

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Expresse enzymů produkujících sulfan v závislosti na
stádiu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro*
podmínkách**

Diplomová práce

Autor práce: Eva Březinová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Exprese enzymů produkujících sulfan v závislosti na stádiu meiotického zrání prasečích oocytů v in vitro podmínkách" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5. 4. 2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi Ph.D. za spolupráci, ochotu a pomoc při tvorbě mé diplomové práce.

Expresse enzymů produkujících sulfan v závislosti na stádiu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách

Souhrn

S rozvojem biotechnologických metod, jejichž využití stále roste, je nutné rozvíjet také znalosti, které se týkají využívaného biologického materiálu. Pro rozvoj reprodukčních biotechnologií je klíčový dostatečný počet kvalitních oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách. Podmínkou tohoto požadavku, je optimalizace podmínek v průběhu kultivace oocytů.

Vytvořit oocytům takové podmínky, aby jich po kultivaci bylo použitelných maximální možné množství, nejde bez důkladné znalosti průběhu zrání a mechanismů, které tento proces řídí. V současnosti nelze tvrdit, že by byl proces vývoje oocytu uspokojivě objasněn. Neustále jsou publikovány výsledky, které tento proces odhalují. Jedním z faktorů, o kterém je známo, že se podílí na průběhu meiotického zrání je H₂S, plynná molekula enzymaticky uvolňovaná přímo v buňkách.

Na základě dostupných informací byla stanovena hypotéza, že v oocytech jsou přítomné enzymy odpovědné za endogenní produkci H₂S a že tato molekula plní fyziologickou úlohu během meiotického zrání oocytů. Cílem práce tak bylo zhodnotit expresi enzymů produkujících H₂S a jeho vliv na průběh meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách.

V experimentu byly použity prasečí COCs, které byly kultivovány v různě modifikovaných kultivačních médiích a následně podrobeny analýzám RT-PCR, imunocytochemické lokalizaci proteinů a analýze obrazu. Z výsledků je patrné, že enzymy uvolňující H₂S, cystathionin beta-syntáza (CBS), cystathionin gama-lyáza (CSE) a 3-merkaptopyruvát sulfur-transferáza (3-MPST), jsou přítomné ve zrajících oocytech a kumulárních buňkách prasete a podílí se na adekvátním průběhu meiotického zrání oocytů.

Mechanismus účinku H₂S však ještě není objasněn a pro jeho objasnění je proto zapotřebí dalších experimentů.

Klíčová slova: gasotransmitter, hydrogen sulfid, oocyt, meiotické zrání

Expression of hydrogen sulfide producing enzymes in dependence on meiotic maturation stage of porcine oocytes *in vitro* conditions

Summary

With the development of biotechnological approaches, the knowledge of using biological material is necessary. Therefore, sufficient number of quality oocytes matured *in vitro* is a key for biotechnology advances. The optimization of culture conditions is important for oocyte maturation success.

For obtaining of maximal number of quality maturation oocytes is necessary knowledge the process of maturation and mechanisms which drive it. Currently, process of oocytes development remains fully unexplained. Recent papers are focused on describing this phenomenon. One factor which is known to be involved during meiotic maturation is H₂S, enzymatically released gaseous molecule directly in the cell.

Based on available information, we hypothesized that oocytes involve enzymes responsible for the endogenous production of H₂S and that this molecule fulfills physiological role during meiotic maturation of oocytes. Aim of this study was to evaluate the expression of enzymes that produce H₂S and the influence H₂S on the course of meiotic maturation of pig oocytes *in vitro*.

Porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) were used for mentioned experiments. COCs were cultivated in modified M19 medium and subsequently subjected to analysis by RT-PCR, immunocytochemical localization of proteins and image analysis. The results show that the H₂S-releasing enzyme, cystathionine beta-synthase (CBS), cystathionine gamma-lyase (CSE) and 3-merkaptopyruvát sulfur-transferase (3-MPST) are present in immature, maturing and matured oocytes. Simultaneously, these enzymes participate in meiosis re-initiation and meiotic maturation of pig oocytes.

Despite of obtained results, the mechanism of H₂S action is not yet fully understood. Further experiments are needed for H₂S evaluation in early embryonic development including its molecular action.

Keywords: gasotransmitter, hydrogen sulfide, oocyte, meiotic maturation

Obsah:

1. Úvod	7
2. Hypotéza a cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1. Oogeneze	9
3.1.1. Vývoj oogonií a primordiálního folikulu	10
3.1.2. Růst oocyty a folikulogeneze	12
3.1.3. Fáze zrání a meiotická kompetence	15
3.2. Mechanismus řízení meiotického zrání	18
3.2.1. cAMP (cyklický adenosin 3´5´monofosfát)	19
3.2.2. cGMP (cyklický guanosin 3´5´monofosfát)	20
3.2.3. CDK (cyklin dependentní kinázy)	21
3.2.4. MPF (<i>M-phase Promoting Factor</i>)	21
3.2.5. MAPK (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)	23
3.2.6. Gasotransmitter- H ₂ S	24
4. Materiály a metodika	27
4.1. Izolace a zrání oocytů <i>in vitro</i>	27
4.2. Hodnocení zrání oocytů	27
4.3. Analýza mRNA pomocí RT-PCR	28
4.4. Imunocytochemická lokalizace proteinů a analýza obrazu	30
4.5. Statistická analýza	30
5. Výsledky	31
5.1. Přítomnost mRNA CBS, CSE a 3-MPST v COCs prasete kultivovaných v <i>in vitro</i> podmínkách	31
5.2. Distribuce CBS, CSE a 3MPST v závislosti na průběhu meiotického zrání prasečích oocytů	37
5.3. Úloha CBS, CSE a 3-MPST v procesu znovu zahájení a úspěšnosti meiotického zrání prasečích oocytů	43
6. Diskuze	50
7. Závěr	53
8. Literární zdroje	54

1. Úvod

Důležitou součástí chovu hospodářských zvířat je ekonomika chovu. Jedním z hlavních předpokladů je užitkovost zvířat determinovaná úspěšnou reprodukcí. Vedle přirozených metod, které nám umožňuje šlechtění a mezi něž patří selektivní výběr vhodných rodičovských párů, se již delší čas uplatňují také metody biotechnologické. Biotechnologické metody nám umožňují získat od geneticky nejlepších jedinců více potomků, než které by byli schopni poskytnout přirozenou plemenitou. Součástí biotechnologických metod a jejich dalšího rozvoje je odběr oocytů a jejich kultivace v *in vitro* podmínkách.

Na vývoj oocytů v těle samice působí mnoho vlivů. Tyto vlivy se podílejí na tvorbě takových podmínek, ve kterých je oocyt schopen dozrát, prodělat oplodnění a následně vývoj v nového životaschopného jedince. V případě jakéhokoli narušení těchto optimálních podmínek dochází k jeho zániku. Nutností při odběru a kultivaci oocytů *in vitro* tak je vytvořit takové podmínky, aby se mohly oocyty plnohodnotně vyvíjet. Podstatnou součástí této snahy je podrobná znalost průběhu procesu vývoje zrajícího oocyty. A to nejen změn, které oocyt prodělává, ale především vlivů, které tyto změny vyvolávají a ovlivňují.

Mezi mnoha činiteli, kteří ovlivňují proces vývoje vajíčka, zaujímá významné postavení sulfan (H_2S). Jedná se o plynnou signální molekulu, která se vedle oxidu uhelnatého (CO) a oxidu dusnatého (NO), řadí mezi gasotransmitery. H_2S je uvolňován přímo v buňkách pomocí enzymů CBS, CSE a 3-MPST. V posledních letech byl studiem prokázán vliv H_2S na různé tělní buňky, v nichž plní důležitou fyziologickou funkci, včetně reprodukce. Přítomnost a úloha enzymů uvolňujících H_2S dosud nebyla odhalena a lze předpokládat, že signální molekula H_2S pomocí těchto enzymů sehrává důležitou roli v procesu meiotického zrání oocytů.

2. Hypotéza a cíl práce

Byla stanovena hypotéza, že v prasečích oocytech jsou přítomny enzymy uvolňující H₂S, CBS, CSE a 3-MPST a plní fyziologickou úlohu během zrání oocytů.

Cílem diplomové práce je:

- a) prokázat přítomnost mRNA CBS, CSE a 3-MPST v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete;
- b) zhodnotit distribuci CBS, CSE a 3-MPST v závislosti na průběhu meiotického zrání prasečích oocytů;
- c) zhodnotit úlohu CBS, CSE a 3-MPST v procesu znovu zahájení a úspěšnosti meiotického zrání prasečích oocytů.

3. Literární rešerše

3.1. Oogeneze

Oogeneze je proces, během kterého dochází ke vzniku pohlavních buněk-gamet. Celý proces oogeneze v sobě zahrnuje několik stádií vývoje. Jedná se o fázi množení, růstu a zrání. Proces oogeneze je započat před narozením, v době embryonálního vývoje samice. Následně je proces oogeneze ve fázi růstu, ještě před narozením plodu, zastaven. Fáze růstu a zrání je pak znovu zahájena po dosažení puberty. Následně se pravidelně opakuje v periodách zvaných pohlavní cyklus. Toto trvá až do konce funkční činnosti vaječnicků - klimaktéria (Wassarman, 1988).

Vyvíjející se gameta je tvořena jednou pohlavní buňkou a větším počtem buněk somatických. Tyto somatické buňky obklopují oocyt a nazývají se buňky folikulární. Celek tvoří útvar zvaný folikul. Průběh vývoje folikulu se označuje jako folikulogeneze. V průběhu oogeneze tak dochází k současnému vývoji oocytu a folikulárních buněk. Folikulární buňky jsou nezbytné pro přeměnu oocytu v oplození schopnou samičí gametu. Během vývoje folikulu se folikulární buňky intenzivně dělí a diferencují a významně ovlivňují celý proces oogeneze (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998; Sawyer *et al.*, 2002).

V průběhu oogeneze dochází v oocytu ke dvěma typům jaderného dělení. Jsou jimi dělení mitotické a meiotické. Mitotické dělení probíhá ve fázi množení a představuje opakované dělení prvopohlavních buněk, ze kterých se zanořením do kůry vaječnicků stávají buňky zvané oogonie, které se v kůře vyvíjejícího se vaječnicku dále mitoticky dělí (Freeman, 2003). Oogonie, které prodělaly poslední mitózu, začínají intenzivněji růst a mění se na oocyty.

Druhý typ dělení, meiotické dělení, následuje po mitotickém dělení a začíná již v embryonálním vývoji plodu během růstové fáze oocytu. Meiotické dělení se skládá ze dvou po sobě následujících redukčních dělení, při kterých vznikají buňky s polovičním počtem chromozomů- pohlavní buňky (1n). Při meiotickém dělení oocytu dochází k asymetrickému dělení cytoplazmy. Z jednoho oocytu tak vzniká jedna pohlavní buňka a dvě pólová tělíška. Meiotické dělení oocytu neprobíhá jako ucelený jednolitý proces. Celý proces meiózy je ve svém průběhu několikrát zastaven a dokončen je pouze u oplodněných oocytů. K prvnímu přerušení meiotického dělení, k tzv. 1. meiotickému bloku, dochází ještě během embryonálního vývoje. Tento blok přetrvává i několik let až do dosažení puberty. V důsledku

hormonální regulace dochází ke stimulaci růstu oocyty a až po dosažení konečné velikosti k prolomení tohoto bloku a ke znovuzahájení meiotického dělení krátce před ovulací. Další průběh meiotického dělení trvá jen krátce. Dochází k dalšímu spontánnímu přerušení v 2. meiotickém bloku. V této fázi je oocyt ovulován a vyplaven do nálevky vejcovodu, kde je předurčen k oplození (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998; Sawyer *et al.*, 2002).

3.1.1. Vývoj oogonií a primordiálního folikulu

Vývoj samičích gamet začíná již v prenatalním vývoji z primordiálních zárodečných buněk (PGCs – primordial germ cells) endodermálního původu. PGCs vznikají přeměnou v prvostřevu a žloutkovém váčku z nediferencovaných buněk epiblastu již během gastrulace embrya (Wassarman, 1988). Přeměny buněk z nediferencovaných na PGCs se účastní celá řada faktorů, jako jsou: transformační růstový faktor (TGF β - transforming growth factor) a morfogenické faktory (BMP-4, BMP-8b a BMP-2 - bone morphogenetics proteins) (Ying *et al.*, 2001).

PGCs se přesouvají a usídlují v místě vznikající pohlavní lišty. V tomto místě se postupně vytvoří budoucí gonády (Wassarman, 1988). U prasat se PGCs nachází na pohlavní liště už 24. den embryonálního vývoje (Bielanska-Osuchowska, 2006). Již během přesunu se PGCs několikanásobně mitoticky dělí a tím zvětšují svůj počet (Freeman, 2003). Migrace PGCs do pohlavní lišty probíhá na základě chemotaxe za pomoci c-Kit ligandu, který je produkován somatickými buňkami v místech, kudy PGCs migrují (Logan *et al.*, 2003). Energií potřebnou k přesunu získávají PGCs z lipidových kapének a glykogenových partikulí přítomných v cytoplazmě PGCs (Motta *et al.*, 1997).

Po vývoji vaječnicků se PGCs zanořují do jejich kůry. A v kůře vaječnicků probíhá jejich další vývoj. U prasat se PGCs zanořují do kůry vaječnicků 40. den embryonálního vývoje (Picton *et al.*, 1998). V kůře se dále intenzivně mitoticky dělí a tím zvětšují svůj počet. Jejich množství narůstá z 5 000 až na 1 100 000 (Hunter, 2000). Vzniká tak velké množství buněk, které se dále označují jako oogonie. Jejich mitotická aktivita, však trvá pouze několik dní (Wassarman, 1988).

Oogonie tvoří shluky, v nichž jsou buňky navzájem propojeny intracelulárními cytoplazmatickými můstky, které slouží k transportu malých molekul, sloužících ke

komunikaci mezi buňkami (Bielanska-Osuchowska, 2006). S postupujícím vývojem se mezi shluky oogonií začnou vnořovat somatické buňky, které pochází buď z mezonefros nebo z epitelových buněk povrchu vaječníku (Sawyer *et al.*, 2002). Tyto somatické buňky, zvané pre-granulózní buňky, se mitoticky dělí a diferencují. Postupně tak vytvoří okolo oogonií jednovrstevný obal plochých buněk (Sládeček, 1986). Tyto buňky se významně podílí na dalším vývoji oocyty (Motlik a Fulka, 1986).

Jakmile jsou oogonie obaleny vrstvou plochých pre-granulózních buněk, stávají se z nich oocyty I. řádu – primární oocyty, celý komplex je nazýván jako primordiální folikul (Bielanska-Osuchowska, 2006). V průběhu prvních stádií vývoje oocyty z PGCs mnoho oocytů atreticky zaniká (Wassarman 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006). Z původního počtu PGCs se do tohoto vývojového stádia dostane jen okolo 40%, to je asi 500 000 oocytů (Guthrie *et al.*, 2001). Současně s přeměnami oogonií na oocyty dochází k postupným změnám struktury a počtu organel v cytoplazmě oocyty. Zvyšuje se počet mitochondrií, membránových struktur, lyzozómů a zvětšuje se endoplazmatické retikulum (Wassarman, 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006). Jádro oocyty je umístěno centrálně a lze okolo něj pozorovat už jen málo endoplazmatických retikul. V blízkosti jaderné membrány se nachází krátké kompaktní bivalenty chromozómů (Bielanska - Osuchowska, 2006).

Mechanismus řízení přeměny oogonií v oocyty dosud není zcela přesně objasněn (Garrett *et al.*, 1999). Mezi faktory, které v této přeměně hrají roli, patří: ligand c-Kit, který se spolu s růstovým faktorem (IGF-1 - insuline-like growth faktor) podílí na zahájení meiózy (McNatty *et al.*, 2000). A na regulaci velikosti oocyty se podílí transkripční faktor (AhR - aryl-hydrocarbon receptor) (Logan *et al.*, 2003).

Část oogonií nepodléhá dalšímu vývoji a přetrvává u samic až do dospělosti a slouží jako zdroj oocytů v adultní fázi ontogeneze. Podle dříve uznávané teorie se zárodečné buňky množí pouze v období prenatalního vývoje samice. Toto tvrzení ovšem vyvrátili Johnson *et al.* (2004), kteří potvrdili, že nejen vaječníky mladých, ale i dospělých samic obsahují mitoticky aktivní zárodečné buňky sloužící jako zdroj oocytů za oocyty, které podlely atrezií (Johnson *et al.*, 2004).

3.1.2. Růst oocyty a folikulogeneze

Fáze růstu oocyty a folikulogeneze jsou dva procesy, které probíhají současně. Před zahájením fáze růstu se celý komplex oocyty a pregranulóznic buněk nachází ve fázi primordiálního folikulu (Wassarman et Albertini, 1994). Stimulem pro zahájení růstu oocyty a procesu folikulogeneze je vzestup hladiny hypofyzárních hormonů během puberty samice (Wasserman, 1988; Hunt *et* Hassold, 2008). Vlivem těchto stimulů dochází ke zvětšování objemu folikulu. Probíhá intenzivní růst oocyty a proliferace pre-granulóznic buněk (Van den Hurk *et al.*, 1997; Wassarman, 1988).

