz, které štěpí proteinové struktury a zahajují tak apoptózu na kaspázách dependentní signální drahou. Dobře známým zástupcem anti-apoptotických molekul je protein Bcl-2, který apoptózu inhibuje. Naopak na aktivaci kaspázové signální dráhy se podílejí pro-apoptotické faktory, například protein BAX. Tyto zmíněné faktory mohou sloužit jako markery apoptózy oocytů.

Přesné mechanismy regulace procesu zrání a stárnutí oocytů nejsou ještě detailně popsány. Důležitou roli zde hrají i tzv. gasotransmitery, malé plynné molekuly se signalizační úlohou. Jedním z nich je sulfan, jehož endogenní produkce a úloha během meiotického zrání a stárnutí oocytů již byla potvrzena. Vystavení oocytů zvýšené koncentraci sulfanu prostřednictvím donorů sulfanu, během jejich prodloužené kultivace, vede ke zpomalení průběhu stárnutí. Nejčastěji využívané donory sulfanu jsou látky s tzv. rychlým mechanismem jeho uvolnění. Tento mechanismus se však od fyziologického módu signalizace může výrazně lišit.

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že použití donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování bude efektivnější než použití donoru s rychlým uvolněním sulfanu. Prasečí oocyty byly kultivovány po dobu 48 hodin do stádia MII za přítomnosti jednoho z donorů sulfanu (s pomalým uvolňováním a s rychlým uvolněním). Poté byla v dozrálých a časně stárnoucích oocytech (1 den prodloužené kultivace) provedena lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktoru BAX. Kvantitativní zhodnocení relativní intenzity signálu těchto faktorů v jednotlivých skupinách oocytů bylo provedeno pomocí programu NIS Elements.

Porovnáním relativní intenzity signálu sledovaných faktorů u skupin dozrálých oocytů ve stádiu MII s kontrolní skupinou byl zjištěn nárůst relativní intenzity signálu

anti-apoptického faktoru Bcl-2 u obou skupin oocytů zrajících za přítomnosti donorů sulfanu. Signifikantně vyšší relativní intenzita byla pozorována u skupiny oocytů zrající s donorem s rychlým mechanismem uvolňování sulfanu ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$), statisticky se však nelišila od donoru s pomalým/kontinuálním mechanismem uvolňování sulfanu. U skupin oocytů ovlivněných donory byla pozorována statisticky významně nižší relativní intenzita signálu pro-apoptického faktoru BAX oproti kontrolní skupině. Donory se zde signifikantně nelišily.

U časně stárnoucích oocytů nebyly mezi skupinami pozorovány statisticky významné rozdíly při porovnání relativních intenzit signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2. Jinak tomu bylo u pro-apoptického faktoru BAX, kde byla relativní intenzita signálu signifikantně nižší v obou skupinách stárnoucích oocytů, které byly během meiotického zrání ovlivněny jedním z donorů sulfanu. Lepších výsledků zde bylo dosaženo při použití donoru GYY4137, který se vyznačuje pomalým/kontinuálním uvolňováním sulfanu.

Z dosažených výsledků je patrné, že oba typy donorů sulfanu jsou schopny ovlivnit regulaci apoptózy oocytu a tím ve svém důsledku ovlivnit i kvalitu získaných oocytů. Signifikantně lepší výsledky jsme u donoru s pomalým/kontinuálním uvolňováním sulfanu pozorovali pouze u sledovaného faktoru BAX ve skupině časně stárnoucích oocytů, v ostatních skupinách jsme buďto nepozorovali žádné statisticky významné rozdíly nebo se od sebe skupiny oocytů ovlivněné donory vzájemně nelišily. Naše hypotéza byla tedy potvrzena jen částečně. Bylo by zajímavé ještě více imitovat fyziologický průběh signalizace použitím oscilačního módu působení donoru sulfanu a získané výsledky porovnat, to je však již nad rámec zadání této diplomové práce.

Klíčová slova: oocyt, prase, *in vitro* kultivace, sulfan

Localization of selected apoptotic markers in matured and early aging porcine oocytes affected by hydrogen sulphide donors

Summary

The development of reproductive biotechnology brings high demands on the quality and quantity of mammalian oocytes. The gain of such oocytes is mainly affected by the correct course of their *in vitro* cultivation. However, this is also associated with a number of risks that can disrupt the quality of oocytes and, thus reduce their developmental potential. Particularly problematic in this respect is the exposure of oocytes to prolonged cultivation, during which the aging process is activated.

Aging of oocytes begins just a few hours after reaching the block of meiosis in the metaphase of the second meiotic division. Oocytes remain at this stage only for a limited time, as under physiological conditions their fertilization occurs quite soon after ovulation. If fertilization does not occur, aging oocytes undergo a series of biochemical and structural changes that lead to a decrease in their quality and viability. These changes may result in spontaneous parthenogenetic activation, lysis or fragmentation of the oocyte, which is a manifestation of apoptosis.

Programmed cell death, or apoptosis, is controlled in cells through internal and external signaling pathways. A number of molecules are involved in the complex regulation of apoptosis, including proteins from the Bcl-2 family, whose main role is to regulate the activity of caspases, which break down protein structures, and thus initiate apoptosis by the caspase-dependent signaling pathway. A well-known representative of anti-apoptotic molecules is the Bcl-2 protein, which inhibits apoptosis. In contrast, pro-apoptotic factors, such as the BAX protein, are involved in activating the caspase signaling pathway. These factors may serve as markers of oocyte apoptosis.

The exact mechanisms for regulating the maturation and aging of oocytes have not yet been described in detail. The so-called gasotransmitters, small gaseous molecules with a signaling role, also play an important role here. One of them is hydrogen sulphide, whose endogenous production and role during meiotic maturation and aging of oocytes has already been confirmed. Exposure of oocytes to an increased concentration of hydrogen sulphide through hydrogen sulphide donors, during their prolonged cultivation, leads to a slowdown in the course of aging. The most commonly used hydrogen sulphide donors are substances with the so-called rapid mechanism of its release. However, this mechanism may differ significantly from the physiological mode of signaling.

The aim of this diploma thesis is to verify the hypothesis that the use of hydrogen sulphide donor with a slow/continuous release mechanism will be more effective than the use of a donor with rapid release of hydrogen sulphide. Pig oocytes were cultivated for 48 hours to the MII stage in the presence of one of the hydrogen sulphide donors (with slow release and rapid release). Then, in mature and early aging oocytes (1 day of prolonged cultivation), localization of anti-apoptotic factor Bcl-2 and pro-apoptotic factor BAX was performed. A quantitative

assessment of the relative signal intensity of these factors in each oocyte group was performed using the NIS Elements program.

By comparing the relative signal intensity of the monitored factors in the groups of mature oocytes in stage MII with the control group, an increase in the relative signal intensity of the anti-apoptotic factor Bcl-2 was observed in both groups of oocytes maturing in the presence of hydrogen sulphide donors. Significantly higher relative intensity was observed in the donor oocyte group with rapid hydrogen sulphide release mechanism ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), but statistically it was not different from the donor with a slow/continuous hydrogen sulphide release mechanism. In groups of donor-affected oocytes, a statistically significantly lower relative signal intensity of pro-apoptotic factor BAX was observed compared to the control group. Donors did not differ significantly here.

In early aging oocytes, no statistically significant differences were observed between the groups when comparing the relative signal intensities of the anti-apoptotic factor Bcl-2. The situation was different with the pro-apoptotic factor BAX, where the relative signal intensity was significantly lower in both groups of aging oocytes which were affected by one of the hydrogen sulphide donors during their meiotic maturation. Better results were achieved here using the donor GYY4137 which is characterized by slow/continuous release of hydrogen sulphide.

From the obtained results it is evident that both types of hydrogen sulphide donors are able to influence the regulation of oocyte apoptosis and thus, as a result, affect the quality of the oocytes obtained. Significantly better results were observed using the donor with slow/continuous release of hydrogen sulfide only in the BAX factor observed in the early aging oocyte group, in other groups we either did not notice any statistically significant differences or the groups of oocytes affected by donors did not differ from each other. Our hypothesis was, therefore, confirmed only partially. It would be interesting to imitate even more the physiological course of signaling by using the oscillating mode of action of the hydrogen sulphide donor and compare the obtained results, but that is already beyond the scope of this diploma thesis.

Keywords: oocyte, pig, *in vitro* cultivation, hydrogen sulphide

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Oogeneze	11
3.1.1 Embryonální vývoj vaječníků	11
3.1.2 Fáze množení	12
3.1.3 Fáze růstu a folikulogeneze	12
3.1.4 Fáze zrání	14
3.1.5 Regulace meiotického zrání	15
3.2 Stárnutí oocytů	24
3.2.1 Morfologické a biochemické změny oocytu během stárnutí	25
3.2.2 Možnosti regulace stárnutí oocytů <i>in vitro</i>	27
3.3 Gasotransmitery	28
3.3.1 Oxid dusnatý (NO)	28
3.3.2 Oxid uhelnatý (CO)	29
3.3.3 Sulfan (H ₂ S)	30
3.4 Donory sulfanu	34
4 Metodika	35
4.1 Zisk a výběr oocytů	35
4.2 Kultivace zrajících oocytů	35
4.3 Kultivace stárnoucích oocytů	35
4.4 Postup lokalizace vybraných apoptotických markerů	36
4.5 Statistické hodnocení	36
4.6 Experimentální schéma	36
5 Výsledky	38
5.1 Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu	38
5.2 Lokalizace vybraných apoptotických markerů v časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu	42
6 Diskuze	46
7 Závěr	49
8 Literatura	50

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie využívané nejenom v asistované reprodukci lidí, ale i u hospodářských zvířat, prochází již několik desítek let masivním rozvojem a úspěšnost těchto metod postupně narůstá, především díky intenzivnímu výzkumu cílenému na objasnění molekulárních mechanismů regulujících reprodukční procesy.

Klíčovým parametrem pro řadu biotechnologických postupů je získání kvalitních oocytů ve stádiu metafáze II s korektním vývojovým potenciálem, které lze již standardně získat i v *in vitro* podmínkách dozráním meioticky kompetentních oocytů. Dozrálé oocyty však mohou svůj vývojový potenciál poměrně záhy po dosažení stádia metafáze II ztratit, neboť velmi brzy dochází k aktivaci procesů spojených se stárnutím. V *in vitro* podmínkách k tomu dochází při prodloužené kultivaci.

Stárnutí oocytů provází celá řada morfologických a biochemických změn, které mají za následek významné snížení jejich kvality a použitelnosti pro biotechnologické postupy. Celý proces pak často končí spontánní partenogenetickou aktivací, lýzou či fragmentací oocytů, která je projevem programované buněčné smrti neboli apoptózy.

Apoptóza je v buňkách řízena složitou kaskádou signálních drah, kde má nezastupitelnou úlohu řada apoptotických faktorů z proteinové rodiny Bcl-2. Hlavní úlohou těchto faktorů je regulace aktivity kaspáz, což jsou proteázy štěpící proteinové struktury a zajišťující apoptózu buněk tzv. vnitřní signální drahou. Tato široká rodina Bcl-2 proteinů zahrnuje jak pro-apoptotické, tak i anti-apoptotické faktory. Mezi nejznámější faktory se schopností inhibice apoptózy patří například protein Bcl-2. Naopak jedním z nejvýznamnějších pro-apoptotických faktorů je protein BAX. Tyto vybrané faktory je možné použít jako markery apoptózy.

Bylo prokázáno, že do regulace procesu stárnutí oocytů jsou zapojeny i gasotransmitery, mezi které řadíme oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sulfan. Jsou to plynné molekuly produkované v buňkách specifickým enzymatickým aparátem. Především nezastupitelná úloha sulfanu v regulaci procesu stárnutí oocytů již byla potvrzena. Zvýšení hladiny sulfanu, dodáním donoru sulfanu do kultivačního média během jejich prodloužené kultivace, vedlo ke zpomalení nástupu apoptózy oocytů.

Běžně využívanými donory sulfanu v laboratořích jsou dnes zejména hydrogensulfid sodný (NaHS) a sulfid sodný (ve formě nonahydrátu - $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$), které patří mezi tzv. okamžité donory. Takové donory však díky rychlému počátečnímu uvolnění sulfanu nemusí dostatečně kopírovat fyziologický způsob signalizace v oocytech. Lepší volbou by proto mohly být donory s jiným mechanismem uvolňování sulfanu, například morfolin-4-ium-4-methoxyfenyl (morfolino) fosfinodithioát (GYY4137) s pomalým/kontinuálním uvolňováním sulfanu.

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, že použití donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování bude efektivnější než použití donoru s rychlým uvolněním sulfanu, a to pomocí lokalizace vybraných markerů apoptózy v dozrálých a časně stárnoucích prasečích oocytech, které byly během *in vitro* zrání ovlivněny donory sulfanu s různým mechanismem jeho uvolňování.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že použití donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování bude efektivnější než použití donoru s rychlým uvolněním sulfanu.

Cílem práce bylo ověřit stanovenou hypotézu prostřednictvím sledování relativní intenzity signálu a lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých a časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu s různým mechanismem jeho uvolňování.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Oogeneze je proces vývoje zralé samičí zárodečné buňky neboli vajíčka. U savců začíná relativně brzy, již během embryonálního vývoje. Základem pro oogenezi jsou primordiální zárodečné buňky (PGC – primordial germ cells), které prodělávají řadu buněčných změn a přes stádium oogonie a oocyty se mění ve zralá vajíčka. Výsledkem tohoto precizně řízeného procesu je tak buňka, která je jedinečným způsobem schopna zajistit vývoj nového jedince (Wassarman 1988).

Všechny zralé gamety savců vznikají meiózou, která zajišťuje vývoj geneticky variabilního potomstva. Meióza je zvláštním typem buněčného dělení, neboť zahrnuje jedno kolo replikace DNA a dvě po ní následující buněčná dělení. Během meiózy I neboli redukčního dělení dochází k segregaci homologních chromozomů. Meióza II neboli ekvační dělení potom zahrnuje segregaci sesterských chromatid. Výsledkem tohoto typu buněčného dělení je redukce počtu chromozomů a vznik haploidních zárodečných buněk (Hunt & Hassold 2008).

3.1.1 Embryonální vývoj vaječníků

Embryonálním základem savčích gonád jsou u obou pohlaví párové genitální lišty, které jsou tvořeny proliferujícím coelomickým epitelem (mezotelem) a mezenchymem. Tyto primitivní gonády se v závislosti na druhu savce objevují mezi 10. až 30. dnem březosti na mediální straně mezonefros (Wilhelm et al. 2007). V dalším stádiu dochází k osídlování vyvíjejících se gonád primordiálními zárodečnými buňkami (PGC – primordial germ cells). Ty pocházejí z endodermálního žloutkového vaku a do genitálních lišt migrují na základě chemotaxe (Mintz 1957). V tomto stádiu vývoje mluvíme o indiferentních gonádách, které se mohou dále vyvíjet směrem k oběma pohlavím.

Pohlaví embrya je určeno již v době oplození vajíčka. Samice savců mají ve všech svých somatických buňkách dva chromozomy X, zatímco samci mají jeden X a jeden Y. Rozhodujícím faktorem je tedy přítomnost chromozomu Y. Pohlaví výsledné zygoty je určeno spermií nesoucí chromozom X nebo Y, zatímco vajíčko nese vždy chromozom X. Chromozom Y ovlivňuje pohlaví jedince indukcí vývoje somatických buněk genitálních lišt ve varlata, namísto vaječníků (Alberts et al. 2002).

Tato diferenciací pohlaví je spuštěna na základě přítomnosti genu SRY (sex – determining region Y), který je lokalizován právě na krátkém raménku chromozomu Y a je zodpovědný za spuštění vývoje samčích pohlavních žláz (Gubbay et al. 1990). SRY je exprimován pouze v podmnožině buněk vyvíjejících se v pohlavní žlázy a způsobuje, že se tyto buňky diferencují na buňky Sertoliho, jež jsou hlavním typem podpůrných buněk nacházejících se ve varlatech. Pokud gen SRY není přítomen dochází u zárodka k vývoji vaječníků (Alberts et al. 2002).

3.1.2 Fáze množení

Základem pro oogenezi jsou primordiální zárodečné buňky (PGCs), které mají původ v endodermálním žlutkovém vaku. Jedná se o zhruba 12 μm velké buňky, které migrují ze žlutkového vaku přes zadní prvostřevo do genitálních lišt. Tato migrace je až po oblast prvostřeva pasivní, poté se mění na aktivní améboidní pohyb (Wassarman 1988).

Primordiální zárodečné buňky (PGCs), které kolonizovaly základ vaječníků a ztratily schopnost migrace jsou označovány jako oogonie (Siracusa et al. 1985). Tyto buňky se u prasat od 13. dne embryonálního vývoje do zhruba 7. dne po narození intenzivně mitoticky dělí a jejich počet se mezi 20. až 50. dnem březosti zvyšuje z přibližně 5000 až na 1 100 000. Poté jejich mitotická aktivita klesá a značná část těchto buněk podléhá během dalšího vývoje zániku. Výsledkem je tak přítomnost populace zhruba 500 000 oogonií při narození samice (Black & Erickson 1968).

Oogonie vytváří shluky, ve kterých mezi sebou komunikují pomocí mezibuněčných spojů. Tyto spoje mají pravděpodobně funkci v udržování synchronizovaného vývoje buněk v rámci jednoho shluku (Gondos & Zamboni 1969).

3.1.3 Fáze růstu a folikulogeneze

Schopnost oplození získává vajíčko teprve po dlouhém období růstu a zrání. Tento proces zahrnuje jak syntézu cytoplazmatických složek, tak i přeskupení a redukci chromozomů a začíná již během embryonálního vývoje samice (Hunter 2000). Oogonie vzniklé mitózou vstupují do meiotického dělení, během kterého vznikají z jedné diploidní buňky čtyři buňky haploidní. Toto redukční dělení samičích, ale i samčích, pohlavních buněk je nutné pro udržení diploidního počtu chromozomů v následně vzniklém embryu. Narozdíl od meiózy spermií, dochází při meióze oocytů k asymetrickému dělení cytoplazmy, proto je výsledkem pouze jedna oplození schopná gameta (vajíčko) a dvě, případně tři, pólová tělíska (Pollard et al. 2016).

Po vstupu do prvního meiotického dělení se z oogonií stávají primární oocyty neboli oocyty I. řádu (Vanderhyden 2002). Začátek meiózy je u samičích pohlavních buněk indukován kyselinou retinovou, která zvyšuje hladinu cytoplazmatického proteinu v angličtině nazývaného Stimulated by Retinoic Acid, gen 8 (Stra8). Stra8 hraje roli v premeiotické replikaci DNA a podílí se na kondenzaci, kohezi, synapsi a rekombinaci chromozomů během profáze meiózy (Baltus et al. 2006; Bowles et al. 2006). U samců je kyselina retinová až do puberty degradována cytochromem P450 (Cyp26b1), proto samčí pohlavní buňky nevstupují do meiózy již během embryonálního vývoje, ale až v období pohlavní dospělosti (Bowles et al. 2006; Anderson et al. 2008).

Meióza je zahájena profází I, která je rozdělena do pěti stádií: leptotén, zygotén, pachytén, diplotén a diakineze. V prvních stádiích profáze dochází k řadě zásadních událostí, které zahrnují kondenzaci chromozomů, párování homologních chromozomů, synapsi (úzké spojení mezi těmito chromozomy), rekombinaci (překřížení nesesterských chromatid) a crossing over (výměnu genetického materiálu) (Hunt & Hassold 2008). Fázi leptotén absolvuje oocyt za zhruba 3 – 6 hodin. Ve stádiu zygotén, které trvá 12 – 40 hodin, dochází k párování homologních chromozomů a synapsi, čímž vznikají bivalenty složené ze čtyř chromatid. Ve stádiu pachytén dochází během 60 hodin k rekombinaci a crossing overu. Celkem tedy přechod ze stádia leptotén do stádia pachytén trvá zhruba 4 dny. Do stádia diplotén vstupují například

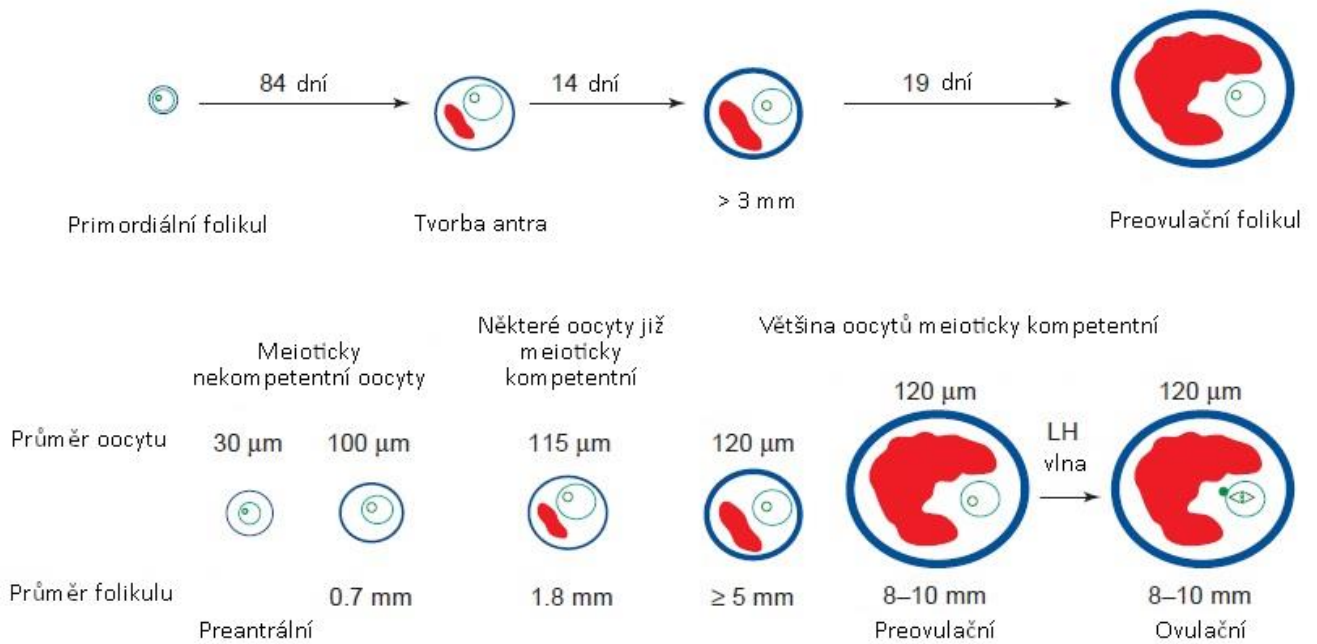
první myši oocyty zhruba 18. den embryonálního vývoje a na jejich chromozomech můžeme pozorovat chiasmata, která jsou výsledkem crossing overu (Wassarman 1988). V tomto stádiu je také první meiotické dělení zastaveno a primární oocyty vstupují do klidové fáze, zvané dictyotén, ve které setrvávají až do dosažení pohlavní dospělosti a zahájení pohlavního cyklu (Vanderhyden 2002; Hunt & Hassold 2008). Na zajištění tohoto prvního meiotického bloku se mimo jiné podílí například nízkomolekulární peptid nazývaný inhibitor zrání oocyty (OMI – oocyte maturation inhibitor), který je produkován folikulárními buňkami (Sadler 2011). U prasat byly oocyty v profázi meiózy I pozorovány od 47. dne březosti (Bielańska-Osuchowska 2006).

