

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv gasotransmiteru sulfanu na expanzi kumulu
během meiotického zrání prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Ivona Weingartová

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv gasotransmiteru sulfanu na expanzi kumulu během meiotického zrání prasečích oocytů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. a Ing. Janu Nevoralovi za obětavou pomoc při zpracování diplomové práce, věnovaný čas, poskytnutí literárních zdrojů a cenných rad, za přátelský přístup, trpělivost a podporu.

Souhrn

Pro současný rozvoj reprodukčních biotechnologií je nezbytné získávat velký počet kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách. Meiotické zrání představuje nezbytné změny meioticky kompetentního oocyty v oocyt schopný oplození. Meiotické zrání probíhá společně s procesem kumulární expanze. Kumulární expanze spočívá v produkci velkého množství extracelulární matrix, která je složena zejména z hyaluronové kyseliny. Meiotické zrání i kumulární expanze jsou regulovány řadou faktorů, mezi které patří také skupina plyných molekul s fyziologickým účinkem, tzv. gasotransmitery. Intenzivně studovaným gasotransmiterem v reprodukčních procesech je sulfan.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv donoru sulfanu Na_2S na meiotické zrání a kumulární expanzi prasečích oocytů kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Prasečí oocyty byly kultivovány v podmínkách *in vitro* s donorem sulfanu Na_2S o koncentraci 0,15 – 0,9 mM po 12 - 48 hod. Poté byly oocyty zbaveny expandovaných kumulárních buněk. U oocytů bylo morfologicky hodnoceno stádium meiotického zrání a kumulární expanze. Jako ukazatel kumulární expanze byla využita hyaluronová kyselina. Její koncentrace byla měřena spektrofotometricky pomocí QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay.

Přítomnost donoru sulfanu Na_2S v koncentraci 0,3 a 0,6 mM potlačovala celkovou produkci hyaluronové kyseliny v prasečích kumulo-oocytárních komplexech o 7 - 30 % v závislosti na koncentraci Na_2S . Nejsilnější inhibiční efekt Na_2S byl zjištěn u koncentrace 0,3 mM. V této koncentraci byla sledována dynamika efektu na průběh meiotického zrání a kumulární expanze. Rozdíl v kumulární expanzi a produkci hyaluronové kyseliny byl statisticky významný již po 36 hod. kultivace v *in vitro* podmínkách. Donor sulfanu urychloval průběh jaderného zrání, rozpad zárodečného váčku, dosažení metafáze I a přechod z meiózy I do meiózy II. Tyto rozdíly byly statisticky významné po 36 hod. kultivace *in vitro*.

Sulfan sehrává fyziologickou úlohu v meiotickém zrání prasečích oocytů a kumulární expanzi. Mechanismus jeho účinku na tyto procesy zatím není znám. Na základě výsledků našich experimentů je však zřejmé, že sulfan akceleruje meiotické zrání a potlačuje kumulární expanzi. Pro úplné objasnění úlohy sulfanu v procesu meiotického zrání a kumulární expanze bude zapotřebí dalších experimentů.

Klíčová slova:

expanze, kumulární buňky, gasotransmiter, sulfan, oocyt, oogeneze

Summary

The current development of reproductive biotechnologies is necessary to generate a large number of high quality oocytes matured *in vitro*. Meiotic maturation represents the necessary changes of oocyte meiotic competent to oocyte capable of fertilization. Meiotic maturation is connected with the process of cumulus expansion. Cumulus expansion involves the production of large amounts of extracellular matrix, which is composed mainly of hyaluronic acid. Meiotic maturation and cumulus expansion are regulated by a number of factors, which include a group of gaseous molecules with a physiological effect, called gasotransmitters. Hydrogen sulphide is one of the most intensively studied gasotransmitters in reproductive biotechnologies.

The aim of the study was to evaluate the effect of donor hydrogen sulphide Na₂S on meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocytes cultured *in vitro*.