Primordiální folikul, vzniklý obalením ogonií somatickými buňkami, je tvořen pohlaví buňkou (primárním oocytem) a plochou vrstvou pre-granulóznic buněk. Pre-granulózní buňky se postupně zvětšují a mění se na buňky kubické - granulózní (Picton *et al.*, 1998; Bielanska-Osuchowska, 2006). Vzniklý útvar, tvořený oocytem I. řádu (primárním oocytem) a kubickými granulózními buňkami se nazývá primární folikul (Sládeček, 1986; Wassarman, 1988). Jakmile proliferující granulózní buňky vytvoří okolo primárního oocyty vícevrstevný obal, mění se primární folikul na rostoucí sekundární folikul (preantrální folikul). Tyto folikuly dosahují velikosti 300 μm , přičemž oocyt dosahuje velikosti 90 μm (Van den Hurk *et al.*, 1997).

Současně s vývojem folikulárních buněk dochází k růstu oocyty. Oocyt podléhá intenzivním růstovým změnám. Změny se týkají také stavby a struktury organel a tvořených proteinů. V oocyty dochází k přibývání buněčných organel a jejich organizační přeměně, zvětšování jádra, syntéze RNA a nových proteinů, hromadění žloutkových inkluzí a akumulaci membránových váčků, granul glykogenu, proteinů, lipidů a multivezikulárních tělísek (Wassarman, 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006). Hromadění látek je nezbytnou součástí této fáze vývoje. Protože pouze oocyt, který obsahuje dostatečné množství zásobních látek, je schopen pokračovat v dalším vývoji. Získává tzv. meiotickou kompetenci, tj. schopnost znovu zahájit meiotické dělení zastavené 1. meiotickým blokem (Bielanska-Osuchowska, 2006). Schopnost znovu rozběhnout meiotické dělení mají pouze plně dorostlé oocyty označované jako GV (germinal vesicle) (Wassarman, 1988).

Během fáze růstu a procesu vývoje folikulu, dochází na folikulu k několika významným změnám, týkajících se jeho stavby. Jednou ze změn, je vznik zóny pellucidy (*zona pellucida*). Což je vrstva, která tvoří obal oocyty. Zóna pellucida je tvořena třemi typy glykoproteinů (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998). Jedná se o glykoproteiny ZP1, ZP2 a ZP3. Protein

ZP1 tvoří prostorovou síť a funguje jako propojovací článek mezi ZP2 a ZP3. ZP2 funguje jako sekundární receptor a ZP3 je primárním receptorem, na který se během procesu fertilizace váže spermie (Yanagimachi, 1994; Picton *et al.*, 1998). Navázáním spermie na receptor ZP3 dochází ke spuštění akrozomální reakce (Yanagimachi, 1994). *Zona pellucida* slouží oocyту jako membrána. Sprostředkovává komunikaci mezi oocytem a jeho okolím a slouží jako ochrana oocyту (Soyal *et al.*, 2000). Komunikace je zajištěná prostřednictvím mezibuněčných spojů gap junction. Spojení umožňuje volný pohyb látek z kumulárních buněk do oocyту, aniž by musely látky procházet přes extracelulární matrix (Ganong, 2005).

Další významnou změnou, ke které dochází během fáze růstu oocyту, je vznik thékální vrstvy (sklovitá blanka). Ta je vazivového původu a obklopuje celý folikul. Thékální vrstva je tvořena dvěma vrstvami. Jsou jimi vnější thékální vrstva (*theca folliculi externa*) a vnitřní thékální vrstva (*theca folliculi interna*) (Van den Hurk *et al.*, 1997). Mezi tyto dvě vrstvy během růstu folikulu prorůstají krevní kapiláry, které přivádí s krví endokrinní faktory. Ty se významně podílí na dalším procesu vývoje oocyту (Van den Hurk *et al.*, 1997). Faktor, který pravděpodobně ovlivňuje vývoj krevních kapilár mezi vrstvami théky během folikulogeneze je růstový faktor fibroblastů (FGF-2 - fibroblast growth factor), který byl lokalizován v buňkách théky (Garrett *et Guthire*, 1999).

Taktéž celý proces růstu oocyту a folikulogeneze je řízen řadou faktorů. Tento vývoj primárních a následně sekundárních folikulů z folikulů primordiálních je řízen rovnováhou mezi inhibičními a stimulačními faktory, které tento proces zprostředkovávají. Tedy faktory, které tento vývoj buď tlumí, nebo spouštějí. Jejich správný poměr je nezbytný pro vývoj folikulu, který je schopný prodělat další fyziologický vývoj (Picton *et al.*, 1998; Durlinger *et al.*, 2002).

Do udržení rovnováhy je zapojeno velké množství faktorů. Faktor, který pravděpodobně kontroluje zahájení vývoje primárního folikulu, se nazývá aktivin A. Aktivin A byl objeven v oocyту a granulózních buňkách (Hulshof *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001). Do regulace vývoje primárního oocyту jsou dále zapojeny Wilmsův nádorový protein (WT-1 (- wilms tumor protein) (Sadovski *et Dorn*, 2000), růstový faktor (BMP - bone morfologic factor), růstový diferenciacní faktor (GDF-9 - growth differentiation factor) (Bodensteiner *et al.*, 1999) a epidermální růstový faktor (EGF - epidermal growth factor) (Eppig *et O'Brien*, 1996; Silva *et al.*, 2003; Wandji *et al.*, 1996). V jádru oocyту dochází k expresi dvou proteinů, retinoblastu a onkogenu myc, které stimulují sekreci inhibičních faktorů bránících proliferaci

granulózních buněk (Picton *et al.*, 1998). V granulózních buňkách byl detekován steroidní faktor (SF-1 – steroidogenic factor 1) (Logan *et al.*, 2003), který je pravděpodobně zodpovědný za expresi růstového faktoru zvaného Antimüllerův hormon AMH (Sadovski *et Dorn*, 2000). AMH plní při vývoji primárního oocytu stejnou funkci jako retinoblast a onkogen myc (Durlinger *et al.*, 2002).

Vývoj sekundárního folikulu je ovlivněn faktory, které byly zapojeny do vývoje folikulu již v dřívějších stádiích. Faktory GDF-9 a BMP-15, které jsou tvořeny v granulózních buňkách, ovlivňují syntézu c-kit ligandu v buňkách granulózy, který působí na zahájení meiózy. GDF-9 působí jako inhibitor a protein BMP-15 má stimulační funkci (McNatty *et al.*, 2000). Oba faktory SF-1 a WT-1 mají vliv na růst folikulu (Logan *et al.*, 2003). WT-1 je syntetizován převážně v granulózních buňkách. Oproti tomu SF-1 je syntetizován jak v buňkách granulózy, tak v buňkách théky (Sadovski *et Dorn*, 2000). Vedle funkce související s růstem folikulu SF-1 stimuluje syntézu AMH v granulózních buňkách. AMH stimuluje sekreci inhibičních faktorů a brání tak proliferaci buněk granulózy a snižuje citlivost receptorů pro FSH (folikulo-stimulační hormon) (Sadovski *et Dorn*, 2000; Durlinger *et al.*, 2002; Logan *et al.*, 2003). Dalším faktorem, který má vliv na utváření sekundárního folikulu je IGF-1 (Insulin Growth Factor). IGF-1 má stimulační vliv na proliferaci granulózní buňky a zvyšuje pravděpodobnost přežití buněk théky (Garrett *et Guthrie*, 1999). Faktorem, který má vliv na proliferaci granulózních buněk je aktivin A. Navíc ovlivňuje utváření antrální dutiny (Garrett *et Guthrie*, 1999). Mezi další faktory účastníci se vývoje oocyta a folikulogeneze patří růstové faktory, které se účastní růstu sekundárního folikulu. Mezi tyto růstové faktory se řadí EGF (Epidermal Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor) a FGF-7 (Fibroblast Growth Factor) (Van den Hurk *et al.*, 1997).

Faktory, které dále ovlivňují utváření folikulu, jsou tzv. endokrinní faktory. Jsou to látky, které se do folikulu dostávají s krví kapilární sítí mezi vrstvami théky (Van den Hurk *et al.*, 1997). Patří mezi ně gonadotropiny, nervový růstový faktor (NGF - nerve growth factor) a vazoaktivní intestinální peptid (VIP - vasoactive intestinal polypeptid) stimuluje vývoj folikulu (Van den Hurk *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000). Mezi gonadotropiny patří FSH a LH (luteinizační hormon) (Wassarman, 1988).

Při nedostatku faktorů, které zprostředkovávají růst sekundárního folikulu, dochází k jeho zániku (Van den Hurk *et al.*, 1997).

Během vývoje folikulu se na buňkách *theca folliculi interna* formují receptory, které slouží k navázání LH. Po navázání LH na receptor LH v *theca folliculi interna* dochází ke vzniku androgenů v thékálních buňkách (Winter *et al.*, 1975). Tyto androgeny putují do granulózních buněk a způsobují zde vznik receptorů pro FSH. FSH, který se naváže na svůj receptor v granulózních buňkách, stimuluje syntézu receptorů pro LH a mění androgeny na estrogény, které napomáhají tvorbě receptorů pro LH (Rani *et al.*, 1981). Estrogény a FSH vyvolávají v granulózních buňkách jejich růst a dělení (Lawrence *et al.*, 1980; Hillier, 1994).

FSH společně s estrogény stimuluje granulózní buňky k produkci sekretů, které způsobují oddělování buněk granulózy a vyvolávají tak vznik folikulární dutiny (*Antra*) (Wassarman, 1988). Gonadotropiny tak způsobují přeměnu rostoucího sekundárního folikulu na zralý antrální folikul (Murphy *et al.*, 1991). Antrální folikul je stádium folikulu před ovulací. Jedná se o zralý sekundární folikul, který je schopen dalšího meiotického dělení (Murphy *et al.*, 2001; Sadler, 2003).

Antrální folikul je tvořen dvěma typy granulózních buněk. Jeden typ buněk tvoří tzv. kumulární buňky obklopující oocyt. Tyto buňky tvoří vrstvu zvanou *corona radiata* v přímé blízkosti oocytu a nachází se na tzv. vejconosném hrbolku (Wassarman, 1988). V rámci tohoto uskupení jsou granulózní buňky s oocytem propojeny mezibuněčnými spoji, které jsou označovány jako gap-junction. Ty hrají významnou roli v komunikaci mezi oocytem a okolními buňkami (Eppig *et al.*, 1996). Duhým typem jsou granulózní buňky obklopující stěnu folikulu. Ty jsou označovány jako buňky murální. Antrální folikul je posledním stádiem vývoje folikulu. Následně dochází k jeho prasknutí a vyplavení oocytu spolu s *corona radiata* a folikulární tekutinou do nálevky vejcovodu. Tento proces je označován jako ovulace (Wassarman, 1988).

3.1.3. Fáze zrání a meiotická kompetence

K vývoji pohlavních buněk nestačí pouze změny, které se týkají růstu oocytu a folikulogeneze. Důležitou součástí procesu vývoje oocytu je fáze zrání. Fáze zrání je proces, během kterého dochází k meiotickému dělení. Cílem tohoto dělení je vytvořit ze somatické buňky, která obsahuje plný počet chromozomů – 2n, buňku pohlavní, která má poloviční počet chromozomů – 1n. (Wassarman, 1988).

Proces meiózy se skládá ze dvou po sobě následujících redukčních dělení. Prvnímu dělení předchází během S-fáze buněčného cyklu replikace DNA. To způsobí, že v buňce je dvojnásobný počet chromozomů. Tento počet je během prvního zracího dělení snížen na polovinu a během druhého dělení, kterému již replikace nepředchází vzniká buňka s polovičním počtem chromozomů (Wassarman, 1988). Průběh meiózy je u samic proces, jehož trvání je druhově specifické a závisí na délce ontogeneze a nástupu puberty (Lawrence *et al.*, 1980). V průběhu meiózy dochází dvakrát k jejímu zastavení. Vytváří se tzv. meiotický blok, který brání v jejím pokračování (Motlík *et al.*, 1984). K prvnímu zastavení meiózy dochází již v embryonálním vývoji samice (Wassarman, 1988).

Jakmile jsou oogonie obaleny pregranulózními buňkami, spouští se v nich proces replikace DNA a následné meiotické dělení (Wassarman, 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006). Během první fáze meiózy, tzv. profáze, oocyty prochází fázemi leptotene, zygotene, pachytene a diplotene (Picton *et al.*, 1998). Ve stádiu pachytene probíhá crossing-over a rekombinace genů. Ve stádiu diplotene jsou na chromozómech viditelná chiasmata, která jsou výsledkem crossing-overu. Kolem doby porodu jsou oocyty ve stádiu diplotene. V diplotenní fázi profáze prvního zracího dělení je meióza poprvé zastavena tzv. 1. meiotickým blokem (Hunter, 2000). Jádru se v tomto okamžiku nachází ve stádiu zárodečného váčku, GV (*Germinal Vesicle*). Je obklopeno kompaktní jadernou membránou a chromatin je rozptýlen okolo jádérka (Motlík *et al.*, 1976). Do tohoto okamžiku podstoupil oocyt fázi množení (mitotické dělení) a začátek fáze růstu (zvětšování objemu a ukládání zásobních látek) (Wassarman, 1988; Hunt *et al.*, 2008). K opětovnému spuštění meiózy pak dochází až během ovulace (Van den Hurk *et al.*, 2000).

V období mezi meiózou I. a meiózou II. dochází k růstu oocyty a celého folikulu. Pouze oocyt plně dorostlý je schopný znovu zahájit proces meiózy. Tato schopnost se označuje jako meiotická kompetence a proces meiotického dělení po jeho znovuzahájení jako meiotické zrání oocyty (Wassarman, 1988).

Důležitou součástí dosažení meiotické kompetence je hromadění komplexu p34^{cdc2}/cyklin B, označovaného jako M-fázi/zrání podporující factor (pre-MPF - M-phase/maturation promoting factor). V rostoucím oocyty je tento komplex hromaděn a udržován v inaktivní formě označované jako pre-MPF. Bez dostatečného množství pre-MPF nemůže dojít k opětovnému spuštění meiózy. Hromadění tohoto komplexu, je zastaveno při vzniku antrální dutiny v průběhu folikulogeneze. Od okamžiku zastavení proteosyntézy

podjednotek pre-MPF se vyvíjí aktivační schopnost komplexu (Kanayama *et al.*, 2002). Po dosažení aktivační schopnosti získává oocyt meiotickou kompetenci. V tomto okamžiku čeká oocyt na signál, který způsobí prolomení 1. meiotického bloku a znovuzahájení meiozy. Signálem pro potlačení meiotického bloku, je náhlé zvýšení hladiny LH v krvi. K tomuto zvyšování dochází v tzv. pulzačních vlnách (Wassarman, 1988). Tyto pulzační vlny vyvolávají meiotické zrání oocyty, prasknutí Graafova folikulu a následnou ovulaci (Van den Hurk *et al.*, 2000). Protože oocyt nemá receptory pro navázání LH, je nezbytná jeho komunikace s folikulárními buňkami, které tvoří vnitřní výstelku folikulu a disponují receptory pro LH, včetně kumulárních buněk, které obklopují oocyt a reagují na parakrinní stimulaci růstovými faktory (Wassarman, 1988). Komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami je zajištěna prostřednictvím mezibuněčných spojů typu gap- junction, přes které mohou procházet malé molekuly (Lawrence *et al.*, 1980).

V průběhu meiotického zrání dochází k úplnému prvnímu meiotickému dělení. Na začátku tohoto procesu lze na oocyty pozorovat rozpad jaderné membrány označovaný jako rozpad zárodečného váčku (GVBD - germinal vesicle breakdown) (Wassarman, 1988). Následně probíhá metafáze I, anafáze I a telofáze I (Kanagawa *et al.*, 1991). Mezi meiózou I a meiózou II je jen krátká interfáze, během níž nedochází k replikaci DNA (Kishimoto, 2003). Dalším krokem během meiotického zrání je profáze II a metafáze II, během které dochází k vydělení poloviny homologních chromozómů v podobě prvního pólového tělíska (Wassarman, 1988). V metafázi II opět dochází k zablokování meiózy a vzniká 2. meiotický blok (Yanagimachi, 1994). Následné prolomení 2. meiotického bloku a dokončení meiózy je závislé na tzv. aktivačním stimulu. Ten je za normálních podmínek zajištěn průnikem spermie do oocyty (Wassarman, 1988).