Primární oocyty jsou postupně obkloповány somatickými buňkami, které jsou nazývány buňkami pregranulózními a mohou pocházet ze třech různých zdrojů: rete ovarii (Byskov 1975), mezenchymálních buněk gonád (Albrecht & Eicher 2001) a povrchového epitelu ovarii (Gondos 1975). Konkrétní zdroj se potom liší v závislosti na živočišném druhu (Sawyer et al. 2002). Pregranulózní buňky se dále vyvíjejí a jako jedna vrstva plochých buněk obalujících primární oocyty vytvářejí primordiální folikuly (Vanderhyden 2002). Ty je u prasat možné pozorovat zhruba od 56. dne březosti (Bielańska-Osuchowska 2006).

V klidové fázi prochází primární oocyt výrazným růstem, který je nutný pro vstup do fáze zrání a dokončení prvního meiotického dělení. Tento růst zahrnuje kromě zvětšení objemu oocyty také reorganizaci jádra a některých dalších organel, jako jsou mitochondrie nebo Golgiho komplex a aktivní syntézu a akumulaci většího množství RNA. Během této fáze se tak prasečí oocyt zvětší ze zhruba 30 μm až na 120 μm (Zamboni 1970; Motlík & Fulka 1986).

S růstem oocyty dochází také k přeměně primordiálního folikulu na primární folikul, a to morfologickou změnou tvaru plochých pregranulózních buněk na buňky kubické, které jsou dále nazývány jako buňky granulózní nebo také folikulární (Aerts & Bols 2010). Vývoj folikulu pokračuje intenzivním mitotickým dělením folikulárních buněk, které se formují do několika vrstev a tvoří tak mnohvrstevný epitel *membrana granulosa* (Junqueira et al. 1997). Ze tří typů glykoproteinů (ZP1, ZP2 a ZP3) produkováných oocytem a folikulárními buňkami je formována *zona pellucida* a z vazivové kůry vaječniku se vytváří *theca folliculi* (Hirshfield 1991; Fair 2003; Webster & de Wreede 2012). Mezi folikulárními buňkami se postupně začínají vytvářet dutinky vyplněné tekutinou zvanou *liquor folliculi*. Postupným přibýváním folikulární tekutiny dochází ke splnutí dutinek v antrum a vytvoření antrálního folikulu, ve kterém část folikulárních buněk vytváří vejconosný hrbolek (*cumulus oophorus*), v jehož středu je umístěn oocyt (Smitz & Cortvrindt 2002; Vanderhyden 2002). *Theca folliculi* je nyní rozdělena na dvě vrstvy – *theca folliculi interna*, která produkuje androgeny, a *theca folliculi externa*, která má podpůrnou funkci (Erickson et al. 1985; Webster & de Wreede 2012).

Oocyt již dále neroste, ale spolu s přibývajícím tekutinou dochází k růstu folikulu zvětšováním jeho dutiny při současném ztenčováním *membrany granulosa*. Folikulární buňky nejbližší k oocyty, vytvářejí okolo *zóny pellucidy* vrstvu zvanou *corona radiata*, která později ovuluje spolu s oocytem. Takový folikul je nazýván jako zralý neboli Graafův folikul. Je ovšem nutné si uvědomit, že do tohoto stádia se dostane jen velmi malá část z původního počtu zárodečných buněk, neboť většina z nich podléhá v průběhu vývoje atrezii (Junqueira et al. 1997). Folikulogeneze je znázorněna na obrázku 1.



Obr. 1. Folikulogeneze (upraveno podle Hunter 2000).

Folikulární buňky komunikují s oocytem pomocí mezerových spojů (gap junctions) a zásobují ho tak energetickými substráty, nukleosidy, aminokyselinami a fosfolipidy. Rychlost růstu oocyty je tedy přímo ovlivněna počtem folikulárních buněk, které ho obklopují, neboť tak zvětšují povrch pro vstup malých molekul potřebných k zajištění jeho růstu a vývoje (Herlands & Schultz 1984; Hunter 2000).

Výsledkem celé fáze růstu je plně dorostlý oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle), který je schopen znovuzahájení a dokončení meiotického zrání (Vanderhyden 2002).

3.1.4 Fáze zrání

Zrání oocyty je proces přeměny plně dorostlého oocyty na vajíčko schopné ovulace a oplození. V této fázi musí primární oocyt nejprve dokončit první meiotické dělení, jehož výsledkem je vznik sekundárního oocyty neboli oocyty II. řádu a prvního pólového tělíska (primárního polocyty). Sekundární oocyt poté vstupuje do druhého meiotického dělení, které je zastaveno v metafázi II a dokončeno až po případném oplození (Vanderhyden 2002). Schopnost oocyty řádně dokončit meiózu koreluje, zejména u savců, s jeho velikostí. Například u prasat jsou oocyty ve folikulech nad 1 mm velikosti schopny v *in vitro* podmínkách znovuzahájit meiózu, ale jen ty nad 2 mm velikosti jsou schopny první meiotické dělení dokončit (Motlik et al. 1984).

Do fáze zrání vstupuje oocyt po dosažení pohlavní dospělosti samice a zahájení pravidelného estrálního cyklu. K samotnému znovuzahájení meiózy dochází v reakci na nárůst hladiny luteinizačního hormonu (LH), který spouští signální kaskádu vedoucí k uvolnění

prvního meiotického bloku a rozpadu zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown), což je vlastně rozpad jaderné membrány (Edson et al. 2009).

3.1.5 Regulace meiotického zrání

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP)

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát patří mezi druhé posly a hraje významnou roli v regulaci zrání savčích oocytů, neboť se podílí na zajištění prvního meiotického bloku (Mehlmann et al. 2002).

cAMP je vytvářen především v granulózních buňkách, které mají receptory spojené s G-proteiny. Působením extracelulárních signálů na tyto receptory dochází k aktivaci enzymu adenylátcyklázy (AC), která cAMP syntetizuje z lineárních molekul ATP (Mehlmann et al. 2002). Z granulózních buněk je cAMP transportován do oocytu pomocí mezibuněčných spojů gap junctions (Dekel 1988). Rychlým nárůstem jeho koncentrace v oocytu dochází k aktivaci cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA), která zajišťuje fosforylaci celé řady dalších proteinů (Conti et al. 2012).

Degradace cAMP je zajišťována fosfodiesterázou 3A (PDE3A), která ho štěpí na 5'-adenosinmonofosfát (AMP). Během meiotického bloku je ale funkce PDE3A inhibována cyklickým guanosinmonofosfátem (cGMP). Ten do oocytu také difunduje z buněk granulózy (Vaccari et al. 2009).

PKA, aktivovaná vysokou koncentrací cAMP, inhibičně fosforyluje fosfatázu Cdc25, která je nutná pro aktivaci faktoru podporujícího zrání (MPF – maturation promoting factor). Tím je zajištěno udržení prvního meiotického bloku až do znovuzahájení meiózy (Duckworth et al. 2002; Conti et al. 2012).

Preovulační vlna luteinizačního hormonu (LH) způsobuje morfologické změny v obalu oocytu a dochází tak k přerušení gap junctions, které zajišťují komunikaci a přenos molekul mezi oocytem a granulózními buňkami. Do oocytu nejsou přenášeny další molekuly cAMP, ani cGMP. Dochází k aktivaci fosfodiesterázy a štěpení cAMP, jehož hladina v oocytu tak rychle klesá. Výsledkem je defosforylace PKA, přerušení prvního meiotického bloku a znovuzahájení meiózy (Hurk & Zhao 2005).

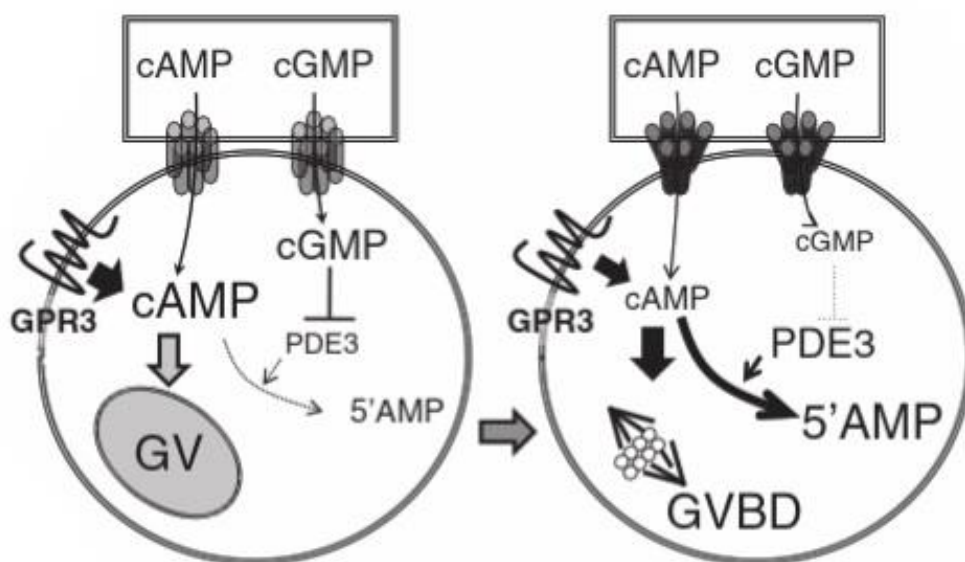
Cyklický guanosin monofosfát (cGMP)

Dalším významným druhým poslem, který se také podílí na inhibici zrání a udržení prvního meiotického bloku, je cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (Hubbard & Terranova 1982).

cGMP je stejně jako cAMP produkován v granulózních buňkách a do oocytu je transportován přes gap junctions. Syntézu cGMP z guanosintrifosfátu (GTP) zajišťuje enzym guanylátcykláza (GC). Jeho degradaci zprostředkovává cGMP – fosfodiesteráza (Vaccari et al. 2009).

Úlohou cGMP při udržování meiotického bloku je inhibice funkce fosfodiesterázy 3A (PDE3A), která štěpí cAMP na AMP. cGMP tedy inhibuje degradaci cAMP a udržuje tak jeho vysokou koncentraci v oocytu. Ta je nutná pro udržení meiotického bloku (Vaccari et al. 2009).

Preovulační vlna luteinizačního hormonu (LH) způsobuje přerušení gap junctions, koncentrace cGMP klesá a dochází k aktivaci PDE3A (Ratner 1976). Znázornění indukce znovuzahájení meiózy je zobrazeno na obrázku 2.



Obr. 2. Schématické znázornění indukce znovuzahájení meiózy (Krisher 2013).

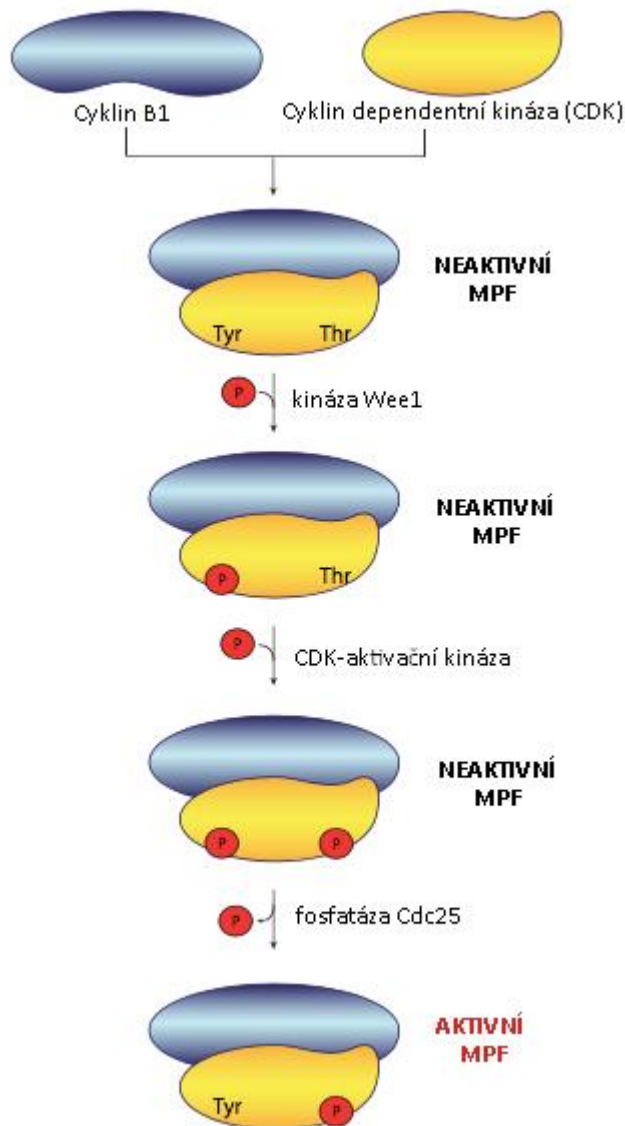
Faktor podporující zrání (MPF – maturation promoting factor)

Faktor podporující zrání neboli MPF je univerzálním regulátorem buněčného cyklu mitózy i meiózy. Aktivní MPF zajišťuje rozpad jaderné laminy, kondenzaci chromozomů, přeskupení mikrofilament a reorganizaci sítě intermediálních filament. Hraje tak klíčovou roli při meiotickém zrání. Jeho vysoká aktivita je navíc nutná k udržení 2. meiotického bloku (Stojkovic et al. 1999).

MPF je heterodimer složený ze dvou podjednotek – katalytické (34 kDa) a regulační (45 kDa). Katalytickou podjednotku tvoří cyklin dependentní kináza (Cdk1/p34^{cdc2}) ze skupiny serin/treonin proteinkináz. Regulační podjednotkou je molekula cyklinu B, kterého známe tři typy – B1, B2 a B3. Za aktivitu MPF u savců je pravděpodobně zodpovědný typ B1 (Dekel 1996; Jones 2004). Koncentrace p34^{cdc2} je během růstu oocyty velmi nízká. Její zvýšení na konci růstu je spojeno se získáním meiotické kompetence (Vantéry et al. 1996).

V nezralém oocyty se komplexy cyklinu B1 a p34^{cdc2} vyskytují v neaktivní formě, jako tak zvaný pre-MPF. Tato inaktivní forma je zajištěna fosforylací p34^{cdc2} na Thr14 a Tyr15 inhibičními kinázami Wee1 a Myt1. Jeho aktivaci zajišťuje fosfatáza Cdc25, která defosforyluje Thr14 a Tyr15, a proteinová kináza zvaná CDK-aktivační kináza, která fosforyluje Thr 161 (Fesquet et al. 1993; Jones 2004). Fosfatáza Cdc25 je inhibičně fosforylována proteinkinázou A, což opět vede k udržení prvního meiotického bloku. K aktivaci Cdc25 je nutná jeho defosforylace (Duckworth et al. 2002; Pirino et al. 2009). Jednu zajišťuje polo-like kináza 1 (Pkl1), která také patří do rodiny serin/treonin proteinkináz, druhou

zajišťuje samotné MPF (Stojkovic et al. 1999; Alberts et al. 2002). Aktivace MPF je schématicky znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3. Aktivace MPF (upraveno podle Wong 2020).

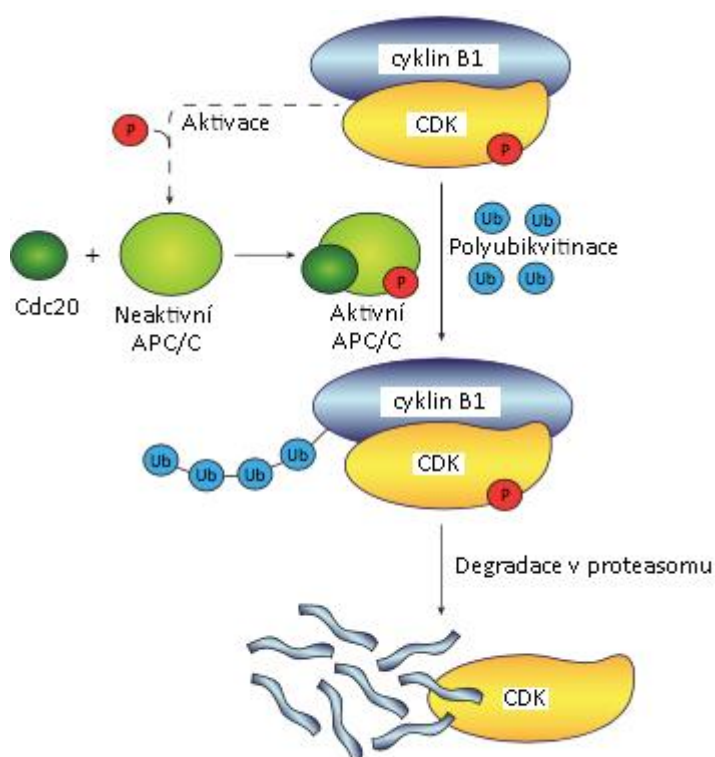
Jedná se tedy o pozitivní zpětnou vazbu, díky které může MPF aktivovat další pre-MPF. Aktivní MPF-kináza fosforyluje další molekuly aktivační fosfatázy Cdc25, které aktivují další MPF. Tím dochází k prudkému nárůstu hladiny MPF v buňce a ta rychle vstupuje do M-fáze buněčného cyklu (Alberts et al. 2005).

Aktivita MPF se objevuje krátce před GVBD a osciluje během buněčného cyklu se dvěma vrcholy – během metafáze meiózy I a během meiotického bloku v metafázi II (Stojkovic et al. 1999). MPF fosforyluje proteiny laminy jaderné membrány, čímž způsobuje desintegraci a rozpad jaderné membrány – GVBD (Alberts et al. 2005). Nasledně svojí aktivitou zajišťuje kondenzaci chromozomů před vstupem do meiózy I. Naopak snížení jeho aktivity je nutné pro

přechod z metafáze I do anafáze I a dokončení prvního meiotického dělení (Stojkovic et al. 1999).

Pro pokles hladiny MPF je nutná degradace cyklinu B1, díky které dochází k deaktivaci MPF. Tato degradace je zajišťována ubikvitin dependetním proteolytickým systémem, kdy je několik molekul ubikvitinu kovalentně navázáno na cyklin a ten je tak označen pro degradaci v proteasomech (Alberts et al. 2005). V případě cyklinu B1 je polyubikvitinace zajištěna anafázi podporujícím komplexem neboli cyklosomem (APC/C), což je komplex ubikvitin ligázy E3, který polyubikvitinuje cyklin B1 a označí ho tak za cíl pro proteolýzu proteasomem 26S (Irniger 2002). APC/C vyžaduje pro svou ligázovou aktivitu doplňkové proteiny, jako Cdh1 nebo Cdc20/fizzy, se kterými vytváří komplex (Homer 2013).

Se vstupem do meiózy II aktivita MPF opět stoupá a dosahuje druhého vrcholu v metafázi II, kde udržuje druhý meiotický blok až do oplození. Tento meiotický blok není zajištěn pouze inhibicí funkce APC/C, jak by se dalo předpokládat, ale také samotným oocyt, který zvládá synchronizovat syntézu cyklinu B1 s jeho degradací. Díky neustálé syntéze cyklinu B1 tak nedochází k výraznému poklesu hladiny MPF a oocyt je udržován ve fázi druhého meiotického bloku (Jones 2004). Degradace cyklinu B1 je schématicky znázorněna na brázku číslo 4.



Obr. 4. Polyubikvitinace cyklinu B1 pomocí APC a jeho degradace v proteasomu (upraveno podle Wong 2020).

Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK – mitogen activated protein kinase)

Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje meiotické zrání oocyty je mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK) někdy také nazývána jako kináza regulovaná extracelulárním signálem (ERK – extracellular signal-regulated kinase). MAPK patří do rodiny serin/treonin proteinkináz a k její aktivaci je nutná dvojitá fosforylace na treoninových a tyrosinových zbytcích. V savčích oocytech jsou široce exprimovány dvě izoformy MAPK, které hrají klíčovou roli v průběhu meiózy. Jedná se o ERK1 (44 kDa) a ERK2 (42 kDa) (Sun et al. 1999).

Přímým aktivátorem MAPK je proteinová kináza s dvojitou specificitou, která MAPK aktivuje prostřednictvím fosforylace na threoninu 183 a tyrosinu 185. Tato kináza je nazývána jako MAPK kináza (MAPKK) nebo také MEK. MAPKK je také aktivována fosforylací a jejím aktivátorem je Mos neboli MAPKK kináza (MAPKKK), která je produktem protoonkogenu *c-mos*. Mos je 39 kDa serin/treonin proteinkináza, která byla poprvé identifikována v buňkách transformovaných virem myši leukémie a je exprimována výhradně v zárodečných buňkách (Fan & Sun 2004).

Aktivace signální kaskády Mos/MEK/MAPK je iniciována extracelulárními signály jako jsou růstové faktory, hormony nebo cytokiny. Dalším aktivátorem MAP kinázové kaskády mohou být patologické podněty, které způsobují buněčný stres. Mezi takové patří například ozáření, tepelný šok, osmotická nerovnováha, poškození DNA nebo bakteriální metabolity. MAPK aktivovaná těmito podmínkami potom řídí genovou expresi, metabolismus, organizaci cytoskeletu a další důležité buněčné události (Garrington & Johnson 1999).

Obě izoformy MAPK (ERK1 i ERK2) byly v prasečím oocyty nalezeny již během prvního meiotického bloku. Jedná se ale o neaktivní formu MAPK, která je lokalizována výhradně v cytoplazmě oocyty a až těsně před GVBD se část těchto molekul přesouvá do zárodečného vaku (Inoue et al. 1998).

Načasování aktivace MAPK během zrání oocytů se na rozdíl od MPF liší podle druhu savce. U některých druhů, jako jsou myši a krysy, dochází k aktivaci MAPK 2 hodiny po spontánním GVBD, což napovídá tomu, že MAPK není pro spontánní GVBD myších ani krysích oocytů důležitá (Verlhac et al. 1993). U oocytů velkých hospodářských zvířat je časová souvislost mezi aktivací MAPK a GVBD méně jasná. V oocytech prasete, krávy, kozy a koně je cytoplazma oocyty neprůhledná, v důsledku přítomnosti tmavých lipidových kapének, a jádro je tak v živých buňkách prakticky neviditelné. Navíc také znovuzahájení meiózy trvá u oocytů hospodářských zvířat poměrně dlouhou dobu a GVBD je tak v těchto oocytech poněkud asynchronní (Fan & Sun 2004; Liang et al. 2007). Fissore et al. (1996) například uvádí, že v oocytech skotu dochází k současné aktivaci MAPK a MPF před GVBD. V kozích oocytech je zase aktivita MAPK detekována výrazně později než aktivita MPF, a to až po GVBD (Dedieu et al. 1996). V oocytech prasete je aktivita MAPK ve stádiu GV velmi nízká a její pozdější zvýšení je doprovázeno GVBD (Inoue et al. 1995). Prasečí MAPK je tedy aktivována zhruba ve stejné době jako MPF. Narozdíl od MPF však zůstává aktivita MAPK v prasečích oocytech vysoká i během anafáze I a telofáze I, kdy aktivita MPF klesá (viz Obr. 5) (Sun et al. 2001).

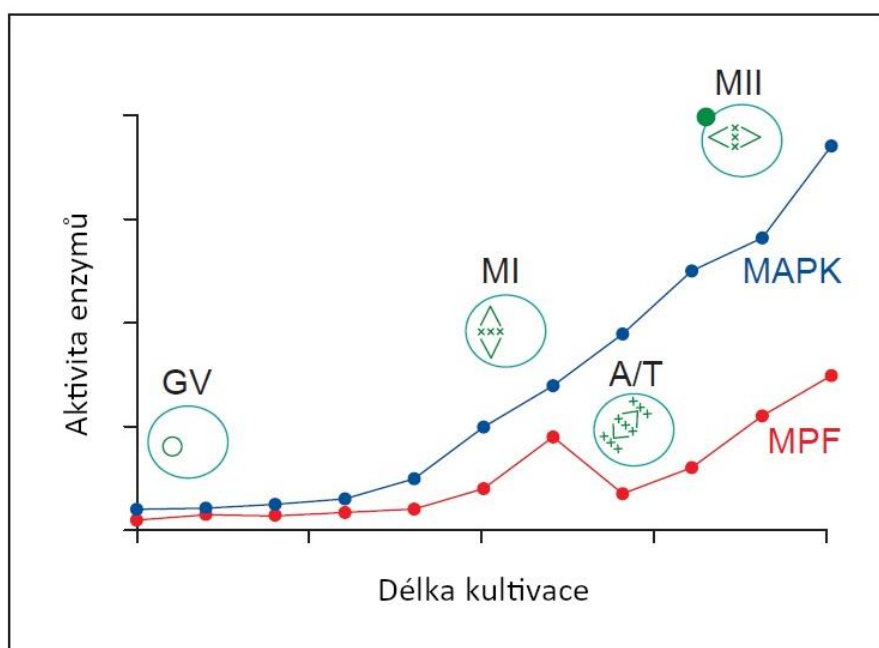
Prvním nalezeným a nejznámějším fyziologickým substrátem MAPK v oocytech je 90 kDa proteinkináza p90^{rsk} (ribosomální S6 kináza) z rodiny serin/treonin proteinkináz. ERK1/2 aktivuje p90^{rsk} *in vitro* i *in vivo* prostřednictvím fosforylace na Ser369 a Thr577 (Fan

& Sun 2004). Aktivovaná $p90^{rsk}$ inaktivuje Myt1, negativního regulátora MPF, fosforylací C terminální domény, čímž podporuje aktivaci MPF a pokračování meiózy I (Palmer et al. 1998). Aktivita MAP kinázy a $p90^{rsk}$ se zvyšuje s progresí meiózy I, kulminuje ve stádiu MI a u všech dosud studovaných druhů savců zůstává vysoká i během druhého meiotického bloku (Fan & Sun 2004).

Jednou z velmi důležitých funkcí MAPK je regulace reorganizace mikrotubulů a tvorby dělicího vřeténka, což je jeden z kontrolních bodů buněčného cyklu. Tuto regulaci zajišťuje MAPK skrze fosforylací mikrotubuly organizujících center (MTOC) na obou pólech dělicího vřeténka. Pokud je vřeténko špatně organizované, může udržovat vysokou aktivitu MPF, díky které nemůže buňka vstoupit do anafáze (Fan et al. 2002).

Dále bylo také zjištěno, že pokud je aktivita MAPK během přechodu z meiózy I do meiózy II inhibována pomocí MAPK inhibitoru U0126, nedochází k separaci chromozomů, vydělení prvního pólového tělíska ani formaci dělicího vřeténka během metafáze II (Lee et al. 2000).

Jednotlivé komponenty MAPK signální kaskády (Mos/MEK/MAPK/ $p90^{rsk}$) jsou také součástí cytotatického faktoru (CSF) (Fan et al. 2002).



Obr. 5. Aktivita faktoru podporujícího zrání (MPF) a mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) během meiotického zrání prasečích oocytu *in vitro* (upraveno podle Hunter 2000).

Cytostatický faktor (CSF – cytostatic factor)

U většiny obratlovců je zrání podruhé zastaveno v metafázi II. Tento druhý meiotický blok je zajištěn cytotatickým faktorem (CSF), který je schopen ve zralých oocytech inhibovat přechod z metafáze II do anafáze II (Masui & Markert 1971).

CSF byl poprvé popsán v oocytech obojživelníků v 70. letech 20. století. Nejedná se o specifickou molekulu, ale o komplex složený pravděpodobně z několika typů proteinkináz (Masui & Markert 1971; Masui 1974). Ačkoliv přesné složení CSF není dosud známé, za kritickou součást je považována signální kaskáda Mos/MEK/MAPK/p90^{rsk}. Sagata et al. (1989) uvádí, že mikroinjekce Mos mRNA, aktivní MAPK nebo aktivní p90^{rsk} do blastomery dvoubuněčného žabího embrya indukuje meiotický blok. Colledge et al. (1994) zase zjistili, že u myších oocytů bez protoonkogenu *c-mos*, který kóduje Mos, nedochází k zastavení meiózy v metafázi II a tyto neoplozené oocyty procházejí spontánní partenogenetickou aktivací.

Vzhledem k faktu, že MAPK signální dráha je aktivována již před metafází I, ve které k meiotickému bloku nedochází, lze předpokládat, že součástí CSF jsou ještě další, dosud neznámé faktory, které jsou s největší pravděpodobností syntetizovány v přechodu mezi MI a MII (Fan et al. 2002).

Způsob, jakým CSF udržuje druhý meiotický blok, není plně objasněn. Pravděpodobně ovšem je, že aktivita cytostatického faktoru brání ubikvitinaci cyklinu B1 anafázi podporujícím komplexem (APC), a tím i jeho degradaci a inaktivaci MPF. Dále je také možné, že ubikvitin dependentní degradace cyklinu B je dostatečně vyrovnána jeho MAPK dependentní syntézou (Fan et al. 2002; Fan & Sun 2004).

Zajímavý je také fakt, že ačkoliv CSF udržuje druhý meiotický blok, jeho inaktivace ani inaktivace MAPK není pro uvolnění tohoto bloku bezpodmínečně nutná. Za fyziologických podmínek je uvolnění oplozeného vajíčka z metafáze II zprostředkováno vápníkem, respektive jím aktivovanou kalmodulin dependentní kinázou II (CaMKII), která spouští degradaci M fázových cyklinů a segregaci sesterských chromatid (Fan et al. 2003).

Vápenaté ionty (Ca²⁺)

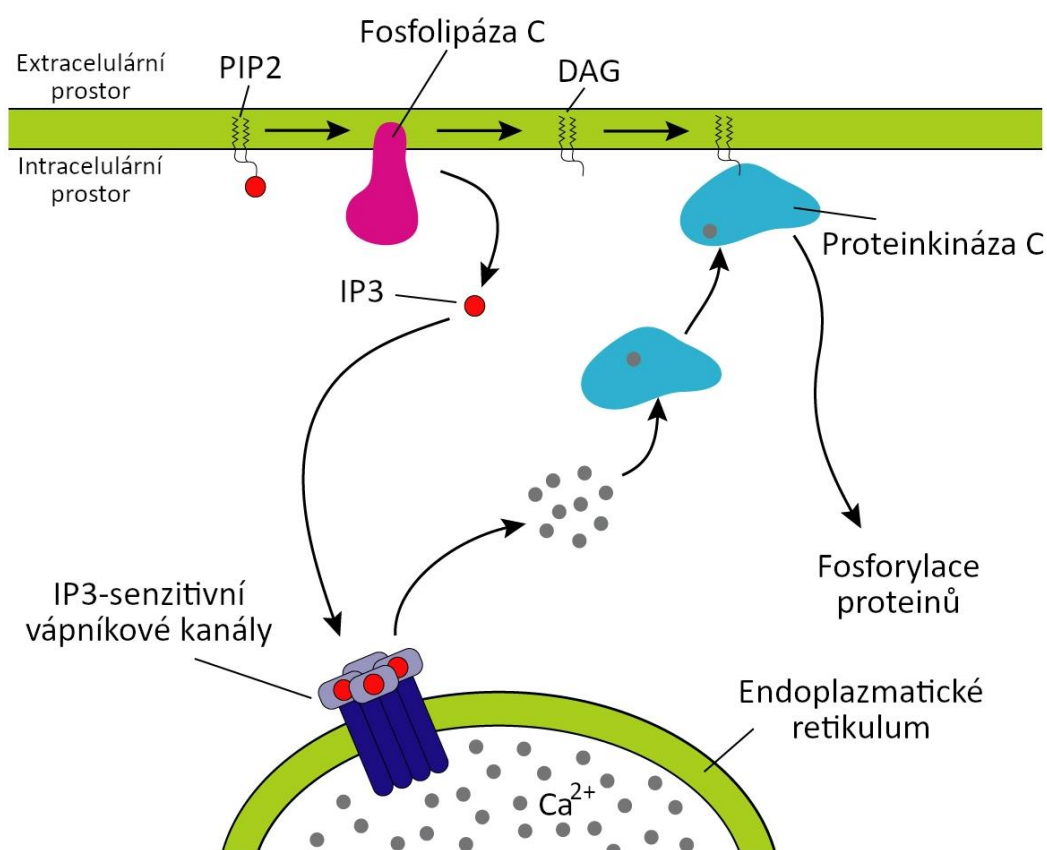
Vápenaté ionty (Ca²⁺) jsou nejuniverzálnějšími signálními posly, neboť regulují širokou škálu buněčných procesů (Berridge et al. 1998). Vápník přenáší informace reverzibilním připojením k proteinům, na jejich vazebných místech. Některé proteiny vápník jednoduše vážou a zvyšují tak jeho koncentraci v buňkách či organelách. Jiné proteiny mohou na základě připojení Ca²⁺ měnit svoji konformaci a modulovat efektorové molekuly, jako jsou enzymy nebo iontové kanály (Clapham 1995). Série proteinů a signálních molekul může následně vytvářet signální kaskádu, která přenáší signály uvnitř buněk nebo mezi nimi (Wang & Machaty 2013).

Dlouhodobé vystavení vysoké koncentraci vápníku je pro buňky škodlivé, proto je jeho koncentrace v cytoplazmě výrazně nižší než v extracelulárním prostoru (Clapham 1995). Udržování nízké hladiny vápníku v buňce je zajištěno jeho ukládáním do některých buněčných organel nebo odčerpáváním z buňky ven. Pro spuštění buněčné signalizace je pak jeho koncentrace v cytoplazmě přechodně zvýšena zpětným uvolňováním z intracelulárních depozit nebo jeho vstupem z extracelulárního prostoru pomocí iontových kanálů v plazmatické membráně (Wang & Machaty 2013).

U některých typů buněk je signalizace závislá primárně na přísunu extracelulárního vápníku. Ten se do buňky dostává skrz napětím řízené iontové kanály, k jejichž otevření je nutná depolarizace plazmatické membrány (Clapham 1995). Buňky, které nemohou pro

přechodné zvýšení koncentrace vápníku využít depolarizaci membrány, musí zajistit uvolnění dostatečného množství Ca^{2+} z intracelulárních zásob (Van Den Brink et al. 1999). Mezi takové buňky patří i samičí gamety, ve kterých je hlavním intracelulárním zdrojem vápníku endoplazmatické retikulum (ER) (Yanagimachi 1988; Wang & Machaty 2013). Uvolnění vápníku z ER zajišťuje prvotní signál, který je obvykle následován přílivem vápníku přes plazmatickou membránu. Předpokládá se, že tento extracelulární vápník je nezbytný pro nahrazení zásob vyčerpaných z ER (Rink & Hallam 1989).

Buněčná signalizace vedoucí k mobilizaci Ca^{2+} z endoplazmatického retikula je zahájena na základě extracelulárního signálu. Signální molekula se váže na receptory spojené s G-proteiny, které aktivují membránový enzym fosfolipázu C (PLC). Fosfolipáza C štěpí membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) za vzniku dvou druhých poslů, kterými jsou inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). Cukerný fosfát IP₃ difunduje cytoelem a váže se na IP₃ receptory na membráně endoplazmatického retikula. Tím dochází k otevření vápníkových kanálů a ionty Ca^{2+} jsou uvolněny do cytosolu. DAG, vzniklý z lipidového konce fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu, zůstává zanořený v plazmatické membráně, kde spolu s vápenatými ionty aktivuje proteinkinázu C, která fosforyluje řadu dalších intracelulárních proteinů (Alberts et al. 2005). Základní schéma fosfatidylinositolové signální dráhy je zobrazeno na obrázku 6.



Obr. 6. Štěpení PIP₂ fosfolipázou C, za vzniku IP₃ a DAG (upraveno podle Korte 2007).

Vápníkové ionty je tedy možné považovat za druhé posly. Jejich úkolem je aktivace některých proteinů, která probíhá většinou nepřímou, přes převodní proteiny neboli Ca^{2+} vázající

proteiny. Nejdůležitějším Ca^{2+} vázajícím proteinem je kalmodulin, který se vyskytuje v cytosolu všech eukaryotních buněk. Po navázání vápenatých iontů mění kalmodulin svou konformaci a aktivuje kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaM-kinázy). Ty následně zajišťují fosforylaci dalších proteinů (Alberts et al. 2005).

Pro regulaci meiotického zrání oocytů je důležitá zejména Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkináza II (CaMKII), která patří do rodiny serin/treonin proteinkináz (Fan et al. 2003). CaMKII se většinou vyskytuje v neaktivní formě a stejně jako jiné CaM-kinázy, vyžaduje k aktivaci vápník a kalmodulin. Díky jejich přítomnosti je CaMKII schopna autofosforylace na treoninu 286 a stává se Ca^{2+} a kalmodulin independentní (Schworer et al. 1988).

Vápník se podílí na fyziologické regulaci u oocytů od oogenese, přes zrání až po jejich oplození (Yanagimachi 1988). Signální dráha vápníku je u oocytů některých savčích druhů, včetně myší, králíků, prasat a skotu, nutná pro GVBD nebo postup do druhé metafáze meiózy (Maruska et al. 1984; Sato 1990; Kaufman & Homa 1993; Henry et al. 1997). Dále bylo zjištěno, že inhibitory CaMKII a antagonist kalmodulinu (W7) blokují vydělení prvního pólového tělíska (Su & Eppig 2002). Vápník se podílí také na aktivaci vajíčka a prolomení druhého meiotického bloku. Po oplození dochází k prudkému nárůstu koncentrace intracelulárního Ca^{2+} a degradaci cyklinu B, čímž je inaktivován MFP a vajíčko je uvolněno z metafáze II (Nixon et al. 2002). Mediátorem signálu v této reakci je pravděpodobně CaMKII (Lorca et al. 1993). V případě inhibice funkce proteinkinázy C, která je také součástí vápníkové signální kaskády, nebyly oocyty schopny vytvořit druhé pólové tělísko, ani formovat prvojádra (Gallicano et al. 1997).

Ve výsledku se tedy signální dráha vápníku podílí na mnoha krocích meiotického zrání a aktivace savčích oocytů, jako je znovuzahájení meiózy, emise pólových tělísek, uvolnění druhého meiotického bloku i tvorba prvojader (Fan et al. 2003).

Zinek

Zinek (Zn) je nezbytný pro mnoho biologických procesů, včetně správného fungování gamet (Bernhardt et al. 2011). Jeho koncentrace v savčích oocytech ovlivňuje průběh meiotického zrání a zasahuje tak do vývoje zralých pohlavních buněk. Během meiotického zrání oocytů se intracelulární hladina zinku zvyšuje nejméně o 50 % a v konečné fázi je v buňce nahromaděno více než 10^{10} atomů Zn. Tato významná akumulace nastává v pozoruhodně krátkém časovém intervalu a je důležitá pro přechod oocytu z metafáze I do metafáze II (Kim et al. 2010). Oocyty s nedostatečnou zásobou zinku nejsou po dokončení prvního meiotického dělení schopny obnovit aktivitu MPF, která je nutná pro vytvoření a udržení druhého meiotického bloku v metafázi II a jejich vývoj je často předčasně blokován již v telofázi I (Kim et al. 2010; Bernhardt et al. 2011). Kim et al. (2010) uvádí, že vlivem oscilace vápníku a následné aktivace po oplození je zinek exocytózou rychle uvolňován z vajíčka ven. K tomuto uvolňování dochází prostřednictvím zinkem naplněných transportních váčků (vezikul), kdy každý obsahuje průměrně 10^6 atomů zinku (Que et al. 2015).

Jeon et al. (2015) prováděli *in vitro* maturaci prasečích oocytů se sníženým obsahem zinku, čehož dosáhli za použití N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylendiamine (TPEN). TPEN je chelátor zinku rozpustný v tucích, který snižuje intracelulární hladinu zinku (Treves

et al. 1994). Z výsledků této skupiny autorů vyplývá, že zinek má vliv na celou řadu událostí nutných k dozrání vajíčka. V porovnání s kontrolní skupinou oocytů a skupinou ošetřenou TPEN + zinkem, které vykazovaly normální proliferaci kumulárních buněk, u skupiny oocytů ošetřených pouze TPEN proliferace kumulárních buněk nepokračovala. Stejně tak byla v tomto výzkumu potvrzena role zinku při přechodu oocyty z MI do MII fáze meiózy. Pouze 0,61 % oocytů ošetřených TPEN dosáhlo MII fáze, narozdíl od kontrolní skupiny a skupiny ošetřené TPEN + zinkem, kde fáze MII dosáhlo více než 90 % oocytů. Také vydělení pólového tělíska je pravděpodobně ovlivněno hladinou zinku, neboť u většiny TPEN ošetřených oocytů nebylo vydělení pólového tělíska pozorováno. Oocyty ošetřené TPEN dále vykazovaly abnormální uspořádání mikrofilament, která jsou součástí cytoskeletu a mají důležitou roli při dělení buněk. V neposlední řadě byl u skupiny TPEN ošetřených oocytů pozorován pokles koncentrace glutathionu (GSH), což je důležitý antioxidant, a naopak vzrostla koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidační stres. Z těchto výsledků vyplývá, že se zinek během meiotického zrání oocytů podílí také na jejich ochraně před oxidačním stresem (Jeon et al. 2015).