Pro úspěšný průběh a dokončení meiotického zrání jsou vedle dělení jádra nezbytné změny, které probíhají v cytoplazmě při tzv. cytoplazmatickém zrání. Toto zrání je podobně jako jaderné zrání kontrolováno prostřednictvím molekul produkovaných kumulárními buňkami. Mezi změny, ke kterým dochází během cytoplazmatického zrání a mají vliv na kvalitu zralého oocyty, patří: přeměna organel a cytoskeletu, transkripční aktivita a obsah cytoplazmatických faktorů (Hunter, 2000).

Důležitou roli mají v cytoskeletu kortikální granula lokalizovaná poblíž výběžků kumulárních buněk. Jedná se o granula odvozená od Golgiho aparátu obsahující

glykosaminoglykany, proteiny a enzymy. Exocytóza kortikálních granul během fertilizace zabraňuje polyspermii (Wang *et al.*, 1997).

Dalším důležitým jevem, bez kterého by oocyt nebyl schopen dozrát, je produkce extracelulární matrix v kumulárních buňkách. Tento proces je označován jako kumulární expanse (Wassarman, 1988). Oocyt je ve folikulu obklopen kumulárními buňkami, které v Graafově folikulu tvoří vejconosný hrbolík. Toto uskupení je označované jako kumulo-oocytární komplex (COC). V COC dochází v průběhu meiotického zrání působením LH k intenzivním biochemickým a strukturním změnám. Vlivem kumulárních buněk dochází v Graafově folikulu k syntéze složek extracelulární matrix (ECM). Prostřednictvím této syntézy dochází ke zvětšování COC, které je označované jako kumulární expanse (Dekel *et al.*, 1979). ECM je tvořena glykosaminoglykany (GAG), z nichž nejvíce zastoupeno je kyselina hyaluronová (Mlynářčiková *et al.*, 2009). Zvětšování COC vlivem nárůstu ECM vede k narušování spojů mezi oocytem a okolními buňkami. Tento komplex je pak držen pohromadě kyselinou hyaluronovou. (Wassarman, 1988). Podstatou narušení je mechanické oddalování kumulárních buněk. Možným vysvětlením je také uzavření gap- junction prostřednictvím fosforylace vyvolané interakcí CD44 – HA (hyaluronan) (Yokoo *et al.*, 2010). Vlivem porušení spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami dochází k omezení vlivu inhibičních faktorů pocházejících z umulárních buněk. Jako jsou cAMP, cGMP (Chen *et al.*, 1990). Omezení působení inhibičních látek na oocyt je nezbytné pro znovuzahájení meiotického zrání a GVBD (Šutovský *et al.*, 1994).

3.2. Mechanismus řízení meiotického zrání

Meiotické zrání je část procesu meiózy. Je to období od prolomení 1. meiotického bloku do vzniku druhého meiotického bloku. Stejně jako všechny procesy, které probíhají v živých organismech, je také proces meiotického zrání řízen mnoha regulačními faktory, které jsou většinou propojeny do signálních kaskád (Hunter, 2000).

Meiotické zrání je, jako většina procesů v organismu, řízen z mozku prostřednictvím gonadotropních hormonů FSH a LH (Gagong, 2005). Gonádotropní hormony se váží na kumulární buňky, které mají v cytoplazmatické membráně obsaženy receptory, na které se váží (Procházka *et al.*, 1998). Vazba gonadotropních hormonů na receptory kumulárních

buněk vyvolává tvorbu druhých poslů, kteří ovlivňují prolomení 1. meiotického bloku (Eppig, 2001).

Molekulární signalizace je zpravidla postavena na postupné aktivační fosforylaci kinázami. Výhodami signálních kaskád je jejich vzájemná zastupitelnost a amplifikace buněčného signálu. Mezi klíčové kinázy meiotického zrání patří MPF a MAPK. Na počátku těchto signálních kaskád stojí malé signální molekuly tzv. druzí poslové. Mezi molekuly druhých poslů patří cyklické nukleotidy cyklický adenosin monofosfát (cAMP - cyclic adenosine monophosphate) a cyklický guanosin monofosfát (cGMP - cyclic guanosin monophosphate) a ionty jako Ca^{2+} . Společnou vlastností těchto molekul je jejich schopnost prostupovat z kumulárních buněk do oocyty (Eppig, 2001). V současné době jsou intenzivně studovány skupinou molekul druhých poslů gasotransmitery. Gasotransmitery jsou jednoduché plynné molekuly se schopností buněčné signalizace a post-translační modifikace proteinů (Wang, 2002; Liang, 2006).

Mezi další látky, které mají vliv na průběh meiotického zrání, patří: protein kináza A (PKA - protein kinase A) (Kovo *et al.*, 2006), mitogen aktivující protein kináza (MAPK - mitogen activated protein kinase) (Norris *et al.*, 2009), epidermální růstový faktor (EGFR - epidermal growth factor receptor) (Panigone *et al.*, 2008), cytostatický faktor (CFS - cytostatic factor) (Masui *et al.*, 1971), anafázi podporující komplex (APC/C - anaphase promoting complex/cyclosome) (Norris *et al.*, 2009).

3.2.1. cAMP (cyklický adenosin 3'5' monofosfát)

Důležitou součástí všech procesů probíhajících v organismech, je schopnost tyto procesy řídit, tedy spustit a zastavit. V případě meiotického zrání je hlavním faktorem řídicím spuštění a zastavení MPF (Hund *et al.*, 2008).

Jedním z hlavních mechanismů, které udržují nízkou hladinu MPF a tak brání pokračování meiózy, je vysoká hladina druhého posla cyklického adenosin 3'5' monofosfátu cAMP. Vysoká hladina molekul cAMP udržuje MPF v neaktivní formě (Mehlmann, 2005). Deaktivaci MPF způsobuje cAMP aktivací protein kinázy A (PKA). PKA aktivuje kinázu WEE1, která funguje jako inhibitor CDC2. Dále PKA inaktivuje fosfatázu CDC25 (cell division cycle 25 phosphatase), která je aktivátorem CDC2 (Kovo *et al.*, 2006).

Zásoba cAMP důležitého pro udržení meiotického bloku je tvořena v oocytu (Jaffe *et Norris*, 2010). Endogenní produkce cAMP je výsledkem složité signální kaskády, která začíná podrážděním G-proteinového receptoru na plazmatické membráně oocytu. Tím je aktivován Gs protein, který aktivuje adenylát cyklázu (AC). AC je enzym, který je zodpovědný za syntézu cAMP (Mehlmann, 2005; DiLuigi *et al.*, 2008).

3.2.2. cGMP (cyklický guanosin 3'5' monofosfát)

Pro udržení prvního meiotického bloku je důležitá nejen vlastní produkce cAMP v oocytu, ale také mechanismy, které udržují hladinu cAMP na potřebné úrovni (Jaffe *et Norris*, 2010). Hladina cAMP je udržována pomocí signálních kaskád. Důležitou úlohu v těchto signálních kaskádách hrají buněčné spoje typu gap junction, které zprostředkovávají komunikaci mezi kumulárními buňkami a oocytem (Norris *et al.*, 2008).

Jednou z molekul šířících signál z granulózních buněk do oocytu přes spoje gap junction je cGMP (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). cGMP inhibuje v oocytu fosfodiesterázu A3 (PDEA3 - phosphodiesterasa A3), která je zodpovědná za metabolický rozklad cAMP. Tento mechanismus tak způsobuje udržení hladiny cAMP v oocytu na vyšší úrovni (Vaccari *et al.*, 2008).

cGMP je tvořen v granulózních buňkách. Signální kaskáda, která je zodpovědná za produkci cGMP, začíná v murálních buňkách folikulu sekrecí natriuretického peptidového prekurzoru typu 3 (NPPC - natriuretic peptide precursor type C). NPPC se váže na natriuretický peptidový receptor 2 (NPR2 - natriuretic peptide receptor 2), který je umístěn na granulózních buňkách. Tato vazba vyvolává expresi guanylát cyklázy (GC - guanylyl cyclase) v granulózních buňkách a následně tvorbu cGMP (Zhang *et al.*, 2012).

S nástupem puberty vlivem preovulačních změn hladiny LH v krvi, dochází k obnovení procesu meiozy. Tato změna je zprostředkována poklesem množství cGMP a následným snížením hladiny cAMP. Snížení množství cGMP v oocytu vede k nárůstu množství PDEA3, kterou cGMP inhibuje. PDEA3 tak způsobuje hydrolýzu cAMP a jeho pokles, který umožňuje aktivaci MPF. Pokles cAMP v oocytu způsobuje aktivaci CDC25 fosfatázy a následně dochází k potlačení inhibice CDC 2/cyklin B (Norris *et al.*, 2009).

Protože receptory pro LH jsou přítomny na granulózniích buňkách, je tento proces závislý na komunikaci mezi granulózniimi buňkami a oocytem. Mechanismy, které vedou k poklesu hladiny cGMP však dosud nejsou plně objasněny (Norris *et al.*, 2009).

3.2.3. CDK (cyklin dependentní kinázy)

Buněčný cyklus probíhající jak v somatických tak v pohlavních buňkách, je řízen především aktivitou cyklin dependentních kináz (CDK) (Wu *et Gerhart*, 1980). Tyto kinázy katalizují přenos fosfátové skupiny adenosintrifosfátu (ATP) na cílový protein (postraní řetězec aminokyseliny proteinu). CDK jsou v buňce přítomny po celou dobu trvání buněčného cyklu a jejich aktivita proto musí být řízena. Toto řízení je zajištěno podjednotkou CDK a to cyklinem (Alberts *et al.*, 1998). Cyklin ovlivňuje rychlost reakce i substrátovou specifitu CDK. Řízení meiózy je založeno především na množství CDK. Jejich degradace je zajištěna ubikvitin dependentní proteolýzou. Ubikvitin dependentní proteolýza je proces, během něhož se na N-konec CDK tzv. destrukční box naváže molekula ubikvitinu. Tím je CDK označena k následné destrukci v proeozómech (Hagting *et al.*, 1999).

V rozeznávání CDK hraje důležitou roli anafázi podporující complex (APC - anaphase-promoting complex) (Hagting *et al.*, 1999). APC a jeho koaktivátor CDH1 (APC^{CDH1}) udržuje nízkou hladinu MPF (M-phase promoting factor) prostřednictvím redukce množství cyklinu B v GV (cyklin B je složkou komplexu tvořící MPF) (Reis *et al.*, 2006).

3.2.4. MPF (M-phase/maturation promoting factor)

Meióza je u samic savců spuštěna již během embryonálního vývoje a ještě před narozením plodu je v diplotenní fázi profáze I. zráního dělení ve stádiu GV zastavena. Tento 1. meiotický blok trvá až do nástupu puberty (Hund *et Hassold*, 2008).

V této fázi, 1. meiotického bloku, hraje klíčovou roli nízká hladina komplexu CDC2/cyklin B, jinak zvaného jako M-fázi podporující faktor (MPF - M-phase promoting factor), který patří do rodiny CDK (Sagata, 1996). Vysoká hladina MPF naopak spouští meiotické zrání inaktivací prvního meiotického bloku (Hund *et Hassold*, 2008).

MPF je tvořen dvěma podjednotkami. První podjednotkou je katalytická cyklin dependentní kináza (CDK1, p34^{CDK2}) a druhou regulační podjednotkou je cyklin B. Cílovými proteiny MPF jsou proteinové komplexy zodpovědné za kondenzaci vlákna DNA a proteiny v jaderné membráně, které při fosforylaci umožňují rozpad jaderné membrány (GVBD) (Jones, 2004).

Řízení aktivity MPF probíhá nejčastěji pomocí degradace cyklinu B. Degradace cyklinu B je řízena APC a jeho koaktivátorem CDH1 (APC^{CDH1}). Degradace cyklinu B umožňuje dekonkondenzaci chromatinu a obnovení jaderné membrány (Reis *et al.*, 2006). Aktivita MPF je dále řízena působením kináz, které způsobují fosforylaci a defosforylaci CDK1. Kinázy WEE1/MYT1 fosforylují CDK1 a tak způsobují její inhibici. Fosfatáza CDC25 naopak způsobuje defosforylaci CDK1 a její aktivaci. Pro aktivaci CDK1 v MPF je tak nutná zvýšená aktivita CDC25 a snížená aktivita WEE1/MYT1 (Jones, 2004).

Mezi další faktory, které jsou zapojené do aktivace MPF, patří ionty Ca²⁺ (Petr *et al.*, 2001). Ionty hrají významnou roli především v časně fázi potlačení prvního meiotického bloku (Wassermann, 1988). Vlivem LH vln dochází k aktivaci fosfatázy C (PLC), která ovlivňuje nárůstu hladiny iontů Ca²⁺. Ionty Ca²⁺ modifikují některé molekuly v oocytu a ovlivňují tak jeho buněčný cyklus (Homa, 1995). Jedním z cílových molekul iontů Ca²⁺ je CaMKII (kalmodulin dependentní protein kináza). Tato kináza je schopna fosforylovat MPF, který je nezbytný pro obnovení meiotického zrání (Lorca *et al.*, 1993).

V meioticky nekompetentním oocytu se množství CDK1 příliš neliší od množství, které se vyskytuje v meioticky kompetentním oocytu. Rozdíl je pouze v jeho formě. Meioticky nekompetentní oocyt obsahuje fosforylovanou formu CDK1, která není schopná aktivovat MPF (Kishimoto, 2003). Oproti tomu v meioticky aktivním oocytu je CDK1 v defosforylované formě, která je schopna aktivovat MPF. Aktivace CDK1 je způsobena vlivem CDC25, přičemž fosfatáza CDC25 je řízena kinázou PLK (Polo-like kinase). Nezbytnou součástí aktivace MPF je dále syntéza cyklinu B (Stojkovic *et al.*, 1999).

Aktivita MPF se zvyšuje před kondenzací chromozomů a GVBD. Poté dochází k poklesu aktivity MPF čímž dochází k přechodu z metafáze I do anafáze I (Stojkovic *et al.*, 1999). K dalšímu nárůstu aktivity MPF dochází při vzniku druhého meiotického bloku na konci meiotického zrání. V tomto období se aktivita MPF zvyšuje a dosahuje maximální úrovně. Ke snížení této aktivity dochází během fertilizace při potlačení druhého meiotického bloku inaktivací MPF (Sun *et al.*, 2003).

Nízká hladina MPF, která po zahájení meiotického zrání klesá, je nahrazena mitogen aktivující protein kinázou (MAPK - mitogen activated protein kinase). MAPK přebírá v průběhu meiotického zrání funkci MPF. Další funkcí MAPK je uzavření gap junction, čímž dochází k aktivaci MPF (Dekel *et al.*, 1995).

3.2.5. MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

Dalším faktorem, který ovlivňuje meiotické zrání je MAPK. V organismu prasat jsou známy jeho dvě isoformy a to MAPK1 (ERK1) a MAPK2 (ERK2). Tato skupina kináz hraje klíčovou roli v řízení meiózy prostřednictvím fosforylace. Ovlivňují tak celou řadu procesů v průběhu meiotického zrání (Stojkovic *et al.*, 1999).

MAPK je aktivovaná signální kaskádou, která začíná aktivací MAPKKK (Mos) a Mos následně aktivuje MAPKK (Mek). Mek dále aktivuje MAPK prostřednictvím fosforylace serinových a treoninových zbytků (Matsuda *et al.*, 1992). K aktivaci MAPK dochází v době GVBD. Zda dochází k aktivaci MAPK dříve než k aktivaci MPF není plně objasněno a názory na tuto problematiku se rozcházejí (Inoue *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 2005). Aktivita MAPK zůstává po celou dobu meiotického zrání vysoká a snižuje se až po potlačení druhého meiotického bloku, vstupem oocyty do interfáze (Stojkovic *et al.*, 1999).

MAPK působuje aktivaci MPF prostřednictvím snížení množství cAMP. Jednou z cest, která vede k poklesu množství cGMP a tím pádem k poklesu cAMP a aktivaci MPF, je uzavření gap junction vlivem působení LH (Norris *et al.*, 2009). Indukční signály zprostředkované LH se přenášejí ze somatických buněk obklopujících oocyt do oocyty prostřednictvím aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF - epidermal growth factor receptor) (Conti *et al.*, 2006). Vazba LH na receptor v membráně granulóznic buněk vede k aktivaci G₃, který vede k produkci cAMP v granulóznic buňkách (Jaffe *et al.*, 2010). Vysoká hladina cAMP v granulóznic buňkách aktivuje PKA, který způsobuje aktivaci EGFR (Panigon *et al.*, 2008). Aktivace EGFR vede k aktivaci MAPK, které inhibují gap-junction (Panigon *et al.*, 2008). LH tak způsobuje aktivaci MAPK, které podporují fosforylaci connexinu 43 (hlavní ovariální gap junction protein). Tím dochází k poklesu propustnosti gap junction mezi murálními buňkami (Sela-Abramovich *et al.*, 2005). To způsobuje snížení množství cGMP, který proniká přes gap junction z granulóznic buněk do oocyty a způsobuje aktivaci MPF (Norris *et al.*, 2009). Přes narušené spoje gap junction

nemhou pronikat ani další inhibiční signály, které brání pokračování meiotického dělení (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

Další funkcí, kterou plní MAPK jsou ovlivnění tvorby a aktivity mikrotubulů, přenášení signálu z cytoplazmy do jádra a fosforylace inhibičních kináz, které fosforylují MPF (Inoue *et al.*, 1995). MAPK fosforyluje proteiny, které udržují chromatin kondenzovaný. To je důležité v době přechodu mezi první a druhou metafází. Cílem je zabránit vstupu oocyty do interfáze. MAPK tak přebírá funkci MPF, jehož aktivita po zahájení meiotického zrání klesá (Dekel *et al.*, 1995).