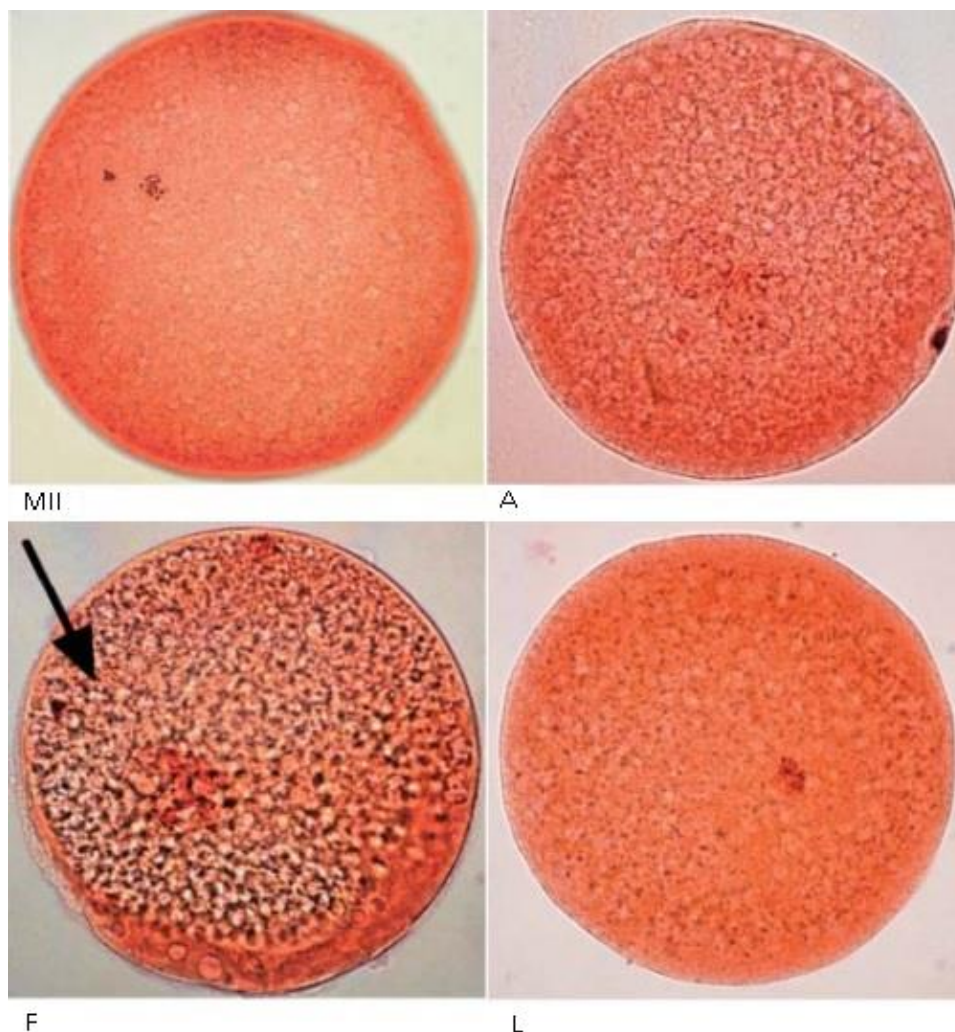
3.2 Stárnutí oocytů

Kvalita oocyty zásadně ovlivňuje vývojový potenciál embrya (Wang & Sun 2007). Vývojová kompetence zralých ovulovaných oocytů s časem klesá, proto k oplození savčích oocytů za fyziologických podmínek dochází poměrně brzy po ovulaci (Ducibella 1998). Optimální doba pro oplození je druhově specifická a u savců se pohybuje v rozsahu 6 – 24 hodin po ovulaci (Austin 1974).

Pokud během tohoto časového rozmezí nedojde k oplození, podléhají neoplozené oocyty časově závislému zhoršení kvality, což je proces nazývaný jako „post-ovulační stárnutí oocytů“. K tomuto stárnutí dochází jak *in vivo*, ve vejcovodu, tak *in vitro*, při kultivaci. Oocyty, u kterých se projeví první kvalitativní změny jsou označovány jako „stárnoucí oocyty“ (Kikuchi et al. 2000; Miao et al. 2009).

Je nutné odlišit také termín „stárnutí vaječnicků“, což je fyziologický proces spojený s ukončením reprodukčního období samice neboli počátkem klimakteria a významným poklesem plodnosti (Tatone et al. 2008). V tomto případě se tedy jedná o „pre-ovulační stárnutí oocytů“, o kterém se ale tato práce dále nezmiňuje.

Během post-ovulačního stárnutí oocytů (dále jen stárnutí oocytů) dochází k mnoha morfologickým a biochemickým změnám, které snižují kvalitu oocyty a jeho životaschopnost. Celý proces stárnutí posléze vyústí ve spontánní partenogenetickou aktivaci, fragmentaci nebo lýzu oocyty (Kikuchi et al. 2000; Gable & Woods 2001; Petrová et al. 2004). Na obrázku 7 jsou zobrazeny fotografie stárnoucích prasečích oocytů.



Obr. 7. Kategorie stárnoucích oocytů. MII – oocyt v metafázi II, A – spontánně partenogeneticky aktivovaný oocyt, F – fragmentovaný oocyt (šipka označuje apoptotický váček), L – lytický oocyt (Převzato a upraveno podle Petrová et al. 2009).

3.2.1 Morfologické a biochemické změny oocytu během stárnutí

Morfologické změny stárnoucích oocytů zahrnují změny ve struktuře plazmatické membrány a *zony pellucidy*, částečnou exocytózu kortikálních granul, přemístění prvního pólového tělíska nebo změny dělicího vřeténka (Miao et al. 2009).

Plazmatická membrána čerstvě ovulovaného oocytu je kryta vrstvou mikroklků, jejichž struktura je během stárnutí oocytu narušena a mohou zasahovat do perivitellinního prostoru. Také síť mikrofilament pod plazmatickou membránou je porušena nebo dokonce ztracena (Szollosi 1971; Longo 1974; Kim et al. 1996).

Struktura *zony pellucidy* se během stárnutí oocytu mění z granulofibrilárního retikula s póry na strukturu dlaždicovou, tvořenou granulofibrilárními agregáty. Pro tento jev se používá označení „tvrdnutí“ (hardening) *zony pellucidy* (Longo 1981; Xu et al. 1997; Miao et al. 2009).

Častým jevem u stárnoucích oocytů je také částečná exocytóza kortikálních granul. Ta jsou uložena v oocytu pod plazmatickou membránou a k jejich uvolnění dochází za fyziologických podmínek při aktivaci oocytu fertilizací. Ve stárnoucích oocytech může být

kortikální reakce spuštěna spontánně, bez oplození. Uvolněním kortikálních granul dochází k modifikacím *zony pellucidy* v souvislosti s blokem polyspermního oplození (Szollosi 1971; Ducibella et al. 1990; Yanagimachi 1994; Xu et al. 1997).

Další změny způsobené procesem stárnutí je možné zaznamenat při pozorování prvního pólového tělíska (pólocytu), jehož morfologický stav je využíván jako kritérium kvality oocytů pro použití biotechnologických metod oplození. Oocyty s neporušeným, dobře utvářeným prvním pólocytem, vykazují vyšší míru fertilizace a embrya vzniklá jejich oplozením mají vyšší vývojový potenciál (Ebner et al. 2000). Pro první pólocyt stárnoucího oocyty je typická jeho degenerace a přemístění v rámci perivitellinního prostoru (Miao et al. 2004).

Dělicí vřeténko, které je zodpovědné za správnou segregaci homologních chromozomů nebo chromatid během meiotického dělení zárodečných buněk je během stárnutí oocyty zkracováno a může být narušena jeho polarita (George et al. 1996; Wang & Sun 2006). Ve zvýšené míře dochází také k předčasné separaci chromozomů, což je silně spojeno se zvýšeným výskytem aneuploidii (Mailhes et al. 1998).

Změny postihují během stárnutí oocytů také mitochondrie, u kterých dochází ke snižování membránového potenciálu a bobtnání mitochondriální matrix (Wilding et al. 2001; Zhang et al. 2011). Často je navíc v cytoplazmě stárnoucího oocyty možné pozorovat jejich shlukování (Ma et al. 2005).

Prodlouženou kultivaci oocytů provází nárůst hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS), jako jsou superoxidové radikály (O_2^-), peroxid (H_2O_2) nebo kyselina chlorná (HClO) (Takahashi et al. 2003; Goud et al. 2005; Tatone et al. 2011). Zároveň dochází k rychlému vyčerpání intracelulárních zásob hlavního buněčného antioxidantu – glutathionu (GSH) (Boerjan & De Boer 1990). V důsledku těchto biochemických změn je stárnoucí oocyt vystaven oxidačnímu stresu (Lord & Aitken 2013).

Mezi biochemické změny způsobené stárnutím oocyty patří také pokles aktivity faktorů nutných pro udržení druhého meiotického bloku – MPF a MAPK (Xu et al. 1997; Kikuchi et al. 2000; 2002). MPF je za fyziologických podmínek po oplození deaktivován degradací cyklinu B, jinak je tomu ale během stárnutí oocytů, kdy je deaktivace MPF zajištěna inhibiční fosforylací p34^{cdc2} na Thr14 a/nebo Tyr15 kinázami Wee1 a Myt1. Výsledkem tohoto způsobu deaktivace je akumulace pre-MPF, což prokazatelně ovlivňuje post-ovulační stárnutí a vede ke spontánní partenogenetické aktivaci nebo fragmentaci oocyty (Kikuchi et al. 2000; 2002). Průdký pokles aktivity MPF pravděpodobně souvisí se zvýšenou hladinou ROS, která inhibuje funkci fosfatázy cdc25 a stimuluje funkci tyrozinových kináz, mezi které patří i kinázy Wee1 a Myt1 (Chan et al. 1986; Brisson et al. 2007).

Ovlivněna je i mitochondriální produkce adenosintrifosfátu (ATP), který je velmi významným energetickým substrátem pro další buněčné procesy. Chi et al. (1988) zaznamenali snižující se koncentraci ATP s prodlužující se délkou kultivace myších oocytů. Pokles koncentrace ATP může být opět důsledkem oxidačního stresu, jehož vlivem dochází také k poškození mitochondriální DNA (mtDNA) (Sohal & Dubey 1994; Igarashi et al. 2005).

V mitochondriích savčích oocytů dochází k expresi několika anti-apoptotických a pro-apoptotických faktorů z proteinové rodiny Bcl-2. Hlavní úlohou těchto faktorů je regulace funkce kaspáz, což jsou proteázy zajišťující apoptózu buněk skrze vnitřní signální dráhu (Exley et al. 1999). Pro-apoptotické molekuly, jako je BAX, indukují uvolňování cytochromu c, který

kaspázy aktivuje, zatímco anti-apoptické molekuly, jako je Bcl-2, tomuto uvolňování brání (Adams & Cory 1998). Cytochrom c může být z dýchacího řetězce do cytosolu uvolňován také v důsledku oxidačního stresu. Takto uvolněný cytochrom c aktivuje kaspázovou signální kaskádu (Liu et al. 2000). Vazbou cytochromu c a apoptotického proteázového aktivačního faktoru (Apaf – 1) vnikají apoptozómy, které aktivují iniciační kaspázu – pro-kaspázu 9 (Zou et al. 1999). Aktivní kaspáza 9 dále zajišťuje aktivaci pro-kaspázy 3 a 7. Funkce kaspázy 9 je poté udržována pozitivní zpětnou vazbou s aktivitou kaspázy 3. Vlivem postupného štěpení proteinů kaspázami dochází v buňce k apoptotickým změnám (Fan et al. 2005).

Zvýšená koncentrace ROS narušuje také homeostázu Ca^{2+} modulací funkce vápníkových kanálů a Ca^{2+} ATPáz endoplazmatického retikula (SERCA) stárnoucího oocyty (Takahashi et al. 2013). Po jeho oplození tak dochází k abnormální oscilaci vápníkových iontů, což může působit jako pro-apoptický stimul (Fissore et al. 2002).

3.2.2 Možnosti regulace stárnutí oocytů *in vitro*

Stárnutí oocytů je v *in vitro* podmínkách ovlivňováno celou řadou vnějších faktorů. Sledováním a modulací těchto faktorů je možné proces stárnutí do jisté míry regulovat.

Bylo prokázáno, že stárnutí oocytů *in vitro* lze přímo ovlivnit volbou komponent kultivačního média. Velký význam je přikládán pyruvátu, jehož vyšší koncentrace tento proces prokazatelně zpomalují udržováním integrity kortikálních granulí, snižováním citlivosti k aktivačním stimulům i prevencí poklesu hladiny MPF a glutationu (Liu et al. 2009).

Dalším způsobem řízení stárnutí oocytů *in vitro* je regulace teploty. Myší oocyty kultivované s přidavkem pyruvátu při teplotě 15 °C byly úspěšně oplozeny i po 42 hodinách kultivace, zatímco oocyty kultivované ve stejných podmínkách při 37 °C ztratily svůj vývojový potenciál již po 6 hodinách kultivace. Zpomalení stárnutí při nižších teplotách pravděpodobně souvisí se snížením metabolismu oocytů (Li et al. 2012).

Jistý vliv na stárnutí oocytů mají také kumulární buňky. Miao et al. (2005) zaznamenali při *in vitro* stárnutí myších oocytů obklopených kumulárními buňkami rychlejší pokles hladiny MPF a vyšší procento aktivovaných oocytů, než vykazovaly oocyty stárnoucí *in vitro* bez kumulárních buněk. Mnoho oocytů stárnoucích za přítomnosti kumulárních buněk, a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, navíc vykazovalo částečnou exocytózu kortikálních granulí, ke které docházelo při stárnutí oocytů bez kumulárních buněk jen v ojedinělých případech. Je tedy jasné, že přítomnost kumulárních buněk při *in vitro* prodloužené kultivaci urychluje proces stárnutí oocytů (Miao et al. 2005). Zhu et al. (2015) ve své studii uvádí, že akcelerace stárnutí oocytů za přítomnosti kumulárních buněk probíhá přes uvolňování ligandu FasL, což je transmembránový protein, který se váže na Fas receptory oocyty a spouští apoptózu.

Pravděpodobně nejvíce zkoumanou možností regulace stárnutí oocytů *in vitro* je udržování optimální hladiny MPF. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo při použití kofeinu, který inhibuje aktivitu kináz Wee1 a Myt1. V případě inhibice funkce těchto kináz nedochází k inhibiční fosforylaci $\text{p34}^{\text{cdc}2}$, čímž je udržena vysoká aktivita MPF a stárnutí oocytů je zpomalené. Naopak použití vanadátu, který je inhibítorem fosfatázy cdc25, vede ke snížení hladiny MPF a akceleraci procesu stárnutí oocytů (Kikuchi et al. 2000; 2002). Další možností, jak udržet vysokou hladinu MPF je použití inhibitoru proteasom MG132, který zabraňuje degradaci cyklinu B a tím deaktivaci MPF (Josefsberg et al. 2000; Zhou et al. 2003). Zároveň

ale dochází k inhibici degradace některých dalších proteinů, což je nežádoucí efekt, který vylučuje použití MG132 v technikách asistované reprodukce (Gao et al. 2005; Lord & Aitken 2013).

Proces stárnutí oocytů je možné ovlivnit také snížením oxidačního stresu. Toho je možné dosáhnout použitím některých antioxidantů, jako je například dithiothreitol (DTT). Přidáním DTT do kultivačního média bylo dosaženo vyšší míry oplození a tvorby blastocyst, zároveň došlo ke snížení počtu fragmentovaných oocytů. DTT pravděpodobně chrání stárnoucí oocyt skrze prevenci oxidace volných thiolových skupin (Tarín et al. 1998). Navzdory všem těmto výhodám je ale použití DTT spojováno s poškozením buněčné DNA, proto je aplikace této metody omezena (Oikawa et al. 2002). Lord et al. (2013) poukazují také na možnost využití melatoninu, který má silný antioxidační účinek a chrání tak oocyty před postovulačním stárnutím snižováním hladiny ROS. U oocytů ošetřených melatoninem byl zaznamenán opožděný nástup apoptózy, snížená úroveň fragmentace, prodloužení optimální doby pro oplození a zlepšená kvalita embryí (Lord et al. 2013). Melatonin navíc narozdíl například od DTT postrádá toxicitu, což z něj činí velmi zajímavého kandidáta pro využití v prostředí asistované reprodukce (Jahnke et al. 1999; Lord & Aitken 2013).

3.3 Gasotransmitery

Termínem gasotransmitery definoval Wang poprvé v roce 2002 skupinu malých plyných molekul s různou biologickou aktivitou. Tato skupina zahrnuje oxid dusnatý (NO), který byl objeven jako první z gasotransmiterů, dále oxid uhelnatý (CO) a nejmladším objeveným členem této skupiny je sulfan (H_2S). Gasotransmitery mají vysokou rozpustnost v tucích, takže volně prochází buněčnými membránami a jejich účinnost tudíž není závislá na membránových receptorech. Tyto plyné molekuly jsou syntetizovány endogenně, většinou pomocí specifických enzymů, a po uvolnění jsou rychle degradovány. Gasotransmitery ve fyziologických koncentracích působí jako přenašeči buněčného signálu a mají specifické buněčné a molekulární cíle (Wang 2002). Jejich signální dráhy se na mnoha úrovních vzájemně propojují, proto se předpokládá, že by mohly vytvářet jedinečnou síť interakcí. Celý systém mechanismů, kterými tyto plyné molekuly regulují homeostázu živých organismů, je však zatím do značné míry neznámý (Chung et al. 2008; Pae et al. 2009).

Gasotransmitery se podílejí na regulaci řady fyziologických procesů, jako je udržení cévní homeostázy, přenos nervových vzruchů v centrálním nervovém systému nebo vznik zánětlivé reakce (Pae et al. 2009). Jejich funkce byla potvrzena také při řízení procesů v reprodukční soustavě, kde byl popsán například jejich vliv na meiotické zrání a stárnutí oocytů nebo raný embryonální vývoj (Goud et al. 2005; Nevala et al. 2016; Němeček et al. 2017).

3.3.1 Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (NO) je nejlépe prostudovaný gasotransmitter, který je v organismu považován za jednu z hlavních signálních molekul. Je zapojen do regulace řady patologických a fyziologických procesů. Podílí se na funkci kardiovaskulárního systému, centrální nervové soustavy, imunitního systému i reprodukční soustavy, kde se mimo jiné zapojuje také do fyziologie oocytu (Rosselli et al. 1998; Pae et al. 2009; Nevala et al. 2016; Tiwari et al. 2017).

NO je generován enzymatickou i neenzymatickou cestou v různých typech buněk, včetně savčích folikulárních buněk (Jablonka-Shariff & Olson 1997).

Enzymatickou tvorbu NO zajišťuje syntáza oxidu dusnatého (NOS), která katalyzuje konverzi L-argininu za přítomnosti kyslíku na oxid dusnatý, L-citrulin a vodu (Kwon et al. 1990; Lamas et al. 1992). NOS existuje ve třech isoformách. Endotelová NOS (eNOS), která byla poprvé identifikována v cévním endotelu, neuronální NOS (nNOS), která byla poprvé nalezena v nervové soustavě, a indukovatelná NOS (iNOS), která byla poprvé nalezena v makrofázích (Moncada et al. 1991; Lamas et al. 1992). Přítomnost všech tří izoform NOS byla detekována také v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách (Chmelíková et al. 2010).

Neenzymatickou cestou může oxid dusnatý vznikat z dusitanu, při velmi nízkém pH, což poprvé popsali Benjamin et al. (1994) v žaludku. Nagase et al. (1997) poté popsali vznik NO při reakci peroxidu vodíku s D- nebo L-argininem.

U některých druhů savců byla popsána účast oxidu dusnatého na regulaci zrání oocytů. V popisu jeho způsobu účinku se ale dosud provedené studie značně rozcházejí. Některé studie uvádějí, že do ukončení prvního (v profázi I) i druhého (v metafázi II) meiotického bloku a znovuzahájení meiózy se zapojuje zvýšená hladina NO (Tao et al. 2004; Chmelíková et al. 2009; Premkumar & Chaube 2015). Jiné studie naopak uvádějí, že ke znovuzahájení meiózy je v obou případech nutné přechodné snížení hladiny oxidu dusnatého (Goud et al. 2005; Chmelíková et al. 2010; Schwarz et al. 2014; Pandey & Chaube 2015). Bu et al. (2003) popsali také duální účinek NO (stimulaci či inhibici) na GVBD myších oocytů, kultivovaných *in vitro*, v závislosti na jeho koncentraci. Rozdílné účinky NO na meiotické zrání savčích oocytů mohou být pravděpodobně způsobeny druhovými rozdíly nebo stádiem vývoje folikulů (Tiwari et al. 2017).

Některé studie, které se zabývaly vlivem oxidu dusnatého na meiotické zrání oocytů, naznačují, že NO stimuluje funkci guanylátcyklázy, a tím zvyšuje hladinu cGMP, která je nutná pro udržení prvního meiotického bloku. Snížení koncentrace NO by tak mohlo vést ke znovuzahájení meiózy skrze pokles hladiny cGMP, aktivaci PDE3A, snížení hladiny cAMP, inaktivaci PKA a aktivaci Cdc25 a MPF (Nakamura et al. 2002; Tiwari et al. 2017).

Oxid dusnatý má velmi významnou roli také v prevenci stárnutí oocytů. Jako atypický antioxidant chrání oocyty před působením cytotoxických volných radikálů, čímž oddaluje stárnutí oocytů, udržuje jejich kvalitu a podílí se na prevenci vzniku chromozomálních abnormalit. Jeho druhým mechanismem účinku je již zmiňovaná aktivace funkce guanylátcyklázy a zvýšení hladiny cGMP, který minimalizuje poškození *zony pellucidy* během stárnutí oocytu (Goud et al. 2005; Prasad & Chaube 2016).

3.3.2 Oxid uhelnatý (CO)

Oxid uhelnatý patří mezi faktory zapojené do modulace apoptotické dráhy různých typů somatických buněk (Brouard et al. 2000; Zhang et al. 2003; Rosa et al. 2008). CO může být endogenně produkován enzymem hemoxygenázou (HO) nebo exogenně dodáván například molekulami uvolňujícími CO (CO-RMs) (Motterlini et al. 2003).

Hemoxygenáza katalyzuje oxidační degradaci hemu za vzniku Fe^{2+} , biliverdinu a CO (Tenhunen et al. 1968; Tenhunen et al. 1969). Existuje ve dvou aktivních izoformách HO –

HO-1 a HO-2. HO-1 je indukovatelná izoforma hemoxygenázy, která je aktivována různými druhy stresu (například oxidačním stresem, teplotním stresem nebo hypoxií) (Ryter & Choi 2016). Jedná se o protein s molekulární hmotností zhruba 32 kDa, který je navázaný na membránu endoplazmatického retikula (Yoshida & Kikuchi 1978; Gottlieb et al. 2012). Konstitutivní izoforma HO-2 je zodpovědná za bazální aktivitu HO, čímž zajišťuje stabilní produkci CO a stálou ochranu buněk před poškozením (například oxidačním stresem) (Turkseven et al. 2007). HO-2 je také vázána na membránu endoplazmatického retikula, ale může být lokalizována i na vnější jaderné membráně a endozomech (Ma et al. 2004; West & Oates 2008).

Oxid uhelnatý se váže na struktury obsahující kovy, z nichž nejznámější je hem (Boczkowski et al. 2006). Molekula hemu obsahuje velké množství proteinů, jako například guanylátcyklázu (GC) nebo iNOS, proto má CO širokou škálu potencionálních cílů (Tsiftoglou et al. 2006). Guanylátcykláza patří mezi běžné cíle CO a NO, jejichž vazba zvyšuje tvorbu cGMP. Zvýšená koncentrace cGMP poté ovlivňuje další signální dráhy (Stone & Marletta 1994). Oxid uhelnatý je ale výrazně slabším aktivátorem GC než oxid dusnatý, proto je považován spíše za regulátora signální dráhy NO/cGMP (Ingi et al. 1996). Přes tuto signální dráhu by také mohl zasahovat do průběhu meiotického zrání oocytů.

Pravděpodobnost zapojení oxidu uhelnatého do regulace meiotického zrání oocytů podporuje také fakt, že je schopen prostřednictvím různých proteinů nebo signálních drah aktivovat MAPK, která se podílí na udržování druhého meiotické bloku (Brouard et al. 2000; Otterbein et al. 2000; Fan et al. 2002).

Němeček et al. (2017) prokázali přítomnost obou izoform HO ve zralých a stárnoucích prasečích oocytech. Zjistili také, že během *in vitro* stárnutí oocytů se exprese obou izoform HO zvyšuje, čímž pravděpodobně dochází ke snižování hladiny ROS, která je považována za hlavní faktor odpovědný za stárnutí oocytů (Lord & Aitken 2013). Dodání molekul uvolňujících CO (CORMs) potlačuje negativní známky stárnutí prasečích oocytů a inhibuje apoptózu redukcí aktivity kaspázy 3 (CAS-3), což je proteáza, která je jedním z nejdůležitějších efektorů programované buněčné smrti (Cohen 1997; Němeček et al. 2017).

3.3.3 Sulfan (H₂S)

Sulfan je bezbarvý plyn, charakteristický svým silným zápachem po zkažených vejcích. Po celá desetiletí byl znám pouze jako toxická látka znečišťující životní prostředí (Łowicka & Bełtowski 2007). Hlavním mechanismem jeho toxicity je inhibice funkce mitochondriální cytochrom c oxidázy, která je velmi významným článkem dýchacího řetězce (Reiffenstein et al. 1992). Později bylo zjištěno, že je produkován celou řadou savčích tkání, včetně mozku, ilea, ledvin a kardiovaskulární soustavy, a má mnoho fyziologických účinků (Abe & Kimura 1996; Doeller et al. 2005).

Fyzikální a chemické vlastnosti sulfanu

Sulfan je slabou kyselinou, která za fyziologicky relevantních podmínek tj. ve vodných roztocích při pH 7,4 disociuje na kationt H⁺ a hydrosulfidový aniont HS⁻, který může za vyššího pH dále disociovat na H⁺ a sulfidový aniont S²⁻. K této disociaci dochází pouze u dvou třetin

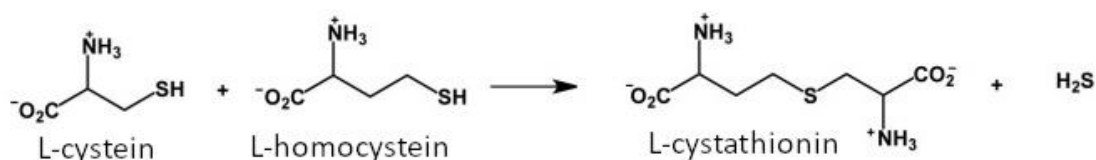
H₂S, jedna třetina sulfanu tak zůstává i ve vodném roztoku nedisociována (Łowicka & Bełtowski 2007; Li & Lancaster 2013).

Podobně jako oxid dusnatý a oxid uhelnatý je sulfan lipofilní a jeho rozpustnost v lipofilních rozpouštědlech je ještě pětkrát vyšší než ve vodě, díky čemuž volně prostupuje plazmatickými membránami buněk (Wang 2002). Ty jsou pro něj ale díky částečné disociaci relativně méně propustné než pro oba další gasotransmitery. V séru a tkáních je H₂S možné detekovat zhruba od koncentrace 50 μM. Jeho fyziologická hladina v mozku je ovšem až trojnásobně vyšší (50 – 160 μM) a blíží se toxické koncentraci (Abe & Kimura 1996; Hosoki et al. 1997; Łowicka & Bełtowski 2007).

Syntéza a metabolismus sulfanu

Za většinu endogenní produkce H₂S v savčích tkáních jsou zodpovědné dva pyridoxal-5-fosfát (vitamín B₆) dependentní enzymy – cystathionin β-syntáza (CBS) a cystathionin γ-lyáza (CSE) (Stipanuk & Beck 1982; Abe & Kimura 1996; Hosoki et al. 1997; Zhao et al. 2001). Hlavním substrátem pro tyto enzymy je L-cystein, neesenční aminokyselina obsahující síru, která je syntetizovaná z L-methioninu prostřednictvím takzvané „transulfurační cesty“ (Łowicka & Bełtowski 2007).

Cystathionin β-syntáza (CBS) se vyskytuje primárně jako homotetramer s podjednotkovou molekulovou hmotností 63 kDa. Každá podjednotka váže kofaktory - pyridoxal-5-fosfát (PLP), S-adenosyl methionin (SAM) a hem (Miles & Kraus 2004; Banerjee & Zou 2005). Hlavní mechanismus produkce H₂S cystathionin β-syntázou spočívá v kondenzaci homocysteinu s cysteinem za vzniku cystathioninu, jak je znázorněno na obrázku 8 (Chen et al. 2004). Expres CBS byla zaznamenána například v játrech, ledvinách, mozku, ileu, děloze, placentě, oocytech nebo pankreatických ostrůvcích (Stipanuk & Beck 1982; Abe & Kimura 1996; Patel et al. 2009; Nevorál et al. 2015)

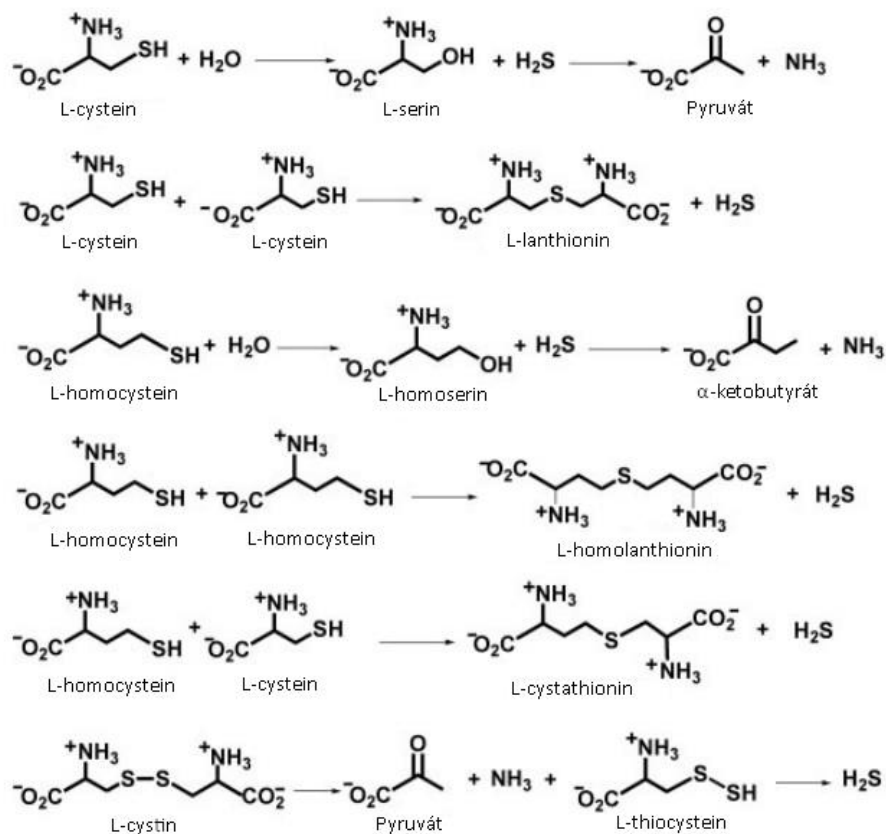


Obr. 8. Reakce produkující H₂S katalyzovaná CBS (upraveno podle Yadav & Banerjee 2012).

Cystathionin γ-lyáza (CSE) produkuje H₂S hned několika typy reakcí, a to z cysteinu nebo homocysteinu (viz Obr. 9). Za normálních podmínek je přibližně 70 % H₂S produkováno z cysteinu a pouze zbývajících 30 % z homocysteinu. Avšak za podmínek s vyššími koncentracemi homocysteinu, jako je například homocysteinémie, se preferovaným zdrojem pro produkci H₂S stává právě homocystein (Chiku et al. 2009). CSE je exprimována například v játrech, ledvinách, hrudní aortě, ileu, portální žíle, děloze, oocytech, mozku, ostrůvcích pankreatu nebo placentě (Hosoki et al. 1997; Kaneko et al. 2006; Vitvitsky et al. 2006; Diwakar & Ravindranath 2007; Patel et al. 2009; Nevorál et al. 2015). Funkce cystathionin γ-lyázy může být do jisté míry regulována pomocí NO, který zvyšuje její expresi

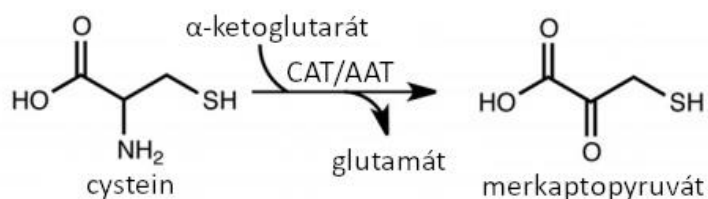
a enzymatickou aktivitu (Zhao et al. 2001). Dalšími aktivátory CSE jsou společně také vápník a kalmodulin (Yang et al. 2008).

Cystathionin β -syntáza (CBS) a cystathionin γ -lyáza (CSE) jsou tedy exprimovány v celé řadě savčích tkání. Zatímco CBS je převládajícím zdrojem H_2S v centrální nervové soustavě, CSE je hlavním enzymem produkujícím H_2S v kardiovaskulárním systému. V některých tkáních, jako jsou játra nebo ledviny, se pak na produkci H_2S podílí oba enzymy (Łowicka & Bełtowski 2007).



Obr. 9. Reakce produkující H_2S katalyzovaná CSE (upraveno podle Chiku et al. 2009).

Dalším enzymem, který se podílí na produkci sulfanu v tkáních je 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (3MST), jejímž substrátem je 3-merkaptopyruvát (3MP). Ten vzniká při transaminační reakci mezi cysteinem a α -ketoglutarátem, která je katalyzována jedním ze dvou identických enzymů – aspartát aminotransferázou (AAT) nebo cystein aminotransferázou (CAT) (Ubuka et al. 1978; Shibuya et al. 2009b). Tato reakce je znázorněna na obrázku 10. 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza byla nalezena v játrech, ledvinách, srdci, plicích, brzlíku, varlatech, hrudní aortě a mozku (Nagahara & Nishino 1996; Nagahara et al. 1998; Shibuya et al. 2009a, b).



Obr. 9. Transaminační reakce mezi cysteinem a α -ketoglutarátem (upraveno podle Yadav et al. 2013).

Produkovaný sulfan reguluje aktivitu všech H_2S produkujících enzymů negativní zpětnou vazbou (Wang 2002). Za fyziologických podmínek se sulfan v organismu neakumuluje, proto existuje několik mechanismů, které zajišťují jeho odbourávání. V mitochondriích může být oxidován na thiosíran, který je dále převeden na sulfid a sulfát (Łowicka & Bełtowski 2007). Konverze thiosíranu na sulfid je katalyzována thiosíran:kyanid sulfurtransferázou (TST; rodanáázou), která přenáší síru z thiosíranu na kyanid nebo jiné akceptory (Picton et al. 2002). Sulfid dále oxiduje na sulfát pomocí sulfioxidázy (Łowicka & Bełtowski 2007). Druhou možností metabolismu H_2S je jeho methylace thiol S-methyltransferázou (TSMT) v cytosolu na methylmerkaptan a dimethylsulfid (Furne et al. 2001). Poslední možností degradace H_2S v organismu je jeho vazba na methemoglobin za vzniku sulfhemoglobinu (Łowicka & Bełtowski 2007).

Fyziologické účinky sulfanu na organismus

Fyziologické účinky sulfanu byly poprvé popsány v nervové soustavě, kde je jeho produkce zajištěna zejména cystathionin β -syntázou. Hlavním cílem sulfanu v nervové soustavě jsou glutamátové NMDA receptory neuronů, které regulují synaptickou plasticitu. Při fyziologických koncentracích, za současné slabé tetanické stimulace, vyvolává H_2S v hipokampu dlouhodobou potenciaci a podílí se tak na procesu učení a paměti (Abe & Kimura 1996). Kromě přímého působení na neurony ovlivňuje H_2S také vápníkovou signalizaci astrocytů aktivací jejich Ca^{2+} kanálů, čímž zprostředkovává signalizaci mezi neurony a gliovými buňkami (Nagai et al. 2004). Účinkem sulfanu je v nervové soustavě také zvyšována produkce antioxidantu glutathionu, který chrání neurony před oxidačním stresem (Kimura & Kimura 2004).

Produkce sulfanu byla dále prokázána v hrudní aortě, portální žíle a ileu. V kardiovaskulární soustavě je sulfan produkován výhradně cystathionin γ -lyázou. Jeho vazodilatační účinky byly poprvé prokázány v roce 1997 (Hosoki et al. 1997). Mechanismem působení sulfanu na cévní soustavu je otevření ATP-senzitivních K^+ -kanálů hladkosvalových buněk cév a hyperpolarizace jejich membrán (Zhao et al. 2001). Zároveň bylo zjištěno, že sulfan výrazně zlepšuje vazodilatační účinky oxidu dusnatého (Hosoki et al. 1997).

Další role sulfanu byly popsány také v gastrointestinálním traktu (Teague et al. 2002), plicích (Wei et al. 2008) nebo při regulaci zánětu (Zanardo et al. 2006; Gemici & Wallace 2015).

Jako signální molekula zasahuje sulfan také do regulace funkce samičí i samčí reprodukční soustavy. U samců má sulfan pozitivní vliv na erekci penisu (Srilatha et al. 2007;

d'Emmanuele di Villa Bianca et al. 2009) a přítomnost CBS a CSE byla prokázána také v buňkách varlat (Sugiura et al. 2005). V samičí reprodukční soustavě byla produkce sulfanu enzymy CBS a CSE detekována v děloze, placentě a zárodečných obalech (Patel et al. 2009). Sulfan zde zajišťuje správné prokrvení placenty (Wang et al. 2013) a tlumí kontrakce děložní svaloviny (Sidhu et al. 2001; Hu et al. 2011). Přítomnost všech tří H_2S produkujících enzymů, CBS, CSE a 3MST, byla prokázána také v prasečích oocytech a přilehlých kumulárních buňkách (Nevoral et al. 2015). Sulfan, který je zde produkován, ovlivňuje folikulogenezi, meiotické zrání a kumulární expanzi (Liang et al. 2006; Nevoral et al. 2014). Zároveň nebyly prokázány žádné negativní účinky sulfanu na vývojovou kompetenci oocytů (Nevoral et al. 2014). Endogenní produkce H_2S byla zaznamenána také během stárnutí prasečích oocytů *in vitro*. Kultivací stárnoucích oocytů s inhibitory H_2S produkujících enzymů byl zvýšen výskyt fragmentovaných nebo partenogeneticky aktivovaných oocytů v prvních 24 hodinách stárnutí *in vitro*. Naopak kultivací stárnoucích oocytů s donorem sulfanu došlo ke kompletnímu potlačení fragmentace. Sulfan je tedy jednoznačně zapojen také do ochrany oocytů před procesem stárnutí a pozitivně ovlivňuje následný embryonální vývoj (Krejčová et al. 2015). Mezi další fyziologické účinky endogenně uvolňovaného sulfanu v reprodukční soustavě patří modifikace kinázové aktivity MPF a MAPK (Nevoral et al. 2014; Krejčová et al. 2015; Nevoral et al. 2015).

3.4 Donory sulfanu

Mezi nejběžněji využívané donory sulfanu patří zejména hydrogensulfid sodný (NaHS) a sulfid sodný (Na_2S), které jsou označovány za tzv. rychlé nebo okamžité donory. Toto označení vyplývá z faktu, že se jedná o soli, které ve vodném roztoku rychle disociují a dochází tak k jednorázovému okamžitému uvolnění sulfanu. Výhodou tohoto typu donorů je zejména jejich vysoká dostupnost a poměrně nízká cena (Li et al. 2008; Song et al. 2014). Nevýhodou je ovšem předpoklad, že uvolňování endogenního H_2S v buňkách má spíše oscilační nebo pulzní charakter, jak je pro signalizaci u většiny živých organismů typické (Li & Goldbeter 1992). Rychlé donory sulfanu, jako je NaHS nebo Na_2S proto nemusí dostatečně kopírovat přirozený způsob signalizace endogenně produkovaného sulfanu. (Li et al. 2008; Roger et al. 2013).

Řešením tohoto problému by mohly být donory s pomalým uvolňování H_2S . Kromě přirozeně se vyskytujících pomalých donorů, jako jsou dialylsulfidy v česneku, jsou nejběžnější molekuly využívané ve výzkumu založeny na struktuře dithiolethionu nebo odvozeny od Lawessonova činidla (Benavides et al. 2007; Roger et al. 2013). Mezi takové donory patří i morfolin-4-ium-4-methoxyfenyl (morfolino) fosfinodithioát (GYY4137), který byl původně popsán již před více než 60 lety jako urychlovač vulkanizace kaučuku. Ve vodném roztoku při teplotě 37 °C a pH 7,4 je uvolňování H_2S z GYY4137 pomalým procesem, během kterého získáme z počáteční koncentrace 1 mmol/l za 25 minut 4-5% koncentraci H_2S . Uvolňování H_2S z GYY4137 je tedy v *in vitro* podmínkách závislé jak na teplotě, tak na pH, s omezeným uvolňováním při nižších teplotách (4° C) a naopak zvýšeným uvolňováním v kyselých podmínkách (pH 3,0) (Li et al. 2008).

4 Metodika

4.1 Získ a výběr oocytů

Oocyty byly získávány z vaječníků prasnic odporažených na jatkách v různém stádiu pohlavního cyklu. Vaječníky byly do laboratoře převáženy při teplotě 39 °C. Oocyty spolu s folikulární tekutinou byly získávány z folikulů o velikosti 2-5 mm aspirací za pomoci injekční jehly 20G. Pod binokulární lupou byly oocyty vybírány z folikulární tekutiny a pomocí skleněné kapiláry přeneseny do kultivačního média. Pro experimenty byly využity pouze oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktní vrstvou folikulárních buněk.

4.2 Kultivace zrajících oocytů

Získané oocyty byly kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Médium navíc obsahovalo hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7 % roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml) a 10 % fetálního bovinního séra (GibcoBRL, Life Technologies, Germany). Kultivace probíhala ve sterilních 4-důlkových miskách při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem po dobu 48 hodin do stádia metafáze druhého meiotického dělení. Experimentální skupiny oocytů byly kultivovány za přítomnosti jednoho z donorů sulfanu (GY4137 a Na₂S) v jejich efektivních koncentracích (viz Tab. 1).

Tab. 1. Efektivní koncentrace donorů sulfanu

GY4137	15 μM
Na₂S * 9 H₂O	300 μM

Efektivní koncentrace těchto donorů byly převzaty z dostupné vědecké literatury a předem testovány v kultivačních podmínkách laboratoře. Data nejsou součástí této diplomové práce. Oba použité donory jsou rozpustné v DMSO, konkrétně byly donory rozpuštěny v 2% DMSO. Byla tedy vždy kultivována i skupina oocytů v médiu s přídatkem čistého DMSO v odpovídající koncentraci, která se do média přidávala s donory. Skupina byla negativní kontrolou účinku samotného DMSO.

4.3 Kultivace stárnoucích oocytů

Po dosažení metafáze II (MII) byly oocyty za pomoci úzké skleněné kapiláry zbaveny kumulárních buněk a část oocytů byla dále kultivována v čistém modifikovaném kultivačním médiu M199 (bez přídatku donorů sulfanu či DMSO). Kultivace opět probíhala ve sterilních 4-důlkových miskách při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem po dobu dalších 24 hodin.

4.4 Postup lokalizace vybraných apoptotických markerů

Po ukončení kultivace byla z oocytů působením kyselého Tyrodova roztoku odstraněna *zona pellucida*. Oocyty byly poté opláchnuty v 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin) v PBS a fixovány v 2,5 % (w/v) paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě 39 °C. Fixace probíhala po dobu 60 minut s tím, že byl fixační roztok po 30 minutách vyměněn. Takto fixované oocyty byly vystaveny působení 0,5 % (v/v) Tritonu X-100 v PBS po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. Účelem tohoto kroku byla permeabilizace plazmatické membrány oocytu. Po 2 hodinách byly oocyty krátce opláchnuty v 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS. Následovala inkubace s primární protilátkou rabbit anti-BAX (Proteintech, USA), ředěnou v poměru 1:500, nebo rabbit anti-Bcl-2 (ThermoFischer, USA), ředěnou v poměru 1:50. Inkubace probíhala přes noc ve vlhkém prostředí při teplotě 4 °C. Nenavázané protilátky byly posléze odmyty třemi oplachy po 10 minutách v roztoku 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS. Dále byly oocyty inkubovány po dobu 1 hodiny bez přístupu světla se sekundární protilátkou anti-rabbit IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC) (Abcam, USA), ředěnou v poměru 1:100. Po ukončení inkubace byly oocyty znovu třikrát opláchnuty v roztoku 0,1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS. Ke každému experimentu byla provedena i negativní kontrola, kdy byly oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou, k vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky v oocytu.