V posledních letech je studována signální kaskáda ovlivňující aktivaci MAPK, která v sobě zahrnuje působení jednoho z gasotransmiterů a to H₂S. H₂S se zde podílí na aktivaci Mek, která aktivuje MAPK (Zhao *et al.*, 2014).

3.2.6. Gasotransmitter H₂S

Správný průběh vývoje oocytů je nezbytný pro tvorbu dozrálých a oplození schopných vajíček (Wassermann, 1988). Správná znalost těchto procesů nám umožňuje regulovat proces zrání oocytů v podmínkách *in vitro*. Bylo zjištěno, že mezi molekuly, které jsou zapojeny do regulace vývoje oocyty, se řadí také molekuly gasotransmiterů. Po intenzivním studiu oxidu dusnatého (NO) v průběhu zrání a aktivace oocytů (Jablonka-Shariff *et al.*, 2000; Petr *et al.*, 2006; Chmelíková *et al.*, 2010) je v současné době studována úloha H₂S v těchto procesech (Liang *et al.*, 2006, 2007; Nevoral *et al.*, 2014; Krejčová *et al.*, 2015).

Do nedávna byl H₂S považován pouze za toxický plyn, s funkcí narušující dýchání (Guidotti, 1996). Následně však byla odhalena jeho fyziologická funkce v organismu (Kimura, 2010). Bylo zjištěno, že H₂S v nízkých koncentracích (50- 160 nM) (Furne *et al.*, 2001) ovlivňuje řadu biologických cílů a indukuje fyziologické procesy, jejichž mechanismy ještě nejsou plně objasněny (Kimura, 2010). Přítomnost H₂S byla zjištěna v nervové soustavě, hladko svalových buňkách a odhalena byla jeho přítomnost a zapojení do funkcí reprodukční soustavy u samců a samic (Srilatha *et al.*, 2006).

H₂S je plynná molekula, která může volně pronikat do buněk. V buňce je pak schopna ovlivňovat její metabolismus. V savčím organismu je H₂S produkován třemi enzymy. Ve většině tkání je tvorba H₂S řízena cystathionin beta-syntázou (CBS) a cystathionin gama-

lyázou (CSE) (Wang, 2002). Třetí enzym produkující H₂S byl objeven v mozku a je jím 3-merkaptopyruvát sulfur-transferáza (3-MPST) (Shibuya *et al.*, 2009). Enzymy CBS a CSE jsou zodpovědné za endogenní produkci H₂S v savčích tkáních, které využívají l-cystein jako substrát (Bukovská *et al.*, 1994; Ericsson *et al.*, 1990).

CSE a CBS hrají důležitou úlohu v reprodukci samic (Yang *et al.*, 2008). Patel *et al.* (2009) prokázali přítomnost enzymů CBS a CSE v děloze, plodových obalech a placentě. Liang *et al.* (2007) prokázali přítomnost CBS ve folikulárních buňkách, nikoli však v oocytu. Rovněž byla zjištěna zvýšená exprese CBS v komulo-oocytárních komplexech superovulovaných myší. Průběh exprese CBS naznačuje, že CBS funguje v průběhu zrání folikulu jako zprostředkovatel informací mezi oocytem a kumulárními buňkami. Potlačení exprese enzymu CBS v granulózních buňkách vede k inhibici meiotického zrání (Liang *et al.*, 2007)

CBS je hlavní enzym, který ovlivňuje metabolismus methioninu a ovlivňuje tak množství homocysteinu v buňkách. Nedostatečné množství CBS proto způsobuje hromadění homocysteinu v buňce – hyperhomocysteinémii (Quere *et al.*, 1999). Nadbytečné množství homocysteinu může mít cytotoxické účinky a narušovat oplozovací schopnost (Watanabe *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 2003). Vliv enzymu CBS na plodnost byl demonstrován se zablokovaným genem pro CBS. Důsledkem toho byly nižší počty rozvíjejících se folikulů a kratší a nepravidelný estrální cyklus (Guzmán *et al.*, 2006). Přítomnost homocysteinu byla zjištěna ve folikulární tekutině. Z toho lze usuzovat, že hladina homocysteinu, řízená expresí CBS, má vliv na vývoj oocytu (Ebisch *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2006).

H₂S má v průběhu vývoje oocytu regulační a ochrannou funkci (Snijder *et al.*, 2013). V posledních několika letech je studováno zapojení H₂S do procesů řídících průběh meiotického zrání. Bylo zjištěno, že H₂S se na tomto průběhu podílí procesem zvaným sulfhydratace. Sulfhydratace je děj při kterém je SH skupina proteinu nahrazena SSH skupinou. Tím dochází nejen ke změně struktury proteinu, ale především ke změně jeho funkčních vlastností. Dochází tak k ovlivňování metabolických procesů v buňce (Mustafa *et al.*, 2009). Pokusy byly dále zjištěn vliv H₂S na produkci hyaluronové kyseliny, která je hlavní složkou extracelulární matrix v průběhu kumulární expanze, která je taktéž nezbytná pro správný vývoj oplození schopných oocytů (Nevoral *et al.*, 2014).

Mezi protejny, které jsou prostřednictvím sulfhydratace díky H₂S indukovány, patří GDF-9. GDF-9 je růstový faktor, který je produkován somatickými buňkami vaječníků a

podílí se na růstu a zrání folikulu (McGrath *et al.*, 2009). Studium účinku H₂S byla odhalena jeho schopnost aktivovat signální kaskádu akt/PI3K, která je schopna ovlivňovat metabolismus buňky (Huang *et al.*, 2010).

Studiem pokusů zaměřených na funkci H₂S v endoteliálních buňkách, byla odhalena schopnost H₂S prostřednictvím sulfhydratace indukovat MEK1 (Zhao *et al.*, 2014). Z tohoto zjištění lze proto předpokládat, že k podobné aktivaci dochází také v průběhu vývoje oocyty, kde je MEK1 součástí kaskády vedoucí k aktivaci MPF a MAPK, klíčových kináz odpovědných za meiotické zrání (Kubelka *et al.*, 2000).

Současný stav poznání poukazuje na gasotransmitter sulfan jako důležitý regulátor procesů meiotického zrání. Přesto dosud nebyla prokázána přítomnost všech enzymů uvolňujících H₂S – CBS, CSE a 3-MPST, přímo v oocytech. Současně není prostudována exprese těchto enzymů na úrovni mRNA a kvantifikace množství proteinů v oocytech během meiotického zrání.

4. Materiály a metodika

4.1. Izolace a zrání oocyty *in vitro*

Vaječníky, ze kterých byly získávány oocyty, byly dováženy z jatek (Jatky Plzeň a.s.), kde byly odebírány od necyklujících prasnic a do laboratoře byly převáženy při teplotě 39°C. V laboratoři byly z ovariálních folikulů o velikosti 2-5 mm pomocí stříkačky a jehly (20G) aspirovány kumulo-oocytární komplexy (COCs). Pro experiment byly dále použity pouze oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktní vrstvou kumulárních buněk. Toto třídění probíhalo pomocí skleněné pipety pod stereomikroskopem.

Zrání vybraných COCs probíhalo v modifikovaném médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA), obohaceném o 32.5 mM bikarbonátu sodného, 2.75 mM laktátu vápenatého, 0.025 mg/ml gentamicinu, 6.3 mM HEPES, gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13.5 iu eCG: 6.6 iu hCG/ml (P.G.600; Intervet International B.V., Holland) a 5 % (v/v) fetálního hovězího séra (Sigma-Aldrich, USA). Kultivační médium bylo dále obohaceno současně o kyselinu oxamovou, DL- propargylglycin a kyselinu α - ketoglutarovou, specifické inhibitory CBS, CSE a 3-MPST. COCs byly kultivovány ve 4- jamkových Petriho miskách (Nunc, Denmark), které obsahovaly 1.0 ml kulturního média, při teplotě 39 °C a ve směsi vzduch s 5 % CO₂ , po dobu 16 - 48 hod.

4.2. Hodnocení zrání oocytů

Na konci kultivace byla do média M199 přidána 0.1 % hovězí testikulární hyaluronidáza (Sigma-Aldrich, USA) a úzkou skleněnou pipetou byly odstraněny kumulární buňky. Následně byly oocyty montovány na podložní sklíčko s vazelínou, přikryty krycím sklíčkem a fixovány v etanolu a kyselině octové (3:1 v/v) min. 48 hod. Poté byly oocyty barveny 1 % orceinem v 50 % vodném roztoku kyseliny octové a hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon, Japan). V souladu s publikovanými kritérii byly oocyty hodnoceny dle Motlíka *et* Fulky (1976) podle zastoupení ve skupinách podle stádií meiotického zrání: GV - zárodečný váček, LD - pozdní diakineze, MI - metafáze I, AITI - přechod anafáze I telophase I, MII - metafáze II.

4.3. Analýza mRNA pomocí RT-PCR

Vzorky pro RT-PCR analýzu CBS, CSE a 3-MPST byly připraveny z nezralých GV oocytů, zrajících MI oocytů (po 24 hod. kultivaci) a dozrálých MII oocytů (po 48 hod. kultivaci). Pro analýzu byly použity také kumulární buňky odstraněné z COCs. mRNA byla izolována pomocí NucleicAcid Prepstation 6100 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) v souladu s protokolem. Veškerá mRNA byla přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Soubory specifických primerů a fluorescenčně značených sond byly syntetizovány (Applied Biosystems) na základě známých sekvencí prasečího genomu; sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1. RT-PCR analýza byla provedena podle standardního Tag-Man PCR protokolu. Každá PCR reakce byla připravena třikrát v celkovém množství 10 μ l s 500 nM geneticky specifických primerů, 200 nM sond TafManMGB, 5 μ l 2x koncentrovaného reakčního pufru Fast TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 μ l cDNA a nuclear-free vody. Pro RT-PCR reakce byl použit přístroj 7500 Faster Real Time PCR system (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA) s programem: 95 °C po dobu 20 sec, následovalo při stejné teplotě 40x 2-sec. cyklů a 60 °C po dobu 20 sec. Hodnoty počtů cyklů, nutných pro syntézu definovaného množství DNA, byly přepočítány metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$ dle Livak a Schmittgen (2001) a vztaženy k hodnotám referenčního genu GAPDH. Množství mRNA v MI a MII oocytech byly následně vztaženy k oocytům GV a vyjádřeny relativně (GV = 1).

Tabulka 1: Špecifické mRNA primery enzýmů produkujících H₂S

<u>CBS</u>	Forward primer	5'-CAGCGCTGCGTGGTGAT-3'
	Reverse primer	5'-TCACTCAGGAACTTGGACATGTAGTT-3'
	TaqMan probe	5'-CTGCCAGACTCTGTG-3'
<u>CSE</u>	Forward primer	5'-GAGCAGTGGGCCTCCAAAG-3'
	Reverse primer	5'-TTGTTTGAACGTGGTGGACAGT-3'
	TaqMan probe	5'-TGTAGTGCCCCCATC-3'
<u>3-MPST</u>	Forward primer	5'-GCCCCGCCGAGTTCCA-3'
	Reverse primer	5'-TGATGTCCTCGTAGGTCTTGACA-3'
	TaqMan probe	5'-CTGTGCTGGACCCC-3'

4.4. Imunocytochemická lokalizace proteinů a analýza obrazu

CBS, CSE a 3-MPST byly vizualizovány metodou imunocytochemie podle Yi *et al* (2014).

Nezralé GV oocyty, MI a dozralé MII oocyty po 24 a 48 hod. kultivaci byly zbaveny kumulárních buněk. Za zralé MII oocyty byly považovány pouze oocyty po 48 hod. kultivaci s viditelným prvním pólovým tělískem. Následně byla 0.5 % pronásoou (Sigma) odstraněna *zona pellucida* a oocyty byly fixovány 40 min. při pokojové teplotě ve 2 % formaldehydu, následně promyty v PBS-NaN₃ a 40 min. permeabilizovány v PBS- NaN₃ s 0.1 % Triton-X-100 (PBS-NaN₃-TX). Poté byly oocyty 25 min. inkubovány v PBS-NaN₃-TX obohaceném o 5 % normální kozí sérum (NGS). Dále byly oocyty přes noc při teplotě 4 °C inkubovány s králičí poly-klonální anti-CBS, králičí poly-klonální anti-CSE nebo králičí poly-klonální anti-3-MPST společně s myším mono-klonálním anti- GAPDH, které byly ředěny v PBS-NaN₃-TX s 1 % NGS (1:200; Abcam, UK). Poté byly oocyty dvakrát promyty PBS-NaN₃-TX s 1 % NGS a montovány do Vectashield s 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, USA). Obrázky byly pořízeny pomocí invertovaného Ti-U mikroskopu (Nikon, Japan), CCD kamery Clara Interline (Andor Technology PLC, Northern Ireland) a programu NIS Elements Ar (Laboratory Imaging, Czech Republic).

Analýza získaného obrazu byla provedena prostřednictvím programu NIS Elements Ar. Intenzita signálu CBS, CSE a 3-MPST byla vyjádřena poměrem k intenzitě signálu GAPDH v každém oocytu. Průměrná intenzita signálu byla kvantifikována a vyjádřena relativně k nezralým GV oocytům.

4.5. Statistická analýza

Experimenty byly opakovány min. 3x. Data získaná z experimentů pak byla zpracována prostřednictvím obecných lineárních modelů (GLM) v programu SAS. Pro stanovení významných rozdílů mezi skupinami byl použit Scheffes. Stupeň odlišnosti byl stanoven s odchylkou $P < 0.05$.

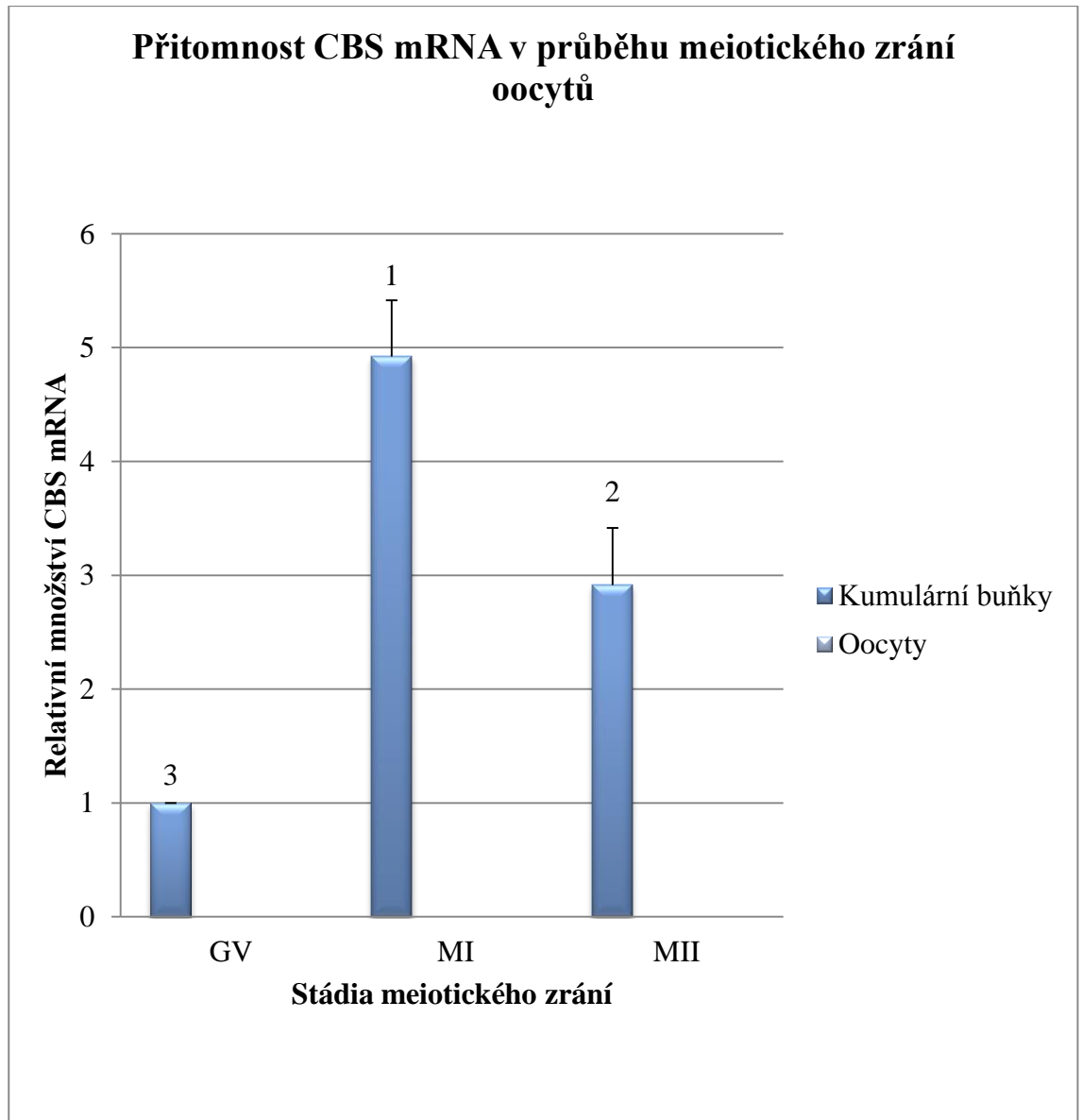
5. Výsledky

5.1. Přítomnost mRNA CBS, CSE a 3-MPST v COCs prasete kultivovaných v *in vitro* podmínkách

Cílem experimentu bylo prokázat přítomnost mRNA enzymů CBS, CSE a 3-MPST uvolňujících H₂S v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

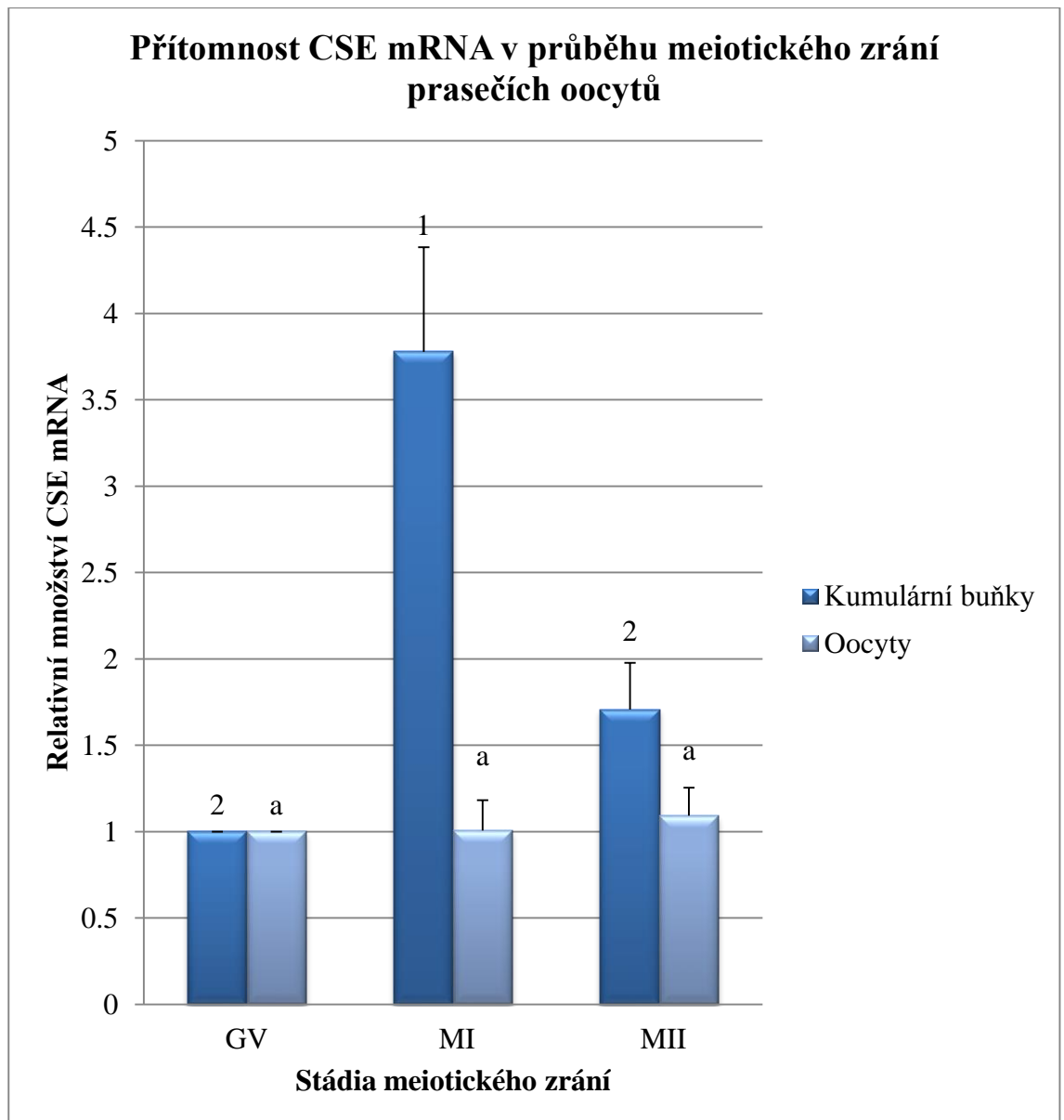
Přítomnost CBS mRNA v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů byla zjišťována pomocí RT-PCR analýzy. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI a MII a kumulární buňky obklopující tyto oocyty. Z výsledků získaných analýzou a zanesených do grafu je patrné, že CBS mRNA je přítomna pouze v kumulárních buňkách a nikoli v oocytech. V průběhu kultivace COCs dochází ke zvyšování množství mRNA v kumulárních buňkách zejména po 24 hod. *in vitro* kultivace (4.78 ± 0.496). S další kultivací COCs dochází k poklesu množství mRNA CBS v těchto kumulárních buňkách (2.65 ± 0.501), viz graf 1.

Graf 1: Přítomnost mRNA CBS v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Množství mRNA je normalizováno ke genu GAPDH, vztaženo k oocytům ve stádiu GV, resp. jejich kumulárním buňkám (= 1) a vyjádřeno relativně.^{1,2,3} Statisticky významné rozdíly mezi oocyty GV, MI a MII a jejich kumulárními buňkami ($P < 0,05$).



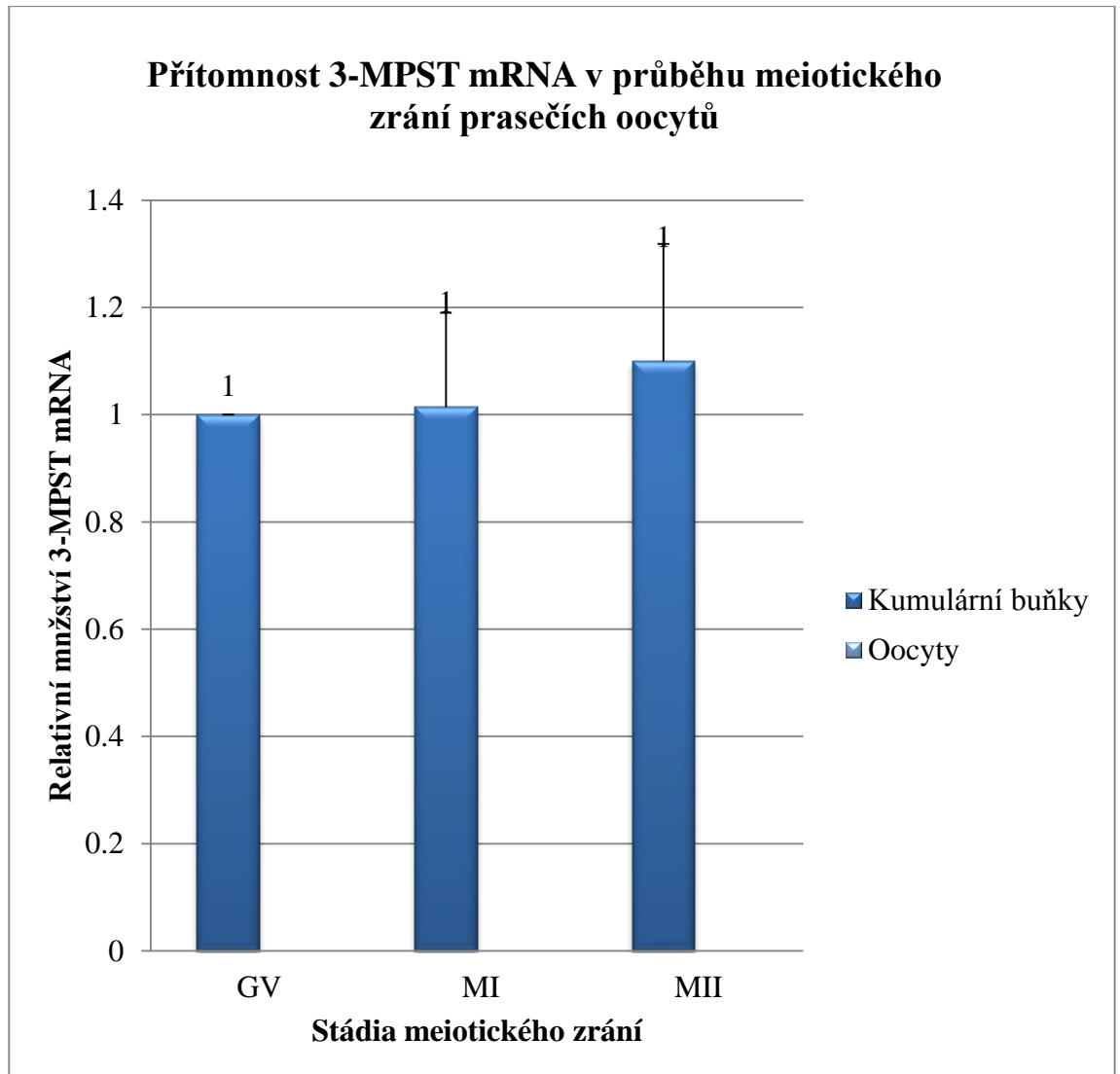
Přítomnost CSE mRNA v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů byla stejně jako CBS mRNA zjišťována pomocí analýzy RT-PCR. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI, MII a kumulární buňky obklopující tyto oocyty. Z výsledků získaných analýzou a jejich zanesením do grafu je patrné, že CSE mRNA je v průběhu zrání oocitů v *in vitro* podmínkách přítomna jak v oocytech tak v kumulárních buňkách, které tyto oocyty obklopují. V průběhu kultivace COCs v *in vitro* podmínkách dochází v oocytech k postupnému nárůstu množství CSE mRNA. Po 24 hod. kultivace dochází k nárůstu množství CSE mRNA (1.006 ± 0.176). S další kultivací COCs se množství CSE mRNA zvyšuje (1.092 ± 0.162). V kumulárních buňkách v průběhu kultivace COCs *in vitro* dochází ke zvyšování množství CSE mRNA zejména po 24 hod. *in vitro* kultivace (3.78 ± 0.605). S další kultivací COCs dochází v kumulárních buňkách k poklesu množství CSE mRNA (1.70 ± 0.269), viz. graf 2.

Graf 2: Přítomnost mRNA CSE v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Množství mRNA je normalizováno ke genu GAPDH, vztaženo k oocytům ve stádiu GV, resp. jejich kumulárním buňkám (= 1) a vyjádřeno relativně. ^{a,1,2}Statisticky významné rozdíly mezi oocyty GV, MI a MII a jejich kumulárními buňkami ($P < 0,05$).



Přítomnost 3-MPST mRNA v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách byla zjišťována RT-PCR analýzou, stejně jako předchozí dva typy mRNA. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI a MII a kumulární buňky obklopující tyto oocyty. Z výsledků získaných analýzou a zanesených do grafu je patrné, že 3-MPST mRNA je přítomna pouze v kumulárních buňkách a nikoli v oocytech. V průběhu kultivace COCs dochází k postupnému zvyšování množství mRNA v kumulárních buňkách. Po 24 hod. *in vitro* kultivace dochází k nárůstu mRNA (1.01 ± 0.176). S další kultivací COCs dochází k dalšímu nárůstu množství mRNA v těchto kumulárních buňkách (1.09 ± 0.219), viz. graf 3.

Graf 3: Přítomnost mRNA 3-MPST v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Množství mRNA je normalizováno ke genu GAPDH, vztaženo k oocytům ve stádiu GV, resp. jejich kumulárním buňkám (= 1) a vyjádřeno relativně. ¹Statisticky významné rozdíly mezi oocyty GV, MI a MII a jejich kumulárními buňkami (P<0,05).

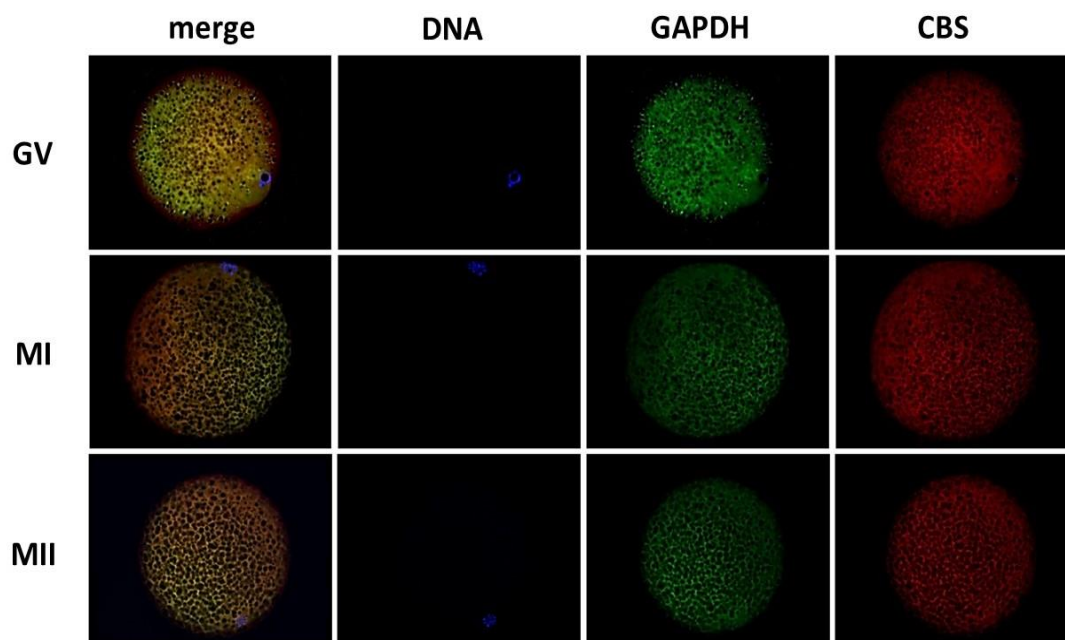


5.2. Distribuce CBS, CSE a 3-MPST v závislosti na průběhu meiotického zrání prasečích oocytů

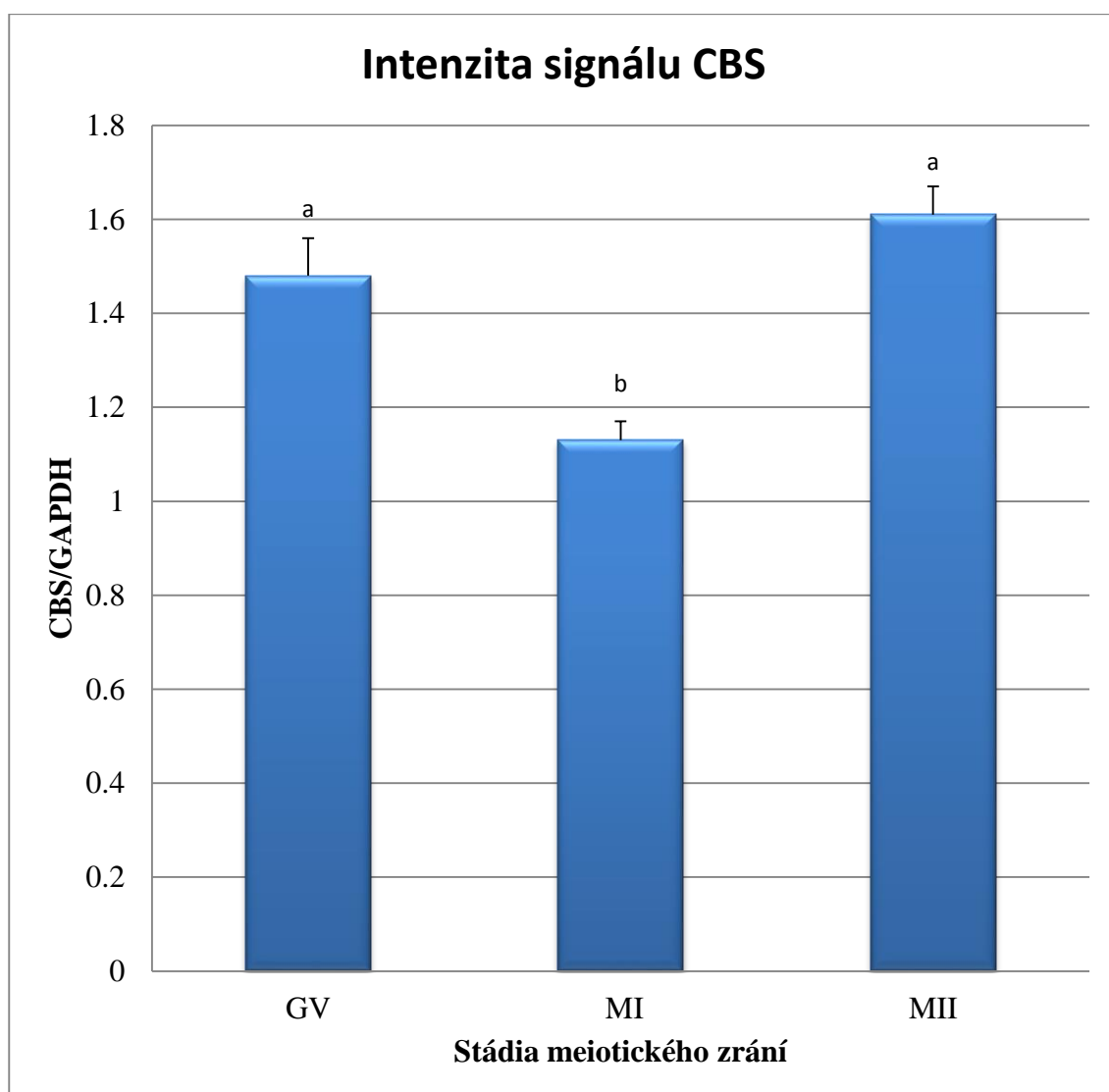
Cílem experimentu bylo zjistit distribuci proteinů CBS, CSE a 3-MPST v prasečích oocytech kultivovaných v *in vitro* podmínkách v průběhu meiotického zrání.