Oocyty byly dále montovány na podložní sklo do Vectashieldu s fluorescenčním barvivem DAPI za účelem vizualizace chromatinu. Takto připravené preparáty byly snímány pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu Zeiss. Pro kvantitativní zhodnocení relativní intenzity signálu byl využit program analýzy obrazu NIS Elements. Do hodnocení byly zahrnuty pouze experimenty, kde nebyl naměřen signál u negativní kontroly.

4.5 Statistické hodnocení

Získaná data byla podrobena statistické analýze. K vyhodnocení všech výsledků byl použit program STATISTICA 12 a metoda analýzy rozptylu ANOVA. Hodnota P menší než hladina významnosti ($\alpha = 0,05$) byla považována za statisticky významnou.

4.6 Experimentální schéma

Experiment 1: Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

Tento experiment byl zaměřen na sledování lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktoru BAX v dozrálých prasečích oocytech. K hodnocení byly využity oocyty, které byly kultivovány po dobu 48 hodin do stádia MII. Kultivace probíhala dle skupiny buď v čistém modifikovaném kultivačním médiu M199 (kontrolní skupina) nebo v modifikovaném kultivačním médiu M199 obohaceném o DMSO (kontrola účinku rozpouštědla donorů) či jeden z donorů sulfanu (GYY4137 nebo Na₂S) v jejich efektivních koncentracích (viz Tab.1.) (experimentální skupiny). Lokalizace anti-apoptotického faktoru

Bcl-2 a pro-apoptického faktoru BAX byla provedena imunocytochemickou metodou (viz 4.4. Postup lokalizace vybraných apoptotických markerů). Byla hodnocena relativní intenzita signálu daných proteinů vztažená ke kontrolní skupině oocytů (brána jako 100 %).

Experiment 2: Lokalizace vybraných apoptotických markerů v časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

V tomto experimentu byly anti-apoptický faktor Bcl-2 a pro-apoptický faktor BAX lokalizovány v časně stárnoucích prasečích oocytech. Hodnocené oocyty byly nejprve kultivovány po dobu 48 hodin do stádia MII. Kultivace probíhala dle skupiny buď v čistém modifikovaném kultivačním médiu M199 (kontrolní skupina) nebo v modifikovaném kultivačním médiu M199 obohaceném o DMSO (kontrola účinku rozpouštědla donorů) či jeden z donorů sulfanu (GYY4137 nebo Na₂S) v jejich efektivních koncentracích (viz Tab.1.) (experimentální skupiny). Po ukončení meiotického zrání byly hodnocené oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány v čistém modifikovaném kultivačním médiu M199 (bez přídavku DMSO či donorů sulfanu) po dobu 1 dne (24 hodin). Lokalizace obou apoptotických markerů byla provedena imunocytochemickou metodou (viz 4.4. Postup lokalizace vybraných apoptotických markerů). Byla hodnocena relativní intenzita signálu daných proteinů vztažená ke kontrolní skupině oocytů (brána jako 100 %).

5 Výsledky

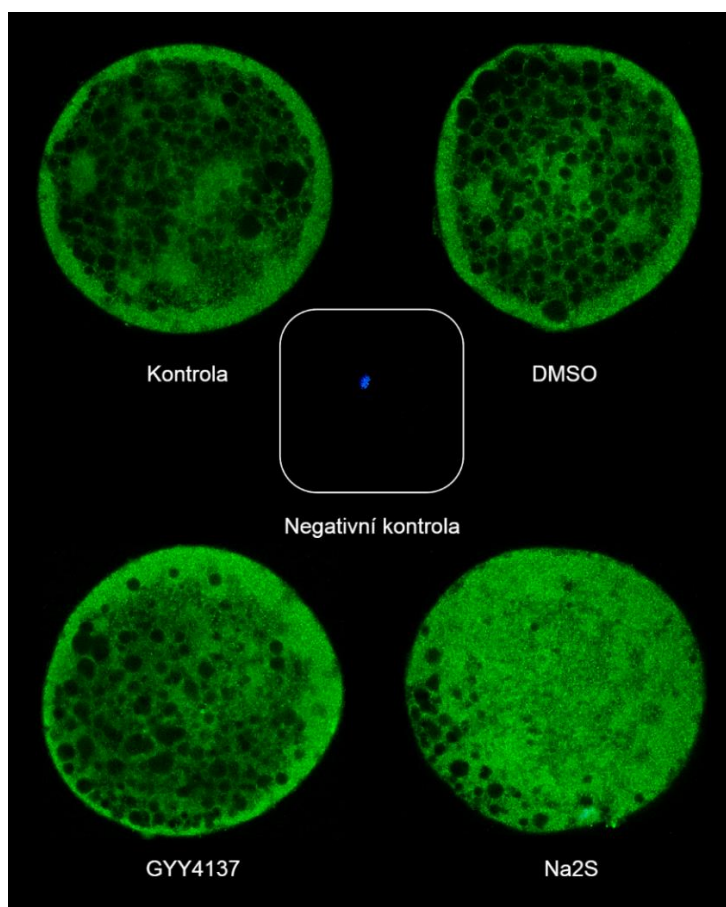
5.1 Lokalizace vybraných apoptotických markerů v dozrálých prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

Cílem tohoto experimentu bylo lokalizovat a porovnat relativní intenzitu signálu anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktor BAX v dozrálých prasečích oocytech, které byly během zrání kultivovány s donory sulfanu (GY4137 nebo Na₂S), s DMSO nebo v čistém modifikovaném médiu M199 (kontrolní skupina).

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde byly oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou anti-rabbit konjugovanou s FITC. Tato kontrola sloužila k vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky v oocytech.

Lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 v dozrálých prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

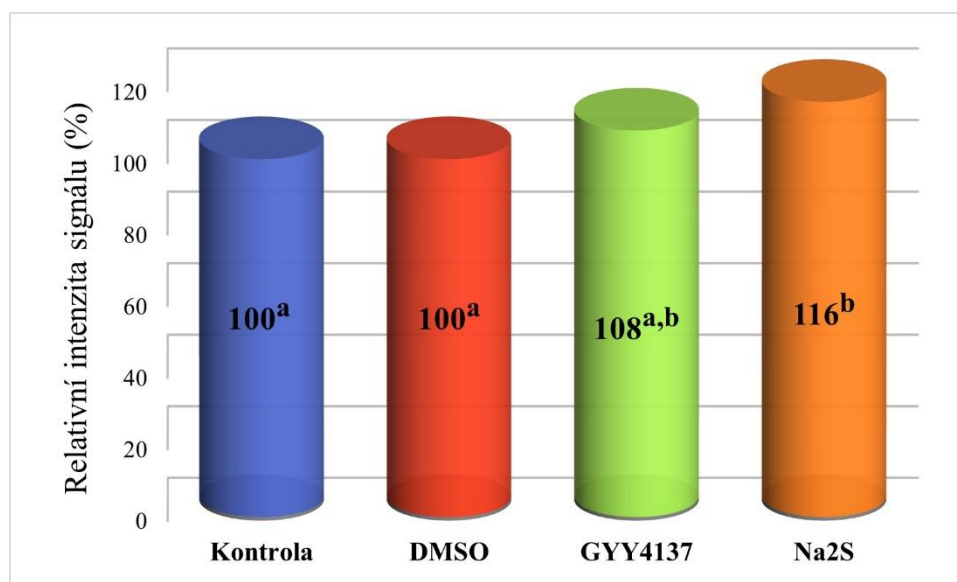
Přítomnost anti-apoptotického faktoru Bcl-2 byla detekována ve všech sledovaných skupinách oocytů kultivovaných do stádia MII.



Obr. 11. Lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 v jednotlivých skupinách dozrálých prasečích oocytů. Kontrola – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu. DMSO – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu

s přidavkem čistého DMSO. GYY4137 – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu obohaceném o donor sulfanu GYY4137 v koncentraci 15 μM . Na₂S – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu obohaceném o donor sulfanu Na₂S ve formě nonahydrátu v koncentraci 300 μM (Bcl-2 značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – DAPI).

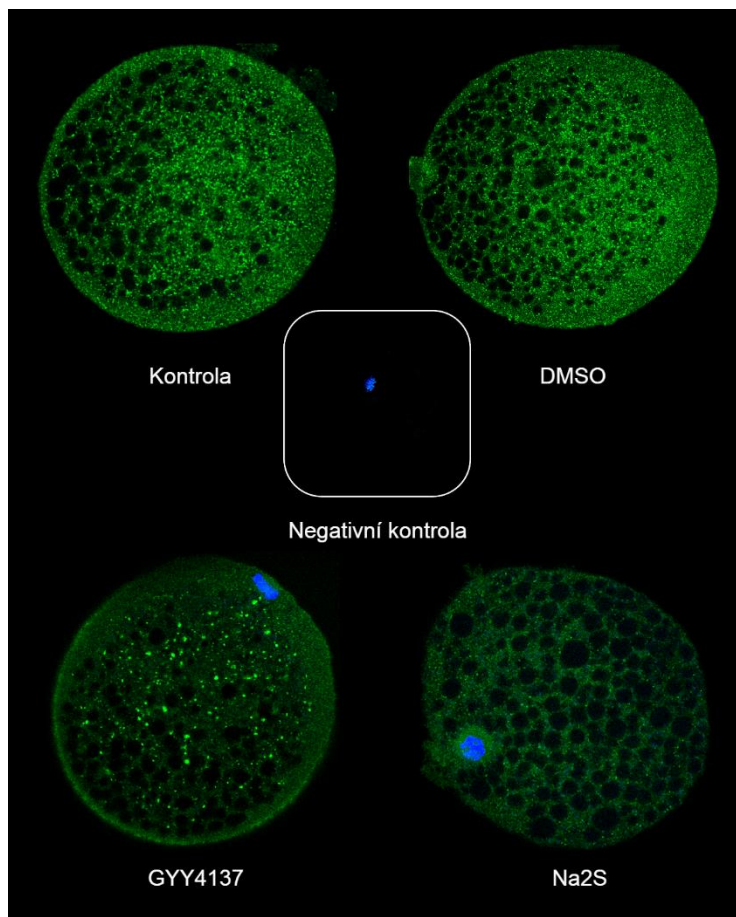
V tomto experimentu byl pozorován nárůst relativní intenzity signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2 u obou skupin oocytů zrajících za přítomnosti donorů sulfanu. Statisticky významný rozdíl v relativní intenzitě signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2 byl pozorován pouze mezi kontrolní skupinou oocytů a skupinou oocytů kultivovanou v médiu s donorem sulfanu Na₂S * 9 H₂O. Ostatní skupiny dozrálých oocytů nevykazovaly v porovnání s kontrolní skupinou oocytů statisticky významné rozdíly, které nebyly nalezeny ani při porovnání obou skupin oocytů ovlivněných donory sulfanu. Výsledky shrnuje graf 1.



Graf 1. Relativní intenzita signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2 v jednotlivých skupinách dozrálých oocytů, vztažená k intenzitě signálu tohoto faktoru v kontrolní skupině, kultivované po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu. Rozdílnými ^{a,b,c} superskripty jsou znázorněny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

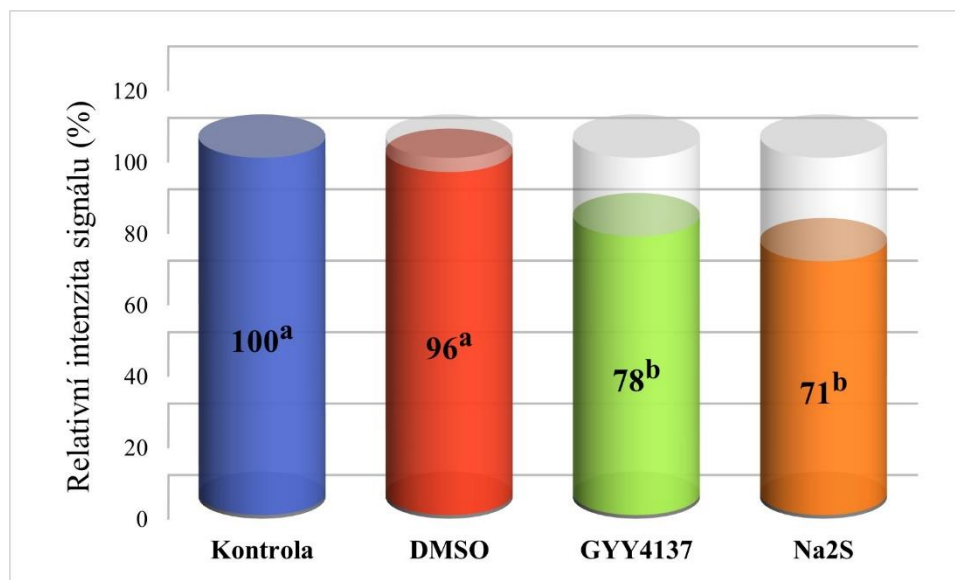
Lokalizace pro-apoptického faktoru BAX v dozrálých prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

Pro-apoptický faktor BAX byl lokalizován ve všech skupinách dozrálých oocytů.



Obr. 12. Lokalizace pro-apoptického faktoru BAX v jednotlivých skupinách dozrálých prasečích oocytů. Kontrola – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu. DMSO – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu s přídavkem čistého DMSO. GYY4137 – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu obohaceném o donor sulfanu GYY4137 v koncentraci 15 μM . Na_2S – skupina oocytů kultivovaná po dobu 48 hodin v médiu obohaceném o donor sulfanu Na_2S ve formě nonahydrátu v koncentraci 300 μM (BAX značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – DAPI).

Skupiny dozrálých oocytů, které byly během zrání kultivovány s donory sulfanu GYY4137 a $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ vykazovaly oproti kontrolní skupině oocytů a skupině oocytů kultivované v médiu s přídavkem DMSO statisticky významně nižší relativní intenzitu signálu pro-apoptického faktoru BAX. Při porovnání relativní intenzity signálu tohoto faktoru mezi skupinami oocytů, které byly ovlivněny donory sulfanu nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. Výsledky shrnuje graf 2.



Graf 2. Relativní intenzita signálu pro-apoptického faktoru BAX v jednotlivých skupinách dozrálých oocytů, vztažená k intenzitě signálu tohoto faktoru v kontrolní skupině, kultivované po dobu 48 hodin v čistém kultivačním médiu. Rozdílnými ^{a,b,c} superskripty jsou znázorněny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

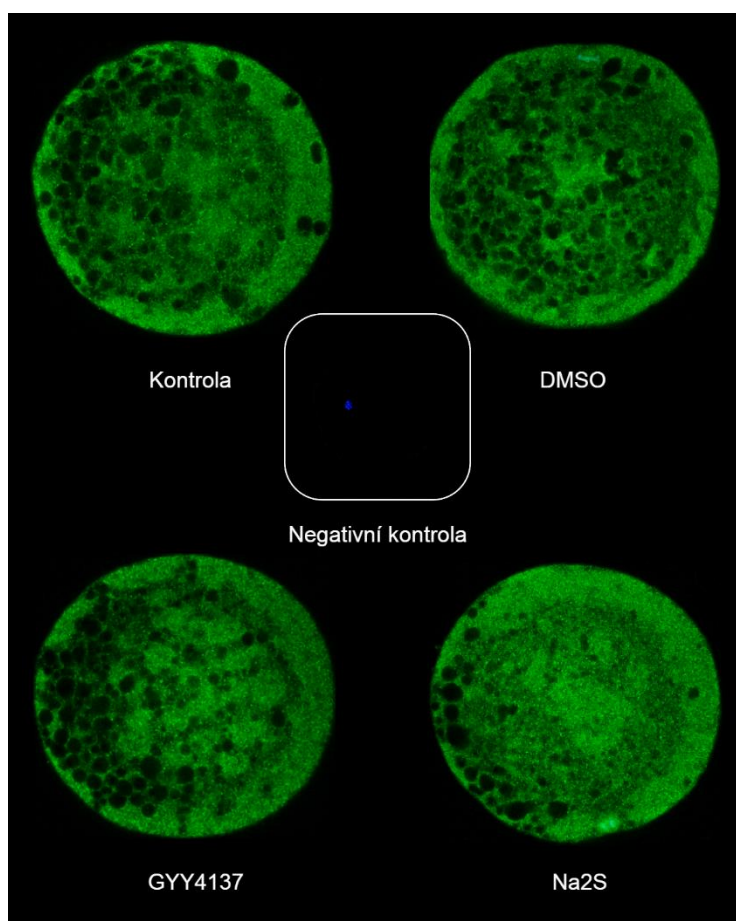
5.2 Lokalizace vybraných apoptotických markerů v časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

Cílem tohoto experimentu bylo lokalizovat anti-apoptotický faktor Bcl-2 a pro-apoptotický faktor BAX v časně stárnoucích prasečích oocytech. Oocyty byly během zrání kultivovány s donory sulfanu (GY4137 nebo Na₂S), s DMSO nebo v čistém modifikovaném médiu M199 (kontrolní skupina). Po ukončení doby kultivace byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a kultivovány dalších 24 hodin v čistém modifikovaném médiu M199.

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kde byly oocyty inkubovány pouze se sekundární protilátkou anti-rabbit konjugovanou s FITC. Tato kontrola sloužila k vyloučení nespecifické vazby protilátky v oocytech.

Lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 v časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

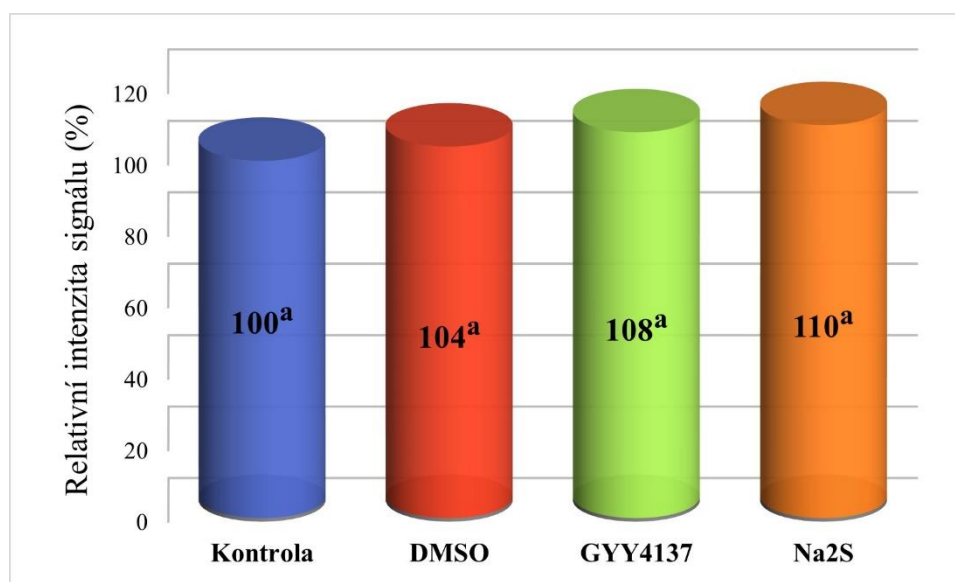
Přítomnost anti-apoptotického faktoru Bcl-2 byla detekována ve všech sledovaných skupinách časně stárnoucích oocytů.



Obr. 13. Lokalizace anti-apoptotického faktoru Bcl-2 v jednotlivých skupinách časně stárnoucích prasečích oocytů. Kontrola – skupina oocytů kultivovaná po celou dobu v čistém

kultivačním médiu. DMSO – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu s přidavkem čistého DMSO a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém kultivačním médiu. GYY4137 – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu obohaceném o donor sulfanu GYY4137 v koncentraci 15 μM a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém kultivačním médiu. Na_2S – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu obohaceném o donor sulfanu Na_2S ve formě nonahydrátu v koncentraci 300 μM a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém médiu (Bcl-2 značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – DAPI).

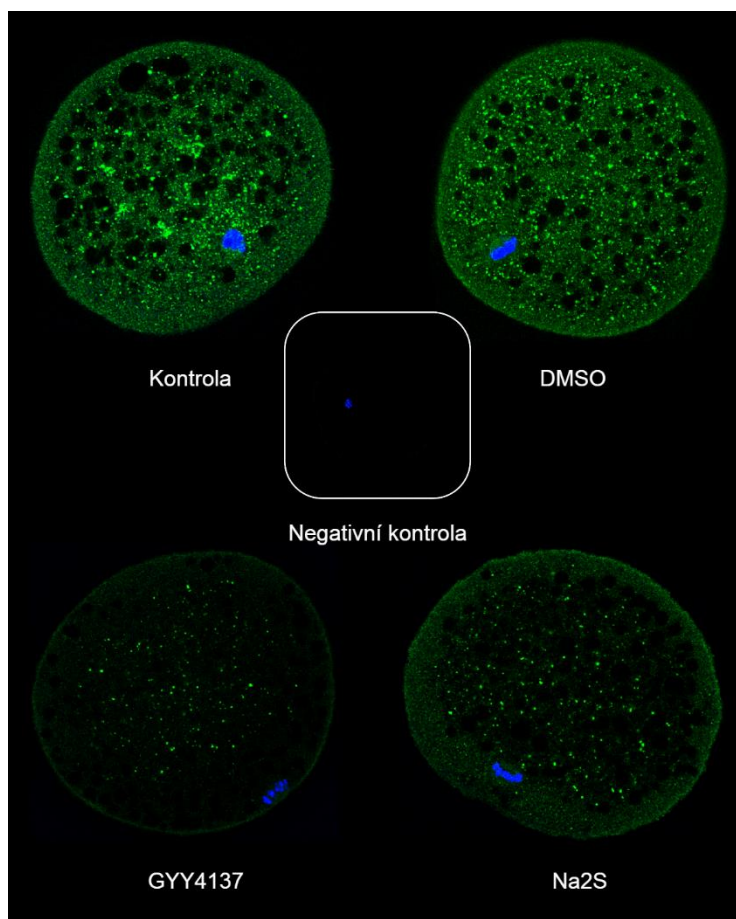
Mezi jednotlivými skupinami časně stárnoucích oocytů nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v relativní intenzitě signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2. Výsledky shrnuje graf 3.



Graf 3. Relativní intenzita signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2 v jednotlivých skupinách časně stárnoucích oocytů, vztažená k intenzitě signálu tohoto faktoru v kontrolní skupině. Rozdílnými ^{a,b,c} superskripty jsou znázorněny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

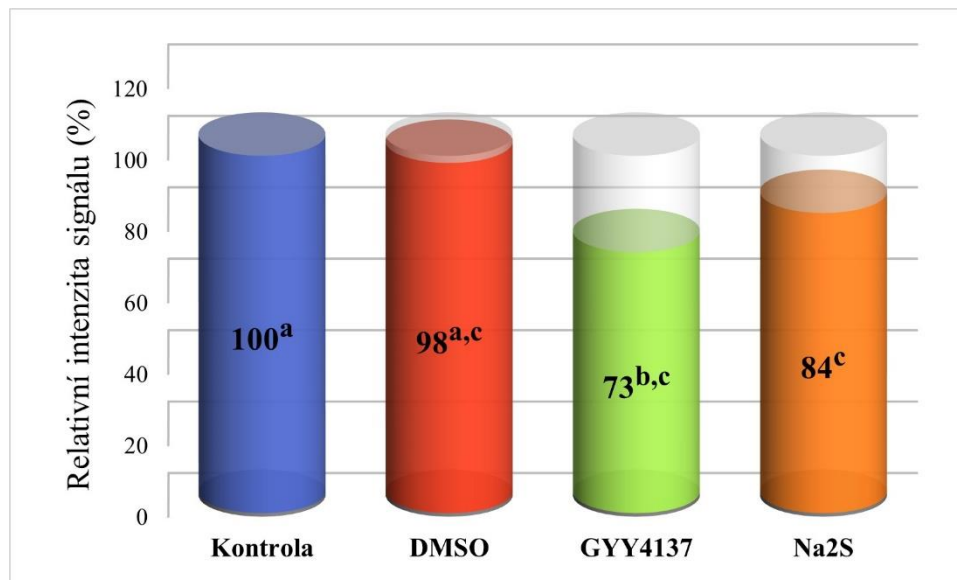
Lokalizace pro-apoptického faktoru BAX v časně stárnoucích prasečích oocytech ovlivněných donory sulfanu

Přítomnost pro-apoptického faktoru BAX byla lokalizována ve všech skupinách časně stárnoucích oocytů.



Obr. 14. Lokalizace pro-apoptického faktoru BAX v jednotlivých skupinách časně stárnoucích prasečích oocytů. Kontrola – skupina oocytů kultivovaná po celou dobu v čistém kultivačním médiu. DMSO – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu s přídavkem čistého DMSO a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém kultivačním médiu. GYY4137 – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu obohaceném o donor sulfanu GYY4137 v koncentraci 15 μM a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém kultivačním médiu. Na_2S – skupina oocytů kultivovaná po dobu meiotického zrání v médiu obohaceném o donor sulfanu Na_2S ve formě nonahydrátu v koncentraci 300 μM a poté 24 hodin (prodloužená kultivace) v čistém médiu (BAX značen zeleně – FITC, chromatin značen modře – DAPI).

V tomto experimentu byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou časně stárnoucích oocytů a skupinami oocytů, které byly během zrání kultivovány v médiu s donory sulfanu GYY4137 nebo $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$. Mezi kontrolní skupinou a skupinou oocytů, která byla během zrání kultivována v médiu s přídavkem DMSO nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Dále nebyly statisticky významné rozdíly zjištěny ani mezi skupinami DMSO, GYY4137 a $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$. Výsledky shrnuje graf 4.



Graf 4. Relativní intenzita signálu pro-apoptického faktoru BAX v jednotlivých skupinách časně stárnoucích oocytů, vztažená k intenzitě signálu tohoto faktoru v kontrolní skupině. Rozdílnými ^{a,b,c} superskripty jsou znázorněny statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými skupinami.

6 Diskuze

V této diplomové práci jsme se zabývali porovnáním vlivu dvou donorů sulfanu s rozdílným mechanismem jeho uvolňování na kvalitu dozrálých a časně stárnoucích prasečích oocytů. Kvalita oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách je základním faktorem ovlivňujícím úspěšnost a další rozvoj reprodukčních biotechnologií. Zisk zralých, vývojově kompetentních oocytů v laboratorním prostředí je ovšem podmíněn mnoha faktory, mezi které patří i podmínky a doba jejich kultivace nebo složení kultivačního média. Používaná kultivační média se ve snaze o zisk vývojově plně kompetentních oocytů často obohacují o mnohé suplementy, které zvyšují úspěšnost *in vitro* kultivace oocytů.

Jedním z těchto možných suplementů je i sulfan (H_2S) patřící mezi gasotransmitery. Sulfan je v oocytech přirozeně produkován endogenními enzymy, konkrétně aktivitou cystathionin β -syntázy (CBS), cystathionin γ -lyázy (CSE) a 3-merkaptopyruvat sulfurtransferázy (3MST) (Stipanuk & Beck 1982; Nevorál et al. 2015). Jeho koncentrace však může být zvýšena také využitím exogenních zdrojů, jako jsou syntetické nebo přírodní donory sulfanu (Papapetropoulos et al. 2015). V minulosti již byla prokázána jeho důležitá role při regulaci meiotického zrání, kdy vystavení oocytů zvýšené koncentraci sulfanu dodáním donoru sulfanu do kultivačního média během meiotického zrání i následné prodloužené kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách mělo pozitivní vliv na životaschopnost a vývojový potenciál oocytů (Nevorál et al. 2014; Krejčová et al. 2015). Mezi nejběžněji využívané donory sulfanu patří zejména hydrogensulfid sodný (NaHS) a sulfid sodný (Na_2S), které jsou označovány za tzv. rychlé nebo okamžité donory a vyvolávají rychlé počáteční zvýšení koncentrace, která však záhy klesá (Li et al. 2008; Song et al. 2014). Tento způsob signalizace však nemusí dostatečně kopírovat fyziologický mechanismus signalizace endogenně produkováným sulfanem (Li et al. 2008; Roger et al. 2013). Existují však i donory s odlišným mechanismem uvolňování sulfanu, a to s pomalým/kontinuálním uvolňováním H_2S . Mezi takové donory patří i morfolin-4-ium-4-methoxyfenyl (morfolino) fosfinodithioát (GYY4137), u kterého dochází ke konstantnímu zvýšení koncentrace H_2S (Li et al. 2008).

Byla stanovena hypotéza, že použití donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování bude efektivnější než použití donoru s rychlým uvolněním sulfanu při jejich použití během meiotického zrání i prodloužené kultivace prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Pro experimenty jsme zvolili jednoho zástupce ze skupiny nejběžněji využívaných anorganických donorů sulfanu tzv. okamžitých donorů, a to sulfid sodný (ve formě nonahydrátu - $Na_2S \cdot 9 H_2O$) (Song et al. 2014). Druhým použitým donorem sulfanu byl donor GYY4137 (morfolin-4-ium-4-methoxyfenyl (morfolino) fosfinodithioát), který je naopak charakteristický pomalým neboli kontinuálním uvolňováním sulfanu (Li et al. 2008).

Cílem prvního experimentu bylo lokalizovat a porovnat relativní intenzity signálu anti-apoptického faktoru Bcl-2 a pro-apoptického faktoru BAX v dozrálých prasečích oocytech.

Oba tyto faktory byly lokalizovány ve všech skupinách dozrálých oocytů. Tyto faktory byly cíleně vybrány jako markery programované buněčné smrti - apoptózy, která je nedílnou součástí procesů spojených se zánikem oocytů a pokud je spuštěna, výrazně limituje kvalitu a použitelnost oocytů v biotechnologiích (Petrová et al., 2004). Apoptóza oocytů je regulována složitými kaskádami signálních molekul, do kterých jsou mimo jiné zapojeny i proteiny z

rodiny Bcl-2, k jejichž expresi dochází v mitochondriích. Zástupci této proteinové rodiny, jako jsou anti-apoptotický faktor Bcl-2 nebo pro-apoptotický faktor BAX zajišťují regulaci proteolytické aktivity kaspáz, a tím regulují aktivaci apoptózy vnitřní signální dráhou (Exley et al. 1999).

Při porovnání relativních intenzit signálu anti-apoptotického faktoru Bcl-2, inhibitoru apoptózy, mezi jednotlivými skupinami dozrálých oocytů byla pozorována vyšší relativní intenzita signálu ve skupinách oocytů kultivovaných s donory sulfanu. Pouze v případě donoru $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, s rychlým mechanismem uvolnění sulfanu, se však jednalo o statisticky významný rozdíl.

Pro-apoptotický faktor BAX naopak vykazoval v obou skupinách oocytů kultivovaných s donory sulfanu signifikantně nižší relativní intenzitu signálu, než tomu bylo u kontrolní skupiny oocytů a skupiny kultivované v médiu s přídavkem DMSO. Je evidentní, že vystavení oocytů zvýšené koncentraci sulfanu během jejich meiotického zrání vede k potlačení iniciace procesu apoptózy a má tedy jistě protektivní efekt na kultivované oocyty, jak již bylo ostatně publikováno jinými studii (Nevoral et al. 2014; Krejčová et al. 2015). Naše hypotéza se v tomto experimentu ovšem nepotvrdila, neboť mírně efektivnější zde bylo použití donoru s rychlým mechanismem uvolňování sulfanu. Dramatické rozdíly mezi jednotlivými donory však nebyly pozorovány.

Mechanismus, kterým zde samotný sulfan ovlivňuje meiotické zrání není dosud zcela objasněn, pravděpodobně však moduluje funkci molekul MPF a MAPK, které jsou pro správný průběh meiotického zrání naprosto zásadní (Nevoral et al. 2015). K regulaci jejich funkce může docházet například sulfhydratací, jako je tomu u některých iontových kanálů (Tang et al. 2010). Sulfan dále ovlivňuje také signální dráhu cAMP/PKA, která se aktivně podílí na udržování prvního meiotického bloku (Njie-Mbye et al. 2012), k jehož prolomení by mohlo přispět i jednorázové zvýšení koncentrace sulfanu způsobené právě okamžitým donorem sulfanu.

Druhý experiment byl zaměřen na lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktoru BAX v časně stárnoucích prasečích oocytech. Prasečí oocyty byly vystaveny působení donorů během jejich meiotického zrání. Prodloužená kultivace oocytů probíhala již v čistém kultivačním médiu po dobu 24 hodin. Při prodloužené kultivaci oocytů dochází k zahájení procesu stárnutí, který se projevuje řadou funkčních a morfologických změn oocytů a vede tak ke ztrátě jejich vývojového potenciálu. Důsledkem těchto změn může být kromě lýzy a spontánní partenogenetické aktivace neoplozených oocytů i jejich apoptotický zánik, který se projevuje fragmentací oocytů (Kikuchi et al. 2000; Petrová et al. 2004).

Oba apoptotické faktory byly opět detekovány ve všech skupinách časně stárnoucích oocytů. V případě anti-apoptotického faktoru Bcl-2 nebyly mezi skupinami sice zaznamenány statisticky významné rozdíly, ale byl zde patrný stejný trend jako v předchozím experimentu, kdy byla zaznamenána vyšší relativní intenzita signálu proteinu Bcl-2 ve skupinách oocytů kultivovaných s donory sulfanu.

Relativní intenzita signálu pro-apoptotického faktoru BAX byla opět nižší u skupin oocytů, které byly v průběhu meiotického zrání kultivovány v médiu obohaceném o jeden z donorů sulfanu. U skupiny oocytů kultivované s $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ byl zaznamenán statisticky významný pokles intenzity signálu v porovnání s kontrolní skupinou časně stárnoucích oocytů. Signifikantně nižší intenzitu signálu faktoru BAX ovšem vykazovala zejména skupina oocytů, která byla v průběhu meiotického zrání kultivována v médiu obohaceném o donor GYY4137.

Výsledky tohoto experimentu tedy naznačují, že v případě prodloužené kultivace mohou být v ochraně oocytů před apoptózou efektivnější donory sulfanu s pomalým uvolňováním. Důvodem bude pravděpodobně kontinuální uvolňování sulfanu z těchto donorů, které zřejmě lépe kompenzuje přirozený pokles endogenní produkce sulfanu v časně fázi procesu stárnutí.

Že je sulfan jednoznačně zapojen do regulace apoptotických procesů dokazují i studie provedené na jiných typech buněk například na kardiomyocytech, kde byl prokázán vliv sulfanu na zvýšení exprese anti-apoptotického faktoru Bcl-2 (Shi et al. 2009) nebo v hepatocytech, kde sulfan kromě exprese Bcl-2 zvyšuje také expresi heat shock proteinů (Jha et al. 2008). Jiné experimenty naopak prokázaly, že je sulfan schopen apoptózu také indukovat, a to například u lidských plicních fibroblastů (Baskar et al. 2007) nebo v hladkosvalových buňkách plicních tepen (Wei et al. 2009).

Hypotézu této diplomové práce se jednoznačně potvrdit nepodařilo. Je možné, že volba donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování, zřejmě dostatečně neodpovídá fyziologické signalizaci, kterou *in vivo* sulfan v prasečích oocytech vyvolává, neboť je známo, že pro většinu živých systémů je typický spíše signál oscilačního či pulzního charakteru než námi použitý kontinuální mechanismus uvolňování (Li & Goldbeter 1992). Donory sulfanu s takovým mechanismem uvolňování komerčně nejsou dostupné. Jistě by však bylo zajímavé, se v rámci dalšího výzkumu pokusit se ještě víc přiblížit fyziologickému způsobu signalizace, a to navozením oscilačního nebo pulzního módu působení donoru sulfanu, například střídáním čistého kultivačního média s médiem obohaceným o donor sulfanu s kontinuálním mechanismem jeho uvolňování v různých časových intervalech a získané výsledky porovnat s výsledky této diplomové práce.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na ověření hypotézy, že použití donoru sulfanu s pomalým/kontinuálním mechanismem jeho uvolňování během meiotického zrání prasečích oocytů bude efektivnější než použití donoru s rychlým uvolněním sulfanu a ve svém důsledku bude mít u prasečích oocytů výraznější protektivní efekt proti procesům spojeným s jejich stárnutím. Tuto hypotézu jsme provedenými experimenty potvrdili jen částečně.

V experimentech zaměřených na lokalizaci anti-apoptotického faktoru Bcl-2 a pro-apoptotického faktoru BAX v dozrálých prasečích oocytech kultivovaných *in vitro* do stádia metafáze II za přítomnosti jednoho z donorů sulfanu (GY4137 nebo Na₂S * 9 H₂O) byly tyto faktory lokalizovány ve všech skupinách kultivovaných oocytů. Relativní intenzita signálu anti-apoptotického faktoru Bcl-2 byla v porovnání s ostatními skupinami kultivovaných oocytů, statisticky významně vyšší pouze u skupiny oocytů zrajících za přítomnosti donoru Na₂S * 9 H₂O. V případě pro-apoptotického faktoru BAX byla naopak v obou skupinách oocytů kultivovaných s donory sulfanu zaznamenána statisticky významně nižší relativní intenzita signálu oproti kontrolní skupině oocytů a skupině oocytů kultivované v médiu s přídavkem DMSO.

V experimentech zaměřených na lokalizaci apoptotických faktorů v časně stárnoucích oocytech, byly tyto faktory, jak anti-apoptotický Bcl-2, tak pro-apoptotický BAX opět lokalizovány ve všech skupinách časně stárnoucích oocytů, které byly po dosažení metafáze II kultivovány dalších 24 hodin v čistém kultivačním médiu. V případě faktoru Bcl-2 nebyl mezi skupinami časně stárnoucích oocytů zaznamenán žádný statistický významný rozdíl v relativní intenzitě signálu. Signál pro-apoptotického faktoru BAX byl pak významně nižší u skupiny časně stárnoucích oocytů, jejichž zrání probíhalo za přítomnosti donoru GY4137. Mezi oběma donory však statisticky významný rozdíl nebyl.

Z těchto výsledků tedy vyplývá pozitivní vliv obou typů donorů sulfanu na potlačení projevů stárnutí a kvalitu prasečích oocytů zrajících v *in vitro* podmínkách. Oba typy donorů sulfanu jsou dle našich výsledků schopny ovlivnit regulaci apoptózy prasečích oocytů. Naše hypotéza však byla potvrzena pouze částečně, neboť při použití donoru s pomalým/kontinuálním mechanismem uvolňování sulfanu bylo lepších výsledků dosaženo pouze u sledovaného faktoru BAX ve skupině časně stárnoucích oocytů. Nalezení způsobu použití donoru sulfanu s optimálnějším mechanismem jeho uvolňování by mohlo být velkým přínosem pro oblast reprodukčních biotechnologií využívaných v asistované reprodukci lidí i hospodářských zvířat.

8 Literatura

Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* **16**:1066-1071.

Adams J, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322-1326.

Aerts J, Bols P. 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in domestic animals* **45**:171-179.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2005. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero, Ústí nad Labem.

Albrecht K, Eicher E. 2001. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental biology* **240**:92-107.

Anderson E, Baltus A, Roepers-Gajadien H, Hassold T, de Rooij D, van Pelt A, Page D. 2008. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:14976–14980.

Austin CR. 1974. Fertilization. Pages 48-75 in Lash J, Whittaker JR, editors. *Concepts of development*. Sinauer Associates, Stanford.

Baltus A, Menke D, Hu Y, Goodhear M, Carpenter A, de Rooij D, Page D. 2006. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature genetics* **38**:1430-1434.

Banerjee R, Zou C. 2005. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine- β -synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of biochemistry and biophysics* **433**:144-156.

Baskar R, Li L, Moore PK. 2007. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *The FASEB Journal* **21**:247-255.

Benavides G, Squadrito G, Mills R, Patel H, Isbell T, Patel R, Darley-Usmar V, Doeller J, Kraus D. 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:17977-17982.

Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. 1994. Stomach NO synthesis. *Nature* **368**:502.

Bernhardt M, Kim A, O'Halloran T, Woodruff T. 2011. Zinc Requirement During Meiosis I–Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Is Independent of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction* **84**:526–536.

Berridge M, Bootman M, Lipp P. 1998. Calcium – a life and death signal. *Nature* **395**:645-648.

Bielńska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology* **6**:161-193.

Black J, Erickson B. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record* **161**:45-55.

Boczkowski J, Poderoso J, Motterlini R. 2006. CO-metal interaction: vital signaling from a lethal gas. *Trends in biochemical sciences* **31**:614-621.

- Boerjan M, De Boer P. 1990. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Molecular reproduction and development* **25**:155-163.
- Bowles J et al. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* **312**:596-600.
- Brisson M, Foster C, Wipf P, Joo B, Tomko R, Nguyen T, Lazo J. 2007. Independent mechanistic inhibition of cdc25 phosphatases by a natural product caulibugulone. *Molecular pharmacology* **71**:184-192.
- Brouard S, Otterbein L, Anrather J, Tobiasch E, Bach F, Choi A, Soares M. 2000. Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **192**:1015–1025.
- 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.
- Byskov A. 1975. The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *Reproduction* **45**:201-209.
- Clapham D. 1995. Calcium Signaling. *Cell* **80**:259-268.
- Cohen G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* **326**:1-16.
- Colledge W, Carlton M, Udy G, Evans M. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* **370**:65-68.
- Conti M, Hsieh M, Zamah A, Oh J. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **356**:65-73.
- d’Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro L, Cirino G. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4513-4518.
- Dedieu T, Gall L, Crozet N, Sevellec C, Ruffini S. 1996. Mitogen-Activated Protein Kinase Activity During Goat Oocyte Maturation and the Acquisition of Meiotic Competence. *Molecular Reproduction and Development* **45**:351-358.
- Dekel N. 1988. Regulation of Oocyte Maturation: The Role of cAMP. *Annals of the New York Academy of Sciences* **541**:211-216.
- Dekel N. 1996. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of Reproduction* **1**:82-88.
- Diwakar L, Ravindranath V. 2007. Inhibition of cystathionine- γ -lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS. *Neurochemistry international* **50**:418-426.
- Doeller J, Isbell T, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel R, Lancaster J, Darley-USmar V, Kraus D. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical biochemistry* **341**:40–51.
- Ducibella T. 1998. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology* **49**:53-65.
- Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B. 1990. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biology of Reproduction* **43**:870-876.

Duckworth B, Weaver J, Ruderman J. 2002. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:16794–16799.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. 2000. It has been established that oocyte aging results in significant increases in premature chromosome separation, that is strongly associated with aneuploidy. *Human Reproduction* **15**:427-430.

Edson M, Nagaraja A, Matzuk M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews* **30**:624-712.

Erickson G, Magoffin D, Dyer C, Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine reviews* **6**:371-399.

Exley G, Tang C, McElhinny A, Warner C. 1999. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* **61**:231-239.

Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science* **78**:203-216.

Fan H, Huo L, Meng X, Zhong Z, Hou Y, Chen D, Sun Q. 2003. Involvement of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in Meiotic Maturation and Activation of Pig Oocytes1. *Biology of Reproduction* **69**:1552–1564.

Fan H, Sun Q. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction* **70**:535–547.

Fan H, Tong C, Chen D, Sun Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin* **47**:1157-1162.

Fan T, Han L, Cong R, Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **37**:719-727.

Fesquet D, Labbé J, Derancourt J, Capony J, Galas S, Girard F, Lorca T, Shuttleworth J, Doree M, Cavadore J. 1993. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclindependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr61 and its homologues. *The EMBO Journal* **12**:3111-3121.

Fissore R, He C, Vande Woude G. 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* **55**:1261-1270.

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

Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt M. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology* **62**:255-259.