Přítomnost CBS a síla signálu CBS byla zjišťována pomocí imunocytochemické lokalizace proteinů a analýzy obrazu, viz obrázek 1. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI a MII. Z výsledků získaných a zanesených do grafu je patrné, že v průběhu meiotického zrání dochází ve sledovaných stádiích meiotického zrání nejprve k poklesu a následně k nárůstu intenzity CBS. Od stádia GV (1.48 ± 0.08) dochází k poklesu intenzity signálu (1.13 ± 0.04) a v průběhu dalšího zrání k opětovnému nárůstu intenzity signálu (1.61 ± 0.06), rozdíly jsou statisticky významné, viz. graf 4.

Obrázek 1: Imunocytochemická lokalizace enzymu CBS a analýza obrazu v oocytu. GV: germinal vesicle, MI: metafáze I, MII: metafáze II. Merge: DNA-GAPDH-CBS.

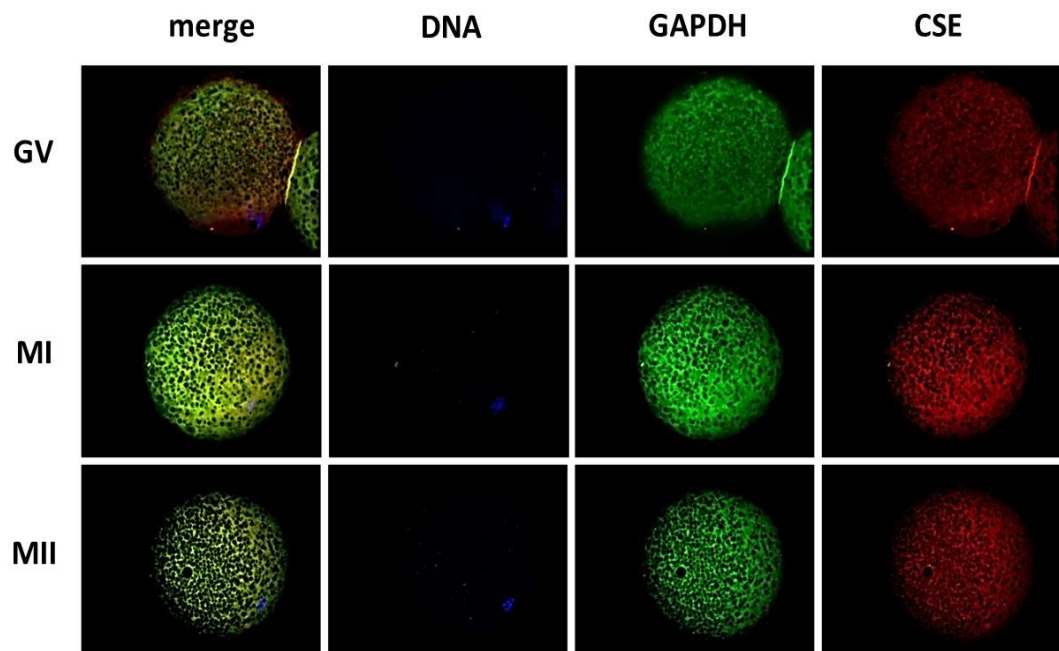


Graf 4: Intenzita signálu CBS v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Množství CBS je normalizováno k intenzitě signálu genu GAPDH.
^{a,b}Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$).

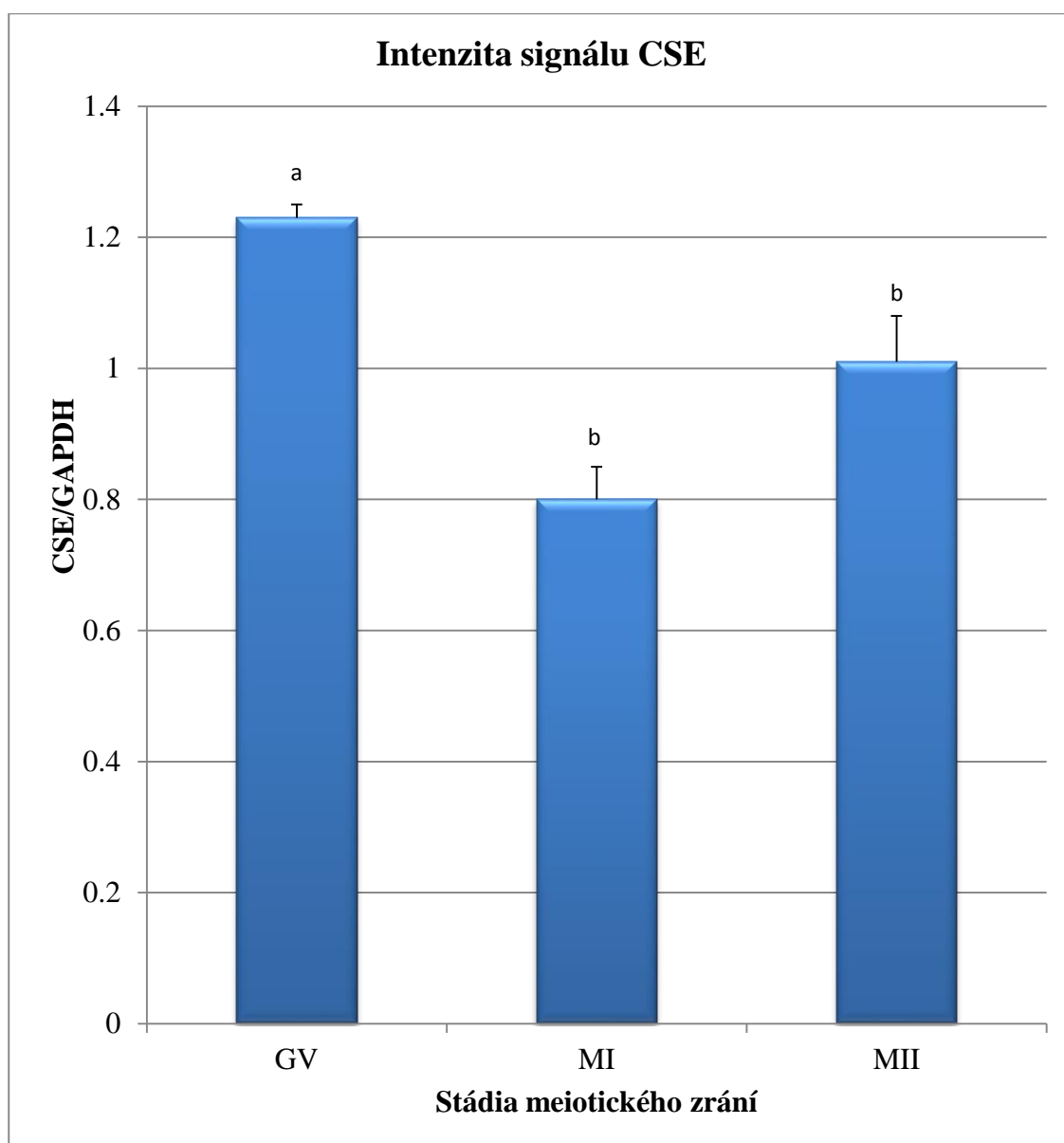


Přítomnost CSE a intenzita signálu CSE byla zjišťována stejně jako v případě CBS pomocí imunocytochemické lokalizace proteinů a analýzy obrazu, viz. obrázek 2. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI a MII. Z výsledků získaných a zanesených do grafu je patrné, že v průběhu meiotického zrání dochází ve sledovaných stádiích meiotického zrání nejprve k poklesu a následně k nárůstu intenzity CSE, přičemž maximální intenzity signálu CSE dosahují oocyty ve stádiu GV (1.23 ± 0.02). Po 24 hod. kultivace dochází k poklesu intenzity signálu (0.8 ± 0.05). Během další kultivace se intenzita signálu statisticky významně nemění (1.01 ± 0.07), viz. graf 5.

Obrázek 2: Imunocytochemická lokalizace enzymu CSE a analýza obrazu v oocytu. GV: germinal vesicle, MI: metafáze I, MII: metafáze II. Merge: DNA-GAPDH-CSE.

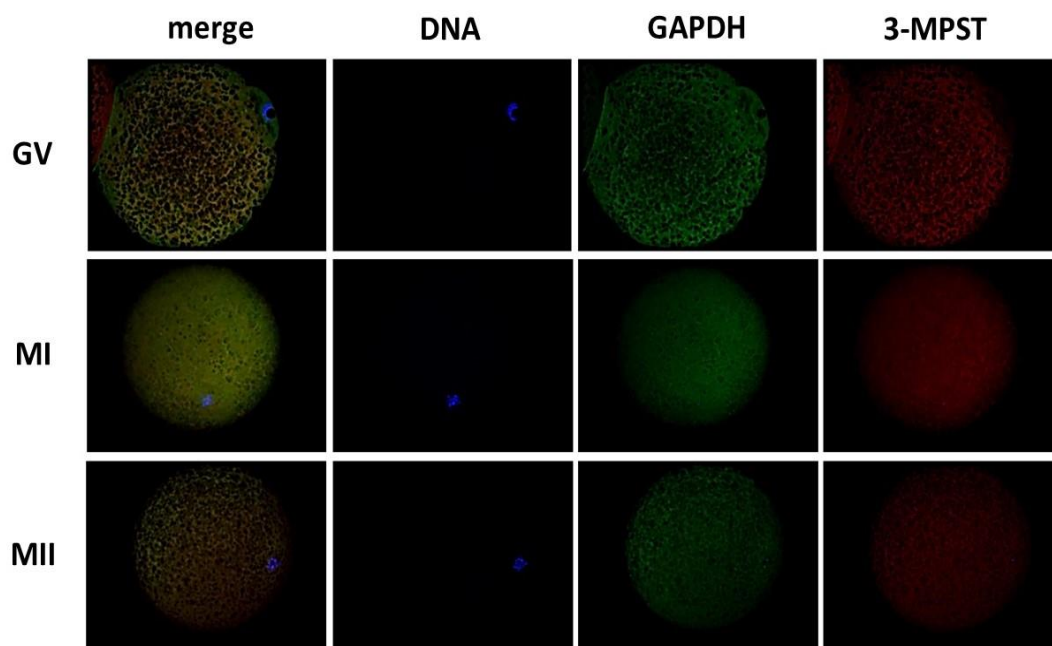


Graf 5: Intenzita signálu CSE v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Intenzita signálu CSE je normalizováno k intenzitě signálu genu GAPDH. ^{a,b}Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$).

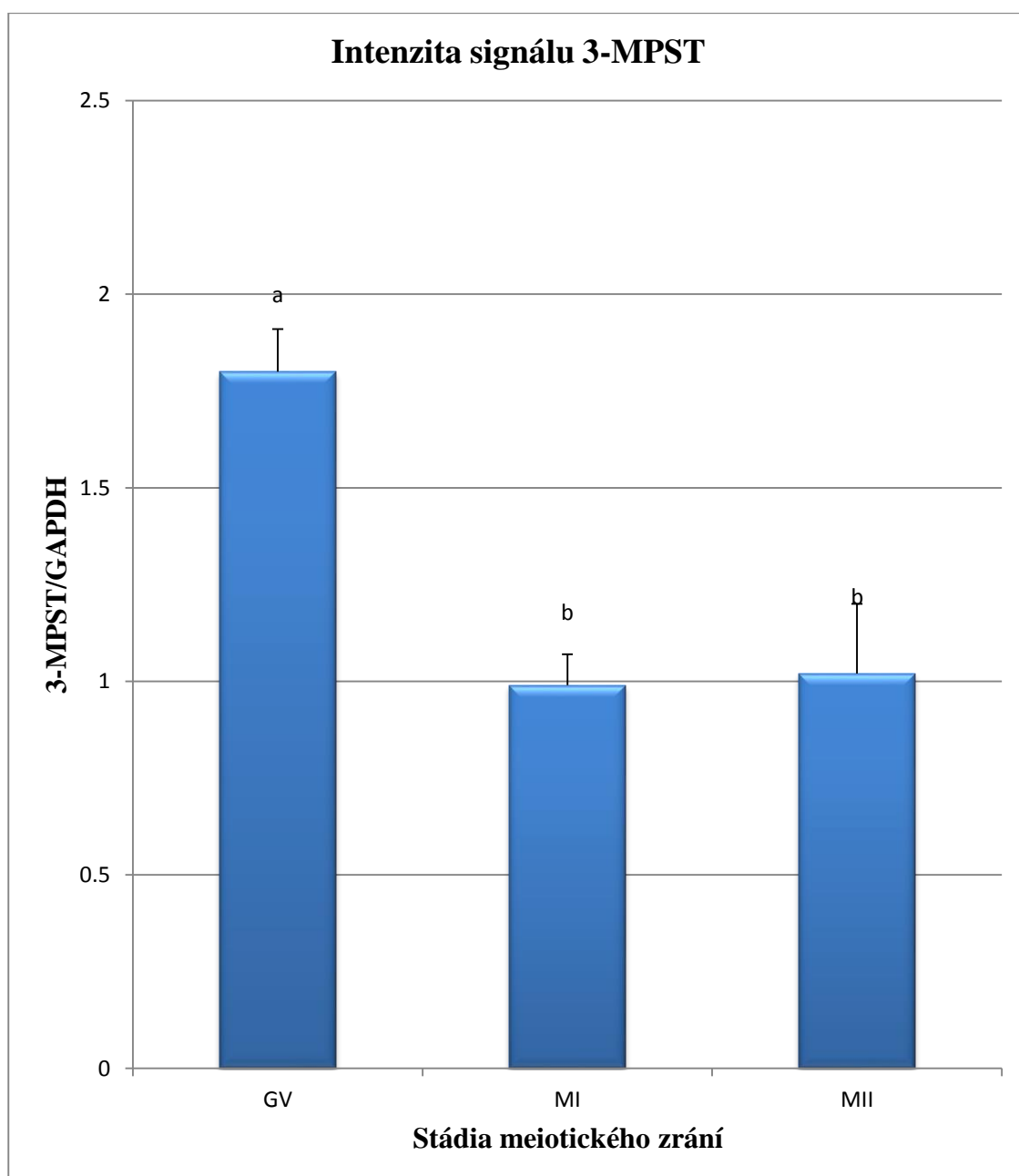


Přítomnost 3-MPST a síla signálu 3-MPST byla zjišťována obdobně jako v případě CBS a CSE pomocí imunocytochemické lokalizace proteinů a analýzy obrazu, viz. obrázek 3. Analyzovány byly oocyty ve stádiích meiotického zrání GV, MI a MII. Z výsledků získaných a zanesených do grafu je patrné, že v průběhu meiotického zrání dochází ve sledovaných stádiích meiotického zrání nejprve k poklesu a následně k nepatrnému nárůstu intenzity signálu 3-MPST, přičemž maximální intenzity signálu dosahuje 3-MPST ve stádiu meiotického zrání GV (1.8 ± 0.11). Po 24 a 48 hod. kultivace dochází k poklesu intenzity signálu (0.99 ± 0.08 a 1.02 ± 0.18), viz. graf 6.

Obrázek 3: Imunocytochemická lokalizace enzymu 3-MPST a analýza obrazu v oocytu. GV: germinal vesicle, MI: metafáze I, MII: metafáze II. Merge: DNA-GAPD-3-MPST.



Graf 6: Intenzita signálu 3-MPST v nezralých GV oocytech, zrajících MI a dozrálých MII oocytech prasete. Intenzita signálu 3-MPST je normalizováno k intenzitě signálu genu GAPDH. ^{a,b}Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$).