Gable T, Woods G. 2001. Increasing culture time from 48 to 96 or 144 hours increased the proportion of equine cumulus oocyte complexes with negative or fragmented nucleus morphology. *Theriogenology* **55**:1549-1560.

Gallicano G, McGaughey R, Capco D. 1997. Activation of Protein Kinase C After Fertilization is Required for Remodeling the Mouse Egg Into the Zygote. *Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **46**:587-601.

Gao S, Han Z, Kihara M, Adashi E, Latham K. 2005. Protease inhibitor MG132 in cloning: no end to the nightmare. *Trends in biotechnology* **23**:66-68.

- Garrington T, Johnson G. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **11**:211-218.
- Gemici B, Wallace J. 2015. Anti-inflammatory and cytoprotective properties of hydrogen sulfide. *Methods in enzymology* **555**:169-193.
- George M, Pickering S, Braude P, Johnson M. 1996. Preimplantation embryology: The distribution of α - and γ -tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant. *Molecular Human Reproduction* **2**:445-456.
- Gondos B. 1975. Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *The American journal of pathology* **81**:303-312.
- Gondos B, Zamboni L. 1969. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertility and sterility* **20**:176-191.
- Gottlieb Y, Truman M, Cohen L, Leichtmann-Bardoogo Y, Meyron-Holtz E. 2012. Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol. *Haematologica* **97**:1489-1493.
- Goud A, Goud P, Diamond M, Abu-Soud H. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry* **44**:11361-11368.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**:245-250.
- Henry M, Rawlins R, Radwanska E, Fahy M. 1997. Oocyte maturation in rabbits: effects of calmodulin inhibitors. *Zygote* **5**:255-260.
- Herlands R, Schultz R. 1984. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology* **229**:317-325.
- Hirshfield A. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of reproduction* **44**:1157-1162.
- Homer H. 2013. The APC/C in female mammalian meiosis I. *Reproduction* **146**:61-71.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* **237**:527-531.
- Hubbard C, Terranova P. 1982. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact cumulus. *Biology of Reproduction* **26**:628-632.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:122-130.
- Hunt P, Hassold T. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad?. *Trends in Genetics* **24**:86-93.
- Hu R, Lu J, You X, Zhu X, Hui N, Ni X. 2011. Hydrogen sulfide inhibits the spontaneous and oxytocin-induced contractility of human pregnant myometrium. *Gynecological Endocrinology* **27**:900-904.
- Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**:1717-1751.

Chan T, Chen E, Tatoyan A, Shargill N, Pleta M, Hochstein P. 1986. Stimulation of tyrosine-specific protein phosphorylation in the rat liver plasma membrane by oxygen radicals. *Biochemical and biophysical research communications* **139**:439-445.

Chen X, Jhee K, Kruger W. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry* **279**:52082-52086.

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. 2009. H₂S biogenesis by human cystathionine γ -lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry* **284**:11601-11612.

Chi M, Manchester J, Yang V, Curato A, Strickler R, Lowry O. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biology of Reproduction* **39**:295-307.

Chmelíková E, Jeřeta M, Sedmíková M, Petr J, Tůmová L, Kott T, Lipovová P, Jílek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* **18**:235-244.

Chmelíková E, Sedmíková M, Petr J, Kott T, Lánská V, Tůmová L, Tichovská H, Jeřeta M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science* **54**:137-149.

Chung H, Choi B, Kwon Y, Kim Y. 2008. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation. *Methods in enzymology* **441**:329-338.

Igarashi H, Takahashi T, Takahashi E, Tezuka N, Nakahara K, Takahashi K, Kurachi H. 2005. Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. *Biology of Reproduction* **72**:1256-1261.

Ingi T, Cheng J, Ronnett G. 1996. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* **16**:835-842.

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, Nakayama T, Sato E. 1998. Mitogen-Activated Protein Kinase Translocates into the Germinal Vesicle and Induces Germinal Vesicle Breakdown in Porcine Oocytes'. *Biology of Reproduction* **58**:130-136.

Irniger S. 2002. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS letters* **532**:7-11.

Jablonka-Shariff A, Olson L. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* **138**:460-468.

Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A, Lefer DJ. 2008. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **295**:801-806.

Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. 1999. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicological sciences* **50**:271-279.

- Jeon Y, Yoon J, Cai L, Hwang S, Kim E, Zheng Z, Jeung E, Lee E, Hyun S. 2015. Zinc deficiency during in vitro maturation of porcine oocytes causes meiotic block and developmental failure. *Molecular Medicine Reports* **12**:5973-5982.
- Jones K. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **10**:1-5.
- Josefsberg L, Galiani D, Dantes A, Amsterdam A, Dekel N. 2000. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biology of Reproduction* **62**:1270-1277.
- Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. 1997. *Základy histologie*. edition. H & H, Jinočany.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I. 2006. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic β -cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* **55**:1391-1397.
- Kaufman M, Homa S. 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology* **265**:69-76.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Kaneko H, Tojo H. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Cloning & Stem Cells* **4**:211-222.
- 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 A, Vogt S, O'Halloran T, Woodruff T. 2010. Zinc Availability Regulates Exit from Meiosis in Maturing Mammalian Oocytes. *Nature chemical biology* **6**:674–681.
- Kim N, Moon S, Prather R, Day B. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development* **43**:513-518.
- Kimura Y, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB journal* **18**:1165-1167.
- Korte E. 2007. PIP2 cleavage by PLC to release IP3 and DAG. Pagein Wikipedia: the free encyclopedia. Wikimedia Foundation, San Francisco (CA). Available from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PIP2_cleavage_to_IP3_and_DAG.jpg (accessed October 2020).
- Krejčová T, Smelcova M, Petr J, Bodart JF, Sedmikova M, Nevoral J, Chmelikova E. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLOS ONE* **10** (e0116964) DOI: 10.1371/journal.pone.0116964.
- Krisher R. 2013. *Oocyte physiology and development in domestic animals*. John Wiley & Sons, New York.
- Kwon N, Nathan C, Gilker C, Griffith O, Matthews D, Stuehr D. 1990. L-Citrulline Production from L-Arginine by Macrophage Nitric Oxide Synthase: The ureido oxygen derives from dioxygen. *Journal of Biological Chemistry* **265**:13442-13445.
- Lamas S, Marsden P, Li G, Tempst P, Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**:6348-6352.
- Lee J, Miyano T, Moor R. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* **8**:119-125.

Li Y, Goldbeter, A. 1992. Pulsatile signaling in intercellular communication. Periodic stimuli are more efficient than random or chaotic signals in a model based on receptor desensitization. *Biophysical journal* **61**:161-171.

Liang C, Su Y, Fan H, Schatten H, Sun Q. 2007. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology* **21**:2037–2055.

Liang R, Yu W, Du J, Yang L, Shang M, Guo J. 2006. Localization of cystathionine synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese medical journal* **119**:1877-1883.

Li L, Whiteman M, Guan Y, Neo K, Cheng Y, Lee S, Zhao Y, Baskar R, Tan C, Moore P. 2008. Characterization of a Novel, Water-Soluble Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule (GYY4137). *Circulation* **117**:2351-2360.

Li Q, Lancaster J. 2013. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric oxide* **35**:21-34.

Li Q, Wang G, Zhang J, Zhou P, Wang T, Cui W, Luo M, Tan J. 2012. Combined inhibitory effects of pyruvate and low temperature on postovulatory aging of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* **85**:1-11.

Li W, Jin HF, Liu D, Sun JH, Jian PJ, Li XH, Tang CS, Du JB. 2009. Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Chinese Medical Journal* **122**:3032-3038.

Li Y, Goldbeter A. 1992. Pulsatile signaling in intercellular communication. Periodic stimuli are more efficient than random or chaotic signals in a model based on receptor desensitization. *Biophysical journal* **6**:161-171.

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

Liu N, Wu Y, Lan G, Sui H, Ge L, Wang J, Liu Y, Qiao T, Tan J. 2009. Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *Reproduction* **138**:223–234.

Longo F. 1974. Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biology of reproduction* **11**:22-39.

Longo F. 1981. Changes in the zonae pellucidae and plasmalemmae of aging mouse eggs. *Biology of Reproduction* **25**:399-411.

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

Lord T, Aitken J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* **146**:217-227.

Lord T, Nixon B, Jones K, Aitken R. 2013. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biology of reproduction* **88**:1-9.

Łowicka E, Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological reports* **59**:4-24.

Mailhes J, Young D, London S. 1998. Postovulatory ageing of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biology of Reproduction* **58**:1206-1210.

- Ma N, Ding X, Doi M, Izumi N, Semba R. 2004. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *Journal of neurocytology* **33**:407-415.
- Maruska D, Leibfried M, First N. 1984. Role of calcium and the calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine cumulus-oocyte complex. *Biology of reproduction* **31**:1-6.
- Masui Y. 1974. A cytostatic factor in amphibian oocytes: its extraction and partial characterization. *Journal of Experimental Zoology* **187**:141-147.
- Masui Y, Markert C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology* **177**:129-145.
- Ma W, Zhang D, Hou Y, Li Y, Sun Q, Sun X, Wang W. 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**:373-383.
- Mehlmann L, Jones T, Jaffe L. 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* **297**:1343-1345.
- Miao Y, Kikuchi K, Sun Q, Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update* **15**:573-585.
- Miao Y, Liu X, Qiao T, Miao D, Luo M, Tan J. 2005. Cumulus Cells Accelerate Aging of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction* **73**:1025-1031.
- Miao Y, Ma S, Liu X, Miao D, Chang Z, Luo M, Tan J. 2004. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **69**:66-76.
- Miles E, Kraus J. 2004. Cystathionine β -synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *Journal of Biological Chemistry* **279**:29871-29874.
- Mintz B. 1957. Embryological development of primordial germ cells in the mouse: influence of a new mutation. *J. Embryol. exp. Morph* **5**:396-403.
- Moncada S, Palmer R, Higgs E. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43**:109-142.
- Motlik J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reproduction* **72**:323-328.
- Motlík J, Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* **25**:87-96.
- Motterlini R, Mann B, Johnson T, Clark J, Foresti R, Green C. 2003. Bioactivity and Pharmacological Actions of Carbon Monoxide-Releasing Molecules. *Current Pharmaceutical Design* **9**:2525-2539.
- 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.
- Nagahara N, Nishino T. 1996. Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. CDNA cloning, overexpression, and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **271**:27395-27401.

Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *The FASEB journal* **18**:557-559.

Nagase S, Takemura K, Ueda A, Hirayama A, Aoyagi K, Kondoh M, Koyama A. 1997. A Novel Nonenzymatic Pathway for the Generation of Nitric Oxide by the Reaction of Hydrogen Peroxide and D- or L-Arginine. *Biochemical and biophysical research communications* **233**:150-153.

Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction* **67**:1588-1592.

Němeček D, Dvořáková M, Heroutová I, Chmelíková E, Sedmíková M. 2017. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *PeerJ* **5** (e3876) DOI: 10.7717/peerj.3876.

Nevoral J, Bodart J, Petr J. 2016. Gasotransmitters in gametogenesis and early development: holy trinity for assisted reproductive technology—a review. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**:1-12.

Nevoral J, Petr J, Gelaude A, Bodart JF, Kucerova-Chrpova V, Sedmikova M, Krejцова T, Kolbabova T, Dvorakova M, Vyskocilova A, Weingartova I, Krivohlavkova L, Zalmanova T, Jilek F. 2014. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLOS ONE* **9** (e99613) DOI: 10.1371/journal.pone.0099613.

Nevoral J et al. 2015. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide* **51**:24-35.

Nixon V, Lévasséur M, McDougall A, Jones K. 2002. Ca²⁺ oscillations promote APC/C-dependent cyclin B degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Current Biology* **12**:746-750.

Njie-Mbye YF, Kulkarni M, Opere CA, Ohia SE. 2012. Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research* **98**:16-22.

Oikawa S, Hiraku Y, Fujiwara T, Saito I, Kawanishi S. 2002. Site-specific hydroxylation at polyguanosine in double-stranded DNA by nickel (II) in the presence of SH compounds: comparison with singlet oxygen-induced DNA damage. *Chemical research in toxicology* **15**:1017-1022.

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

Pae H, Lee C, Jo E, Chung H. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research* **32**:1155-1162.

Palmer A, Gavin A, Nebreda A. 1998. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal* **17**:5037-5047.

Pandey A, Chaube S. 2015. Reduction of nitric oxide level leads to spontaneous resumption of meiosis in diplotene-arrested rat oocytes cultured in vitro. *Experimental Biology and Medicine* **240**:15-25.

- Papapetropoulos A, Whiteman M, Cirino G. 2015. Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *British journal of pharmacology* **172**:1633-1637.
- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**:10.
- 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 roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **55**:75-82.
- Picton R, Eggo M, Merrill G, Langman M, Singh S. 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* **50**:201-205.
- Pirino G, Wescott M, Donovan P. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* **8**:665-670.
- Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz J, Johnson G. 2016. *Cell biology*. Elsevier, Philadelphia.
- Prasad S, Chaube S. 2016. S-nitroso-N-acetyl penicillamine inhibits spontaneous exit from metaphase-II arrest in rat eggs cultured in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**:680-686.
- Premkumar K, Chaube S. 2015. Nitric oxide signals postovulatory aging-induced abortive spontaneous egg activation in rats. *Redox Report* **20**:184-192.
- Que E et al. 2015. Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nature Chemistry* **7**:130–139.
- 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.
- Reiffenstein R, Hulbert W, Roth S. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology* **32**:109-134.
- Rink T, Hallam T. 1989. Calcium signalling in non-excitabile cells: Notes on oscillations and store refilling. *Cell Calcium* **10**:385-395.
- Roger T et al. 2013. New Biologically Active Hydrogen Sulfide Donors. *ChemBioChem* **14**:2268-2271.
- Rosa L, Vrenken T, Hannivoort R, Buist-Homan M, Havinga R, Slebos D, Kauffman H, Faber K, Jansen P, Moshage H. 2008. Carbon monoxide blocks oxidative stress-induced hepatocyte apoptosis via inhibition of the p54 JNK isoform. *Free Radical Biology & Medicine* **44**:1323–1333.
- Rosselli M, Keller R, Dubey R. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human reproduction update* **4**:3-24.
- Ryter S, Choi A. 2016. Targeting Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide for Therapeutic Modulation of Inflammation. *Translational Research* **167**:7-34.
- Sadler T. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. edition. Grada, Praha.
- Sato E. 1990. Suppression of spontaneous maturation of isolated cumulus-free mouse oocytes by a calmodulin antagonist. *Endocrinologia japonica* **37**:19-25.

Sawyer H, Smith P, Heath D, Juengel J, Wakefield S, McNatty K. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of reproduction* **66**:1134-1150.

Shi S, Li QS, Li H, Zhang L, Xu M, Cheng JL, Peng CH, Xu CQ, Tian Y. 2009. Anti-apoptotic action of hydrogen sulfide is associated with early JNK inhibition. *Cell biology international* **33**:1095-1101.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. 2009a. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *The journal of biochemistry* **146**:623-626.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling* **11**:703-714.

Schwarz K, Pires P, Mesquita L, Chiaratti M, Chiaratti C. 2014. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* **81**:556-564.

Schworer C, Colbran R, Keefer J, Soderling T. 1988. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *Journal of Biological Chemistry* **263**:13486-13489.

Sidhu R, Singh M, Samir G, Carson R. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology & toxicology* **88**:198-203.

Siracusa G, De Felici M, Salustri A. 1985. The proliferative and meiotic history of mammalian female germ cells. Pages 253-297 in Metz C, Monroy A, editors. *Biology of Fertilization*. Academic Press, Orlando.

Smitz J, Cortvrindt R. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* **123**:185-202.

Sohal R, Dubey A. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* **16**:621-626.

Song Z, Ng M, Lee Z, Dai W, Hagen T, Moore P, Huang D, Deng L, Tan C. 2014. Hydrogen sulfide donors in research and drug development. *Medicinal Chemistry Communications* **5**:557-570.

Srilatha B, Adaikan P, Li L, Moore P. 2007. Hydrogen sulphide: a novel endogenous gasotransmitter facilitates erectile function. *The journal of sexual medicine* **4**:1304-1311.

Stipanuk M, Beck P. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal* **206**:267-277.

Stojkovic M, Motlik J, Kolle S, Zakhartchenko V, Alberio R, Sinowatz F, Wolf E. 1999. Cell-Cycle Control and Oocyte Maturation: Review of Literature. *Reproduction in Domestic Animals* **34**:335-342.

Stone J, Marletta M. 1994. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **33**:5636-5640.

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**:781-787.

Sun Q, Lai L, Park K, Kuhholzer B, Prather R, Schatten H. 2001. 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**:879–889.

Sun Q, Breitbart H, Schatten H. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development* **11**:443-450.

Su Y, Eppig J. 2002. Evidence that multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM KII) participates in the meiotic maturation of mouse oocytes. *Molecular reproduction and development* **61**:560-569.

Szollosi D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *American Journal of Anatomy* **130**:209-225.

Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. 2013. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **39**:1431–1439.

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

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, Ten J, Vendrell F, Cano A. 1998. Dithiothreitol prevents age-associated decrease in oocyte/conceptus viability in vitro. *Human Reproduction* **13**:381-386.

Tatone C, Amicarelli F, Carbone M, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini P, Piomboni P, Focarelli R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human reproduction update* **14**:131-142.

Tatone C, Di Emidio G, Barbaro R, Vento M, Ciriminna R, Artini P. 2011. Effects of reproductive aging and postovulatory aging on the maintenance of biological competence after oocyte vitrification: insights from the mouse model. *Theriogenology* **76**:864-873.

Teague B, Asiedu S, Moore P. 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.

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

Tenhunen R, Marver H, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **244**:6388-6394.

Tiwari M, Prasad S, Pandey A, Premkumar K, Tripathi A, Gupta A, Yadav P, Shrivastav T, Chaube S. 2017. Nitric oxide signaling during meiotic cell cycle regulation in mammalian oocytes. *Frontiers In Bioscience* **9**:307-318.

Treves S, Trentini P, Ascanelli M, Bucci G, Di Virgilio F. 1994. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Experimental cell research* **211**:339-343.

Tsiftoglou A, Tsamadou A, Papadopoulou L. 2006. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacology & therapeutics* **111**:327-345.

Turkseven S, Drummond G, Rezzani R, Rodella L, Quan S, Ikehara S, Abraham N. 2007. Impact of silencing HO-2 on EC-SOD and the mitochondrial signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry* **100**:815-823.

Ubuka T, Umemura S, Yuasa S, Kinuta M, Watanabe K. 1978. Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiological chemistry and physics* **10**:483-500.

Vaccari S, Weeks J, Hsieh M, Menniti F, Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of reproduction* **81**:595-604.

Van Den Brink G, Bloemers S, Van Den Blink B, Tertoolen L, Van Deventer S, Peppelenbosch M. 1999. Study of Calcium Signaling in Non-Excitable Cells. *Microscopy research and technique* **46**:418-433.

Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* **7**:2006-2022.

Vantéry C, Gavin A, Vassalli J, Schorderet-Slatkine S. 1996. An accumulation of p34' at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Developmental biology* **174**:335-344.

Verlhac M, De Pennart H, Maro B, Cobb M, Clarke H. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental biology* **158**:330-340.

Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman H, Banerjee R. 2006. functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **281**:35785-35793.

Wang C, Machaty Z. 2013. Calcium influx in mammalian eggs. *Reproduction* **145**:97-105.

Wang K et al. 2013. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase 72 contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* **127**:2514-2522.

Wang Q, Sun Q. 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development* **19**:1-12.

Wang RUI. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB journal* **16**:1792-1798.

Wang W, Sun Q. 2006. Meiotic spindle, spindle checkpoint and embryonic aneuploidy. *Front Biosci* **11**:620-636.

Wassarman P. 1988. The Mammalian Ovum. Pages 69-102 in Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

Webster S, de Wreede R. 2012. *Embryology at a Glance*. John Wiley&Sons, Chichester.

Wei H, Zhang C, Jin H, Tang C, Du J. 2008. Hydrogen sulfide regulates lung tissue oxidized glutathione and total antioxidant capacity in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *Acta Pharmacologica Sinica* **29**:670-676.

West A, Oates P. 2008. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *Journal of gastroenterology and hepatology* **23**:150-158.

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

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev* **87**:1-28.

Wong E. 2020. *Cells: Molecules and Mechanisms*. Axolotl Academic Publishing, Louisville. Available from [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Cells_-_Molecules_and_Mechanisms_\(Wong\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Cells_-_Molecules_and_Mechanisms_(Wong)) (accessed October 2020).

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

Yadav P, Banerjee R. 2012. Detection of Reaction Intermediates during Human Cystathionine γ -Synthase-monitored Turnover and H₂S Production. *Journal of Biological Chemistry* **287**:43464-43471.

Yadav P, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R. 2013. Structure and Kinetic Analysis of H₂S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *Journal of Biological Chemistry* **288**:20002-20013.

Yanagimachi R. 1988. Mammalian Fertilization. Pages 135-185 in Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. Pages 189-317 in Knobil E, Neil J, editors. *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press, New York.

Yang G et al. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science* **322**:587-590.

Yoshida T, Kikuchi G. 1978. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **253**:4224-4229.

Zamboni L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biology of Reproduction* **2**:44-63.

Zanardo R, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace J. 2006. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB journal* **20**:2118-2120.

Zhang N, Wakai T, Fissore R. 2011. Caffeine alleviates the deterioration of Ca²⁺ release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs. *Molecular reproduction and development* **78**:684-701.

Zhang X, Shan P, Otterbein L, Alam J, Flavell R, Davis R, Choi A, Lee P. 2003. Carbon Monoxide Inhibition of Apoptosis during Ischemia-Reperfusion Lung Injury Is Dependent on the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway and Involves Caspase 3*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:1248-1258.

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

Zhou Q, Renard J, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* **302**:1179.

Zhu J, Zhang J, Li H, Wang T, Zhang C, Luo M, Tan J. 2015. Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas Ligand in mice. *Scientific reports* **5**:1-8.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1 · cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* **274**:11549-11556.