5.3. Úloha CBS, CSE a 3-MPST v procesu znovu zahájení a úspěšnosti meiotického zrání prasečích oocytů

Cílem pokusu bylo prokázat vliv enzymů (CBS, CSE a 3-MPST) produkujících H₂S na průběh meiotického zrání oocytů. V pokusu byly použity různé koncentrace trojkombinace inhibitorů CBS, CSE a 3-MPST pro blokadu funkce těchto enzymů. Pro názornost pokusu byla použita kontrolní skupina enzymů, která byla kultivována bez přídavku inhibitorů. V každé skupině bylo kultivováno 120 oocytů.

Z výsledků pokusu je patrné, že procento oocytů, které byly schopny v průběhu meiotického zrání dosáhnout stádia MII ve stejném čase, se v případě přidání inhibitorů oproti kontrolní skupině snižuje (94.7 % v kontrolní skupině versus 65.0 - 75.2 v pokusných skupinách). Z jednotlivých stádií meiotického zrání skupin obsahujících inhibitory je patrné, že průběh meiotického zrání se oproti kontrolní skupině zrající obvyklým způsobem s narůstajícím množstvím inhibitorů zpomaluje. Z těchto výsledků lze odvodit, že enzymy uvolňující H₂S ovlivňují průběh meiotického zrání, viz tabulka 2.

Tabulka 2: Efekt různých koncentrací trojkombinace inhibitorů enzymů uvolňujících H₂S na zrající oocyty po 48 hod. kultivace. MI: metafáze I, AI/TI: anafáze I až telofáze I, MII: metafáze II. Trojkombinace inhibitorů 1: 0.25 mM kys. oxamové, 0.25 mM DL-propargylglycinu a 0.5 mM kys. α-ketoglutarová; 2: 0.5 mM kys. oxamové, 0.5 mM DL-propargylglycinu a 1 mM kys. α-ketoglutarové; 3: 1 mM kys. oxamové, 1 mM DL-propargylglycinu a 2.5 mM kys. α-ketoglutarové; 4: 2 mM 2 mM kys. oxamové, DL-propargylglycinu a 5 mM kys. α-ketoglutarové. ^{abc}: statisticky významné rozdíly mezi skupinami a stádii meiotického zrání (P<0,05).

Skupiny	Stádia meiotického zrání			n
	(% ± S.E.M.)			
	MI	AI/TI	MII	
Kontrolní skupina	0.5±0.6 ^{b,c}	4.8±1.1 ^c	94.7±0.8 ^a	120
1	4.1±1.6 ^b	20.7±1.6 ^a	75.2±2.7 ^b	120
2	17.5±1.4 ^a	6.7±0.8 ^c	75.8±1.7 ^b	120
3	15.8±0.8 ^a	16.7±0.8 ^{a,b}	67.5±1.4 ^{b,c}	120
4	20.8±3.0 ^a	14.2±0.8 ^b	65.0±2.9 ^c	120

Pro správnou vypovídací schopnost předchozího pokusu byl proveden experiment, ve kterém byly kultivovány oocyty s trojkombinací inhibitorů a donorem $H_2S - Na_2S$. Cílem pokusu bylo prokázat, že inhibice enzymů produkujících H_2S a její vliv na zpomalení meiotického zrání není výsledkem nespecifického účinku použitých inhibitorů. V pokusu byly kultivovány tři skupiny oocytů, jedna obsahující inhibitory enzymů CBS, CSE a 3-MPST, druhá obsahující inhibitory enzymů CBS, CSE a 3-MPST společně s donorem H_2S a třetí skupina obsahující pouze donor H_2S . Pro lepší porovnání výsledků pokusu byla kultivována ještě kontrolní skupina oocytů, která byla kultivována běžným způsobem v čistém kultivačním médiu bez ošetření.

Z výsledků pokusu je patrné, že procento oocytů, které byly kultivovány pod vlivem inhibitorů, je ve stádiu MII nižší, než procento oocytů kultivovaných běžným způsobem (95.0 % versus 64.2 %). Skupina oocytů kultivovaná pod vlivem inhibitorů donorem naopak nevykazovala statisticky významný rozdíl v dosažení stádia MII meiotického zrání (k. s. = 95.0 ± 0.0 ; $3C_i + Na_2S = 91.7 \pm 2.2$). Z těchto výsledků je patrné, že při reverzi účinku inhibitorů donorem se oocytům navrácí jejich schopnost meiotického zrání, viz tabulka 3.

Tabulka 3: Efekt inhibitorů enzymů produkujících H₂S a donoru H₂S na zrající oocyty po 48 hod. kultivace. MI: metafáze I, AI/TI: anafáze I až telofáze I, MII: metafáze II. 3C_i: 2 mM 2 mM kys. oxamové, DL-propargylglycinu a 5 mM kys. α-ketoglutarové. Na₂S: Na₂S.9H₂O, donor H₂S. ^{abc}: statisticky významné rozdíly mezi stádii meiotického zrání v jednotlivých skupinách (P<0,05).

Skupiny	Stádia meiotického zrání (% ± S.E.M.)			n
	MI	AI/TI	MII	
Kontrolní skupina	4.2±0.8 ^b	0.8±0.8 ^c	95.0±0.0 ^{a,b}	120
3C _i	19.2±0.8 ^a	16.7±0.8 ^a	64.2±0.8 ^c	120
3C _i + Na ₂ S	2.5±1.4 ^b	5.8±0.8 ^b	91.7±2.2 ^b	120
Na ₂ S	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	100.0±0.0 ^a	120

Cílem pokusu bylo zhodnotit vliv inhibitorů enzymů produkujících H₂S na průběh meiotického zrání. Oocyty byly sledovány v průběhu meiotického zrání v různých časech průběhu kultivace (18 hod., 20 hod., 22 hod., 24 hod., 26 hod., 28 hod., 30 hod., 32 hod.) a porovnávány vždy byly oocyty z kontrolní skupiny (kultivovány běžným způsobem) s oocyty, které zrály pod vlivem inhibitorů H₂S. Z výsledků tohoto pokusu znázorněných v tabulce 4 je patrné, podobně jako z pokusu znázorněného v Tabulce 2, že inhibitory enzymů CBS, CSE a 3-MPST brzdí průběh meiotického zrání.

Tabulka 4: Vliv inhibitorů enzymů produkujících H₂S na průběh meiotického zrání v různých časech kultivace. GV: germinal vesicle, LD: pozdní diakineze, MI: metafáze I, AI/TI: anafáze I až telofáze I, MII: metafáze II. 3C_i: 2 mM 2 mM kys. oxamové, DL-propargylglycinu a 5 mM kys. α-ketoglutarové. * statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a 3C_i skupinou oocytů v jednotlivých stádiích meiotického zrání v různých časech kultivace (P<0,05).

		Stádia meiotického zrání (% ± S.E.M.)					n
		GV	LD	MI	AI/TI	MII	
18 h	Kontr. sk.	65.0±2.9	10.8±1.7	24.2±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	96.7±0.8*	3.3±0.8*	0.0±0.0*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
20 h	Kontr. sk.	31.7±3.3	24.2±2.2	44.2±2.2	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	83.3±1.7*	10.8±2.2*	5.8±0.8*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
22 h	Kontr. sk.	20.8±1.7	20.0±1.4	59.2±3.0	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	49.2±3.0*	23.3±3.6	27.5±2.9*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
24 h	Kontr. sk.	0.0±0.0	3.3±1.7	96.7±1.7	0.0±0.0	0.0±0.0	120
	3C _i	33.3±1.7*	36.7±0.8*	30.0±1.4*	0.0±0.0	0.0±0.0	120
26 h	Kontr. sk.	0.0±0.0	0.0±0.0	70.0±1.4	30.0±1.4	0.0±0.0	120
	3C _i	27.5±2.9*	30.8±4.2*	41.7±2.2*	0.0±0.0*	0.0±0.0	120
28 h	Kontr. sk.	0.0±0.0	0.0±0.0	70.0±2.9	30.0±2.9	0.0±0.0	120
	3C _i	25.8±1.7*	20.0±1.4*	45.0±1.4*	9.2±1.7*	0.0±0.0	120

30 h	Kontr. sk.	0.0±0.0	0.0±0.0	42.5±2.9	53.3±0.8	4.2±2.2	120
	3C _i	11.0±2.3*	5.0±1.4*	68.0±2.4*	16.0±2.2*	0.0±0.0	120
32 h	Kontr. sk.	0.0±0.0	0.0±0.0	40.0±1.4	49.2±0.8	10.8±2.2	120
	3C _i	10.0±1.4*	5.0±1.4*	51.7±0.8*	28.3±2.2*	5.0±1.4	120

6. Diskuze

Začátek vývoje oocyty je možné pozorovat již u prenatalních samic, u kterých probíhají první stádia vývoje oocytů. Celý proces vývoje může trvat až několik desítek let a je ovlivněn příslušností k danému živočišnému druhu. Ještě před narozením je totiž proces vývoje oocytů zastaven, znovu pokračuje až s nástupem puberty a opakuje se v pravidelných periodách. Pouze zcela dozrálý oocyt je schopen oplodnění a vývoje v nového životaschopného jedince (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998; Sawyer *et al.*, 2002). Meiotické zrání je nezbytnou součástí reprodukce, která je podstatou nejen chovu, ale také existence zvířat. Meiotické zrání je vázáno na organismus samice, ve kterém probíhá a v němž je ovlivňován mnoha faktory, které se podílejí na tvorbě optimálních podmínek a na změnách, které oocyt během zrání prodělává. Podrobná znalost změn, které oocyt v průběhu meiotického zrání prodělává, nám umožňuje přesunout proces vývoje oocyty z těla samice do laboratoří.

Průběh meiotického zrání oocyty je řízen mnoha faktory, které dosud nejsou zcela objasněny. Mezi takové se řadí skupina malých plyných molekul zvaných gasotransmitery (Wang, 2002). Dosud známými gasotransmitery jsou NO, CO a H₂S (Furchgott, Zawadski, 1980). Již dlouho jsou známy toxické účinky H₂S na živý organismus, spočívající v narušení dýchacího centra a nervových funkcí (Guidotti, 1996). Také jeho přítomnost v reprodukční soustavě jak samců, tak samic byla považována za toxickou (Reiffenstein *et al.*, 1992). Až v nedávné době došlo k objasnění fyziologické úlohy H₂S v organismu (Furne *et al.*, 2001). Mezi procesy, které je H₂S schopen ovlivnit, patří také průběh meiotického zrání oocytů (Liang, 2006). Také výsledky experimentů předkládané diplomové práce prokázaly zapojení signální dráhy H₂S do regulace meiotického zrání prasečích oocytů.

V tkáních se fyziologická koncentrace H₂S pohybuje mezi 50- 160 nM (Furne *et al.*, 2001) a je produkován třemi různými enzymy (Wang, 2002; Shibuya *et al.*, 2009) CBS, CSE a 3-MPST. Z počátku byla přítomnost H₂S v reprodukční soustavě jak samců, tak samic považována za toxickou (Reiffenstein *et al.*, 1992). V rámci řešení diplomové práce došlo k prokázání přítomnosti všech tří H₂S-uvolňujících enzymů v prasečích oocytech stádia GV, MI a *in vitro* dozrálých MII oocytů. Prokázali jsme přítomnost mRNA CSE v oocytech, přítomnost CBS s 3-MPST na úrovni mRNA v oocytech prokázána nebyla. Na druhou stranu, přítomnost mRNA všech enzymů byla detekována v kumulárních buňkách obklopující oocyt. Tato zjištění jsou v souladu s pozorováním u myšího oocyty (Liang *et al.*, 2006), kdy rovněž nebyla prokázána přítomnost CBS v oocyty, avšak byla pozorována vysoká exprese tohoto

enzymu v somatických buňkách ovária. Během námi provedených sledování H₂S-uvolňujících enzymů na úrovni proteinů byla prokázána přítomnost CBS, CSE a 3-MPST v oocytech prasete. Imunocytochemickou metodou a analýzou obrazu bylo zjištěno, že množství CSE a 3-MPST, vyjádřené poměrem k množství GAPDH, v průběhu meiotického zrání klesalo. Detekce a kvantifikace CSE a 3-MPST v prasečích oocytech je dosud prvním pozorováním těchto enzymů v samičích gametách.

Dalšími experimenty jsme prokázali fyziologickou úlohu H₂S-uvolňujících enzymů na znovu zahájení meiotického zrání prasečích oocytů – GVBD. Dosažené výsledky poukazují na nezbytnost enzymů CBS, CSE a 3-MPST současně pro meiotické zrání oocytů, kdy skupina ošetřená inhibitory enzymů vykazovala signifikantně zpomalený nástup GVBD a dosažení stádia MII po 48. hod. *in vitro* kultivaci. Lze předpokládat, že sledované projevy inhibice těchto enzymů byly výsledkem fyziologické produkce H₂S, v souladu s původními pracemi popisující jeho enzymaticky katalyzované produkce (citace). Pro ověření skutečného efektu H₂S byly oocyty ošetřené inhibitory enzymů kultivovány 48 hod. současně s donorem exogenous H₂S, Na₂S. Výsledky tohoto experimentu vykazovaly reverzi účinku inhibice enzymatického uvolňování H₂S donorem, kdy došlo k vykompenzování rychlosti zrání oocytů. Tyto výsledky jsou v souladu s již dříve publikovanými, kdy byl potvrzen akcelerační efekt donoru H₂S na meiotické zrání oocytů (Nevoral *et al.*, 2014) a protektivní účinek H₂S na oocyty podléhající apoptóze (Krejčová *et al.*, 2015)

Meiotické zrání oocytů je proces, jehož průběh je řízen dvěma hlavními kinázami. Jsou jimi MPF a MAPK, které aby mohly správně fungovat, musí být adekvátně regulovány. Molekuly, které toto řízení zprostředkovávají, se nazývají druzí poslové a patří mezi ně různorodá skupina látek (Eppig, 2001). Do skupiny látek zvaných druzí poslové se řadí taktéž H₂S (Wang, 2002). Podrobný popis funkce H₂S v řízení meiotického zrání ale dosud neexistuje. Liang *et al.*, (2007) však prokázali, že inhibice enzymu CBS v granulóznicích buňkách vede k inhibici meiotického zrání. Z tohoto lze usuzovat, že H₂S produkovaný enzymem CBS se podílí na meiotickém zrání oocytů. V souladu s tímto zjištěním bylo prokázáno, že donor H₂S přidaný do kultivačního média akceleruje aktivitu MPF a MAPK, čímž dochází k urychlení meiotického zrání oocytů (Nevoral *et al.*, 2014). Dosavadní poznání poukazují na schopnost H₂S tzv. S-sulfhydratace, díky které dochází k post-translační modifikaci širokého spektra proteinů včetně kináz (Sen *et al.*, 2012; Snijder *et al.*, 2013). S-sulfhydratace tak pozměňuje funkci těchto proteinů, čímž dochází ke změnám ve fyziologických funkcích buňky (Mustafa *et al.*, 2009; Wang R., 2011). Zhao *et al.*, (2014)

objasnili schopnost H₂S v endoteliálních buňkách prostřednictvím sulfhydratace indukovat MEK1, jenž je součástí kaskády vedoucí k aktivaci MPF a MAPK. Lze proto očekávat, že k podobné aktivaci dochází účinkem endogenně uvolněného H₂S také v průběhu meiotického zrání. Sledované zpomalení meiotického zrání u oocytů ošetřených inhibitory H₂S uvolňujících enzymů může mít příčinu v neadekvátní regulaci MEK-MAPK signální dráhy prostřednictvím S-sulfhydratace.

Podobné pokusy byly prováděny již dříve a to v souvislosti s jiným gasotransmitterem a to s NO. Úloha NO byla již dříve studována také v souvislosti s meiotickým zráním oocytů (Chmelíková *et al.*, 2010; Tichovská *et al.*, 2011). Existuje předpoklad, že NO ovlivňuje průběh meiotického zrání prostřednictvím kináz MPF a MAPK, zodpovědných za průběh meiotického zrání, podobně jako se tomu předpokládá u H₂S (Sela-Abramovich *et al.*, 2008). Vliv NO na průběh meiotického zrání byl zkoumán prostřednictvím zjišťování přítomnosti NOS, enzymu produkujícího NO, v COCs (Chmelikova *et al.*, 2010). Tedy podobně jako je tomu u zjišťování vlivu H₂S na průběh meiotického zrání. Lze proto předpokládat, že H₂S a NO se na průběhu meiotického zrání podílí obdobným způsobem a sledovaný efekt inhibice fyziologické produkce H₂S může spočívat též v ovlivnění molekulární komunikace mezi H₂S a NO.

V pokusech, na kterých je postavena předkládaná diplomová práce, byl objasněn vliv fyziologické produkce H₂S a enzymů produkujících H₂S během meiotického zrání prasečích oocytů. Pokusy byly zaměřeny na zjištění přítomnosti mRNA kódující enzymy produkující sulfan v oocytech a kumulárních buňkách, dále na zjištění přítomnosti těchto enzymů v oocytech a kumulárních buňkách a byl zkoumán vliv těchto enzymů na průběh meiotického zrání pomocí inhibitorů těchto enzymů a donoru H₂S. Z výsledků jednotlivých pokusů lze vyhodnotit, že enzymy produkující sulfan jsou v průběhu meiotického zrání přítomny jak v oocytech, tak v okolních kumulárních buňkách a jejich funkce se podílí na adekvátním průběhu meiotického zrání oocytů a sledovaný efekt inhibice fyziologické produkce H₂S může spočívat též v ovlivnění molekulární komunikace mezi H₂S a NO.

7. Závěr

Meiotické zrání je nedílnou součástí vývoje oocyty tak, aby byl schopen splnit svou funkci a prodělal oplození a vývoj v životaschopného jedince. Jedná se o velice složitý proces, do jehož řízení je zapojeno velké množství činitelů. Podrobná znalost meiotického zrání není dodnes uspokojivě objasněna. Neustále jsou objevovány nové faktory a části komplexního řetězce reakcí, které zabezpečují optimální průběh tohoto děje.

Jedním z intenzivně studovaných faktorů je H_2S a jeho úloha v průběhu meiotického zrání. Bylo odhaleno, že tato malá plynná molekula, patřící do rodiny gasotransmiterů, se významně podílí na procesu meiotického zrání. Z výsledků pokusů diskutovaných v této práci je patrné, že fyziologická produkce H_2S se podílí na průběhu meiotického zrání. Pokusy byla prokázána přítomnost mRNA enzymů uvolňujících H_2S v kumulárních buňkách a oocytech v různých fázích meiotického zrání. Tyto mRNA jsou nezbytné pro vznik CBS, CSE a 3-MPST, které indukují vznik H_2S .

Důkladná znalost procesů vedoucích ke vzniku oplození schopné buňky a následně normálně se vyvíjejícího jedince je podmínkou ve snaze využívat moderní biotechnologie. A to nejen s cílem maximalizovat užitek hospodářských zvířat, ale také s cílem využití v humánní medicíně. Závěry provedené na základě pokusů vyhodnocených v této práci pouze odhalují další část složité kaskády reakcí, která vede ke vzniku oplození schopné buňky. A umožňuje nám klást nové otázky, na které je třeba hledat odpovědi. Z hlediska získávání nových informací o vlivech na průběh meiotického zrání by bylo jistě zajímavé zaměřit další pokusy na molekulární mechanismy působení sulfanu v oocytech. Další významnou kapitolou je objasnění úlohy H_2S v časném embryonálním vývoji.

8. Literární zdroje

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998. Základy buněčné biologie, úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing Ústí nad Labem.

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

Bodensteiner K. J., Clay C. M., Moeller C. L., Sawyer H. R. 1999. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction* 60 381–386.

Bukovska G., Kery V., Kraus J. P. 1994. Expression of human cystathionine beta-synthase in *Escherichia coli*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. p. 5. ISBN: 442–448.

Bryan, N. S., Calvert, J. W., Elrod, J. W., Gundewar, S., Ji, S. Y., Lefer, D. J. 2007. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. p. 104. ISBN: 19144–19149.

Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M. C., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E. P. 2006. *Science*, 314 (2006), pp. 825–828

Dekel N., Ayalon D., Lewysohn O., Nevo N., Kaplan-Kraicer R., Shalgi R. 1995. Experimental extension of the time interval between oocyte maturation and ovulation: effect on fertilization and first cleavage. *Fertility and Sterility*. 64(5). 1023-8.

DiLuigi, A., Weitzman, V. N., Pace, M. C., Siano, L. J., Maier, D., Mehlmann, L. M. 2008. Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biology of Reproduction*. 78 (4). 667-72.

Durlinger A. L. L., Visser J. A., Themmen A. P. N. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*. 124. 601–609.

Ebisch I. M., Peters W. H., Thomas C. M., Wetzels A. M., Peer P. G., Steegars-Theunissen R. P. 2006. Homocystein, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Repro*; 7: 1725-1733.

Eppig J. J. O'Brien M. J. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*. 54. 197–207.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproductions*. 122 (6). 829-38.

Erickson, P. F., Maxwell, I. H., Su, L. J., Baumann, M., Glode, L. M. 1990. Sequence of cDNA for rat cystathionine-lyase and comparison of deduced amino acid sequence with ester binding. *The Journal of Biological Chemistry*. p. 268. ISBN: 27180–27185.

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

Furchgott, R. F., Zawadski, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London)*. p. 228. ISBN: 373–376.

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

Ganong, W. F. 2005. *Přehled lékařské fyziologie, dvacáté vydání*. Galén. p. 890. ISBN: 8072623117.

Garrett W. M., Guthrie H. D. 1999. Expression of Bcl-2 and 3-hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in foetal and post-natal pig ovaries. *Reproduction Fertility and Development*. 11. 463–470.

Guidotti, T. L. 1996. Hydrogen sulfide. *Occupational medicine*. p. 46. ISBN: 367–371.

Guthrie H. D., Garrett W. M. 2001. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Reproduction* 58. 17–29.

Guzman, M. A., Navarro, M. A., Carnicer, R., Sarría, A. J., Acín, S., Arnal, C., Muniesa, P., Surra, J. C., Arbones-Mainar, J. M., Maeda, N., Osada, J. 2006. Cystathionine beta-synthase is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics*. p. 15. ISBN: 3168–3176.

Hagting A, Jackman M, Simpson K., Pines J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology*. 9. 680–689.

Handel M. A. and Eppig J. J., 1997. Sexual dimorphism in the regulation of mammalian meiosis. In *Current Topics in Developmental Biology: Meiosis and Gametogenesis*. MA Handel. Academic Press, Orlando. P. 333–358.

Hillier S. G. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod*. 9:188–191

Huang Y, Li F, Tong WD, Zhang AP, He YJ, et al. (2010) Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of intestinal cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein. *Tohoku J Exp Med* 221: 125–132.

Hulshof S. C. J., Figueiredo J. R., Beckers J. F., Bevers M. M., Vanderstichele H., Hurk R. 1997. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. *Theriogenology*. 48. 133–142.

Hunt P. A., Hassold T. J., 2008. Human female meiosis: What makes a good egg go bad? *Trends Genet* 24: 86–93.

Hunter M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122-30.

Chen L., Wert S. E., Hendrix E. M., Russell P. T., Cannon M., Larsen W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular reproduction and development*. 26 (3). 236-47.

Chmelikova E., Jeseta M., Sedmikova M., Petr J., Tumova L., Kott T., Lipovova P. and Jilek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* 18 (August), pp. 235–244.

Inoue M., Naito K., Nakayama T., Sato E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocyte. *Zygote*. 3 (3). 265 - 271.

Jablonska-Shariff A. and Olson L. M. 2010. Nitric Oxide Is Essential for Optimal Meiotic Maturation of Murine Cumulus-Oocyte Complexes In Vitro. *Molecular reproduction and development*. 55:412–421

Jaffe L. A., Norris R. P. 2010. Initiation of the meiotic prophase-to-metaphase transition in mammalian oocytes. In: Verlhac M-H, Villeneuve A, editors. Oogenesis: The Universal Process. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 181–197. chap 7.

Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J. K., Tilly J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 6979. 145-150.

Jones K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 1. 1 – 5.

Kameyama Y., Filion F., Yoo J. G., Smith L. C. 2007. Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro. *Reproduction* 133423–432.

Kameyama Y., Filion F., Yoo J. G., Smith L. C. 2007. Characterization of mitochondrial replication and transcription control during rat early development in vivo and in vitro. *Reproduction*: 2007, 133(2); 423-32 PMID: 17307910

Kimura H. 2010. Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxidants and Redox Signaling*. p.12. ISBN: 1111–1123.

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

Kovo M., Kandli-Cohen M., Ben-Haim M., Galiani D., Carr D. W., Dekel N. 2006.

Krejcová T., Smelcova S., Petr J., Bodart J-F., Sedmikova M., Nevorál J., Dvorakova M., Vyskocilova A., Weingartova I., Kucerova-Chrpova V., Chmelikova E., Tumova L., Jilek F. 2015. Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. *PLoS ONE*10(1):e0116964. doi:10.1371/journal.pone.0116964

Kubelka M., Motlik J., Schultz R. M., Pavlok A. 2000 Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* **62** 292-302.

Lanuza E., Belekova M., Martinez-Marcos A., Font C., Martinez-Garcia F. 1998. Identification of the reptilian basolateral amygdala: an anatomical investigation of the

afferents to the posterior dorsal ventricular ridge of the lizard *Podarcis hispanica*. *European Journal of Neuroscience*. 10:3517–3534.

Lawrence T. S., Dekel N., Beers W. H. 1980. Binding Of human chorionic gonadotropin by rat cumuli oophori and granulosa cells: A Comparative study. *Endocrinology* 106,1114-1118

Liang R., Yu W. D., Du J. B., Yang L. J., Shang M., Guo J. Z. 2007. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 1877-83.

Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-XXCT Method. *Methods* 25 402-408.

Logan K. P., McNatty K. A., Juengel J. L. 2003. Expression of Wilms' tumor gene and protein localization during ovarian formation and follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 68. 635–643.

Masui Y., Markert C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177: 129–145

Matsuda S., Kosako H., Takenaka K., Moriyama K., Sakai H., Akiyama T., Gotoh Y., Nishida E. 1992. *Xenopus* MAP kinase activator – identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *Embo Journal* 11 (3). 973-982.

McGrath S. A., Esquela A. F., Lee S. J. 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9 (1): 131–6.

McNatty K. P., Fidler A. E., Juengel J. L., Quirke L. D., Smith P. R., Heath D. A., Lundy T., O'Connell A., Tisdall D. J. 200. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol*. May 25;163(1-2):11-20. Review.

Mehlmann L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocyte: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-99.

Mlynářčiková A., Nagyová E., Ficková M., Scsuková S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicology In Vitro*. 23 (3). 371-77.

Motlík J., Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87 – 96.

Motta P. M., Nottola S. A., Makabe S. 1997. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 75 (1). 5-10.

Murphy M. G., Enright W. J., Crowe M. A., McConnell K., Spicer L. J., Boland M. P., Roche, J. F. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil* 92, 333–338.

Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S. K., Barrow R. K., Yang G., Wang R., Snyder S. H. 2009. H₂S signals through protein S-Sulfhydration. *Science Signalling*. p. 2. ISBN: 1–8.

Nevoral J., Gelaude A., Bodart J. F., Kucerova-Chrpova V., Sedmikova M., Krejcová T., Kolbabova T., Dvorakova M., Vyskocilova A., Weingartova I., Krivohlavkova L., Zalmanova T., Jilek F. 2014. Dual effect of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLOS ONE* 9 e99613.

Norris R. P., Freudzon M., Mehlmann L. M., Cowan A. E., Simon A. M., Paul D. L., Lampe P. D., Jaffe L. A. Luteinizing hormone causes MAPK-dependent phosphorylation and closure of Cx43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*.

Norris R. P., Ratzan W. J., Fredzon M., Mehlmann L. M., Krall J., Movsesian M. A., Wang H., Ke H., Nikolaev V. O., Jaffe L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136 (11). 1869-78.

Panigone S., Hsieh M., Fu M., Persani L., Conti M. 2008. *Molecular Endocrinology*. 2008 Apr;22(4):924-36.

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

Petr J., Rajmon R., Chmelíkova E., Tomanek M., Lanska V., Pribanova M. and Jilek F. 2006. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote* 14 (February), pp. 9-16.

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

Procházka R., Nagyová E., Brem G., Schellander K., Motlík J. 1998. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Molecular reproduction and development*. 49 (2). 141-49.

Quere I., Paul V., Rouillac C., Janbon C., London J., Demaille J., et al. 1999. Spatian and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun*; 254: 127-137.

Rani C. S., Salhanick A. R., Armstrong D. T. 1981. Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology*, 108, 1379±1385.

Reis N., Goncalves C. N., Vicente A. A., Teixeira J. A. 2006. Proof-of-concept of a novel micro-bioreactor for fast development of industrial bioprocesses. *Biotechnol Bioeng* 95(4):744-53. *Reproduction*. 2006 Jul;132(1):33-43.

Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. p. 32. ISBN: 109–134.

Robert K., Vialard F., Thiery E., Toyama K., Sinet P. M., Jabel N., et al. 2003. Expression of cystathionine beta-synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem*; 51: 363-71.

Sadovski Y. A., Dorn C. 2000. Function of steroidogenic factor 1 during development and differentiation of the reproductive system. *Reviews of Reproduction*. 5. 136–142.

Sagata N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: Its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol* 6: 22–28.

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

Sen N., Paul B. D., Gadalla M. M., Mustafa A. K., Sen T., Xu R., Kim S., and Snider S. H. 2012. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Molecular Cell* 45. 13-24.

Sela-Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*. p. 78. 1111–1118.

Sela-Abramovich S., Edry I., Galiani D., Nevo N., Dekel N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 2006;147:2280–2286.

Shibuya N., Tanaka M., Yoshida M., Ogasawara Y., Togawa T., Ishii K., Kimura H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfur transferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal*. p. 11. ISBN: 703–714.

Silva J. R., Hurk R., Matos M. H., Santos R. R., Pessoa C., Moraes M. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue, *Theriogenology*. 61. 1691–1704.

Sládeček F. 1986. *Rozmnožování a vývoj živočichů*, Academia Praha, 487s.

Snijder P. M., de Boer R. A., Bos E. M., van den Born J. C., Ruifrok W. P., Vreeswijk-Baudoin I., van Dijk M. C., Hillebrands J. L., Leuvenink H. G., van Goor H. 2013. Gaseous hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice partially independent from hypometabolism. *PLOS ONE* 8 e63291. Soyala S. M., Amleh A., Dean J. 2000. Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development, *Development*. 127. 4645–4655.

Srilatha B., Adaikan P. G., Moore P. K. 2006. Possible role for the novel gasotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction – a pilot study. *European Journal of Pharmacology*. p. 535. ISBN: 280–282.

Sriraman V., Richards J. S. Cathepsin L gene expression and promoter activation in rodent granulosa cells. *Endocrinology* 2004;145:582-91.

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

Sugiura K, Naito K., Tojo H. 2005. Cdk2 activity is essential for the first to second meiosis transition in porcine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development* . 51(1). 143-9.

Sun Q., Nagai T. 2003. Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 49. 347 – 359.

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

Šutovský P., Fléchon J. E., Pavlok A. 1994. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reproduction Nutrition Development*. 34 (5). 415-25.

Tichovska, H., Petr, J., Chmelikova, E., Sedmikova, M., Tumova, L., Krejcova, M., Dorflerova, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. p. 5. 1398–1405.

Tumová L., Petr J., Žalmanová T., Chmelíková E., Kott T., Tichovská H., Kučerová-Chrpová V., Hošková K. & Jílek F. 2013. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science* **141** 154-163.

Vaccari S., Weeks J. L., Hsieh M., Menniti F. S., Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the LH-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2009;81:595–604.

Van der Hurk R., Bevers M. M., Beckers J. F. 1997. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* .47. 73–82.

Wandji S. A., Eppig J. J., Fortune J. E. 1996. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* . 45. 817– 832.

Wang R., Sun Q., Hosoe M., Shioya Y., Day B. N. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56 (6). 1376-82.

Wang R. 2011. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulphide. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 20. 107-112.

Wang, R. 2002. Two is company, free is a crowd – Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*. p. 16. ISBN: 1792–1798.

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

Wassarman P. M., Albertini D. F. 1994. *The Mammalian Ovum, Second Edition. The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 79-122.

Watanabe M., Osada J., Aratani Y., Kluckman K., Reddick R., Malinow M. R., et al. 1995. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animals models of mild and severe homocysteinemia. *Proc Natl Acad Sci USA*;92: 1585-9.

Wu M., Gerhart J. C. 1980. Partial purification and characterization of the maturation promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*. 79(2). 465-77.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction* (ed. E. Knobil and J. D. Neill), pp. 189-317. New York: Raven Press.

Yang G., Wu L., Jiang B. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. *Science*. p. 322. ISBN: 587–590.

Yi Y.J., Sutovsky M., Song W.H. & Sutovsky P. 2014. Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyospermy defense and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development* doi: 10.1071/RD14012.

Ying Y., Qi X., Zhao G. -Q. 2001. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98. 7858–7862

Yokoo M., Kimura N., Sato E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronanCD44 interaction in pigs. *Journals of Reproduction and Development*. 56 (1). 15-19.

Zhang H., Zheng W., Shen Y., Adhikari D., Ueno H., Liu K. 2012. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (31). 12580-12585.

Zhao J., van Tol H. T. A, Taverne M. A, van der Weijde G. C., Bevers M. M., van den Hurk R. 2001. The effect of growth hormone on rat preantral follicles in vitro. *Zygote* 8. 275–83.

Zhao K., Ju Y., Li S., Altaany Z., Wang R., Yan G. 2014. S-sulphydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO reports* (2014) 15, 792-800.