Porcine oocytes were cultured *in vitro* with donor hydrogen sulphide Na₂S in concentration of 0.15 to 0.9 mM. After 12 to 48 hrs oocytes were denuded from cumulus cells. The stage of meiotic maturation of oocytes and extracellular matrix were evaluated. The hyaluronic acid was used as indicator of cumulus expansion in the extracellular matrix of cumulus measured spectrophotometrically using QNE Hyaluronic Acid ELISA Assay.

The presence of hydrogen sulphide donor Na₂S (0.3 and 0.6 mM) reduced overall production of hyaluronic acid (7 - 30 %) in porcine cumulus-oocyte complexes after 48 h of cultivation. The most intensive inhibitory effect Na₂S was at the concentration of 0.3 mM. Na₂S reduced total hyaluronic acid production compared to the control group after 36 hrs *in vitro* cultivation.

There were inspected meiotic maturation of porcine oocytes cultured 12 to 48 hours in the presence of the strongest concentration 0.3 mM Na₂S. Donor hydrogen sulphide accelerates significantly germinal vesicle breakdown, metaphase I and the transition from meiosis I to meiosis II after 36 and 48 hours of cultivation.

It is clear that the hydrogen sulphide plays a physiological role in meiotic maturation of porcine oocytes and cumulus expansion. It was found that hydrogen sulfide accelerates meiotic maturation and suppresses cumulus expansion. For a complete clarification of the role of hydrogen sulphide in the process of meiotic maturation and cumulus expansion. Further experiments will be required.

Keywords:

expansion, cumulus cells, gasotransmitter, hydrogen sulphide, oocyte, oogenesis

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární rešerše.....	2
2.1 Oogeneze	2
2.1.1 Embryonální vývoj zárodečných buněk a folikulogeneze	2
2.1.2 Fáze růstu	4
2.1.3 Fáze zrání	6
2.1.4 Faktory regulující meiotické zrání	7
2.2 Gasotransmitery	12
2.3 Sulfan	14
2.4 Kumulární expanze	17
3 Hypotézy a cíl práce.....	22
4 Materiál a metody	23
4.1 Materiál	23
4.1.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů	23
4.1.2 Kultivační médium	23
4.1.3 Použité chemikálie a roztoky	23
4.2 Metody	24
4.2.1 <i>In vitro</i> kultivace kumulo-oocytárních komplexů	24
4.2.2 Fixace a barvení oocytů	24
4.2.3 Měření kumulární expanze	25
4.2.4 Statistická analýza.....	26
4.2.5 Schéma experimentů.....	26
5 Výsledky.....	27
5.1 Vliv koncentrace Na ₂ S na kumulární expanzi a meiotické zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů po 48 hod. kultivace	27
5.2 Vliv nejúčinnější koncentrace donoru sulfanu na průběh kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů	29
6 Diskuse	32
7 Závěr	35
8 Seznam literatury.....	36

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie prodělávají v současné době dynamický rozvoj. Pro další pokrok v chovu a šlechtění hospodářských zvířat jsou biotechnologické metody nezbytné. Limitující pro rozvoj reprodukčních biotechnologií je dostatečný počet kvalitních oocytů dozrálých v podmínkách *in vitro*, které se využívají pro oplození *in vitro*, klonování a transgenezi. Ke zlepšení kvality oocytů je zapotřebí intenzivního studia meiotického zrání včetně kumulární expanze. Vhodným modelem pro studium těchto procesů je prasečí oocyt zejména proto, že prase je multiparní druh s vysokou plodností a jeho chov je hojně rozšířený, což umožňuje získávat dostatečný počet oocytů. Výhodou je také podobnost prasečího oocytu s lidským. Výsledky studia jsou tak využitelné nejen v biotechnologických postupech aplikovaných u hospodářských zvířat, ale i v humánní.

S meiotickým zráním je úzce spjat proces kumulární expanze, kdy kumulární buňky syntetizují velké množství extracelulární matrix. Tím dochází k přerušení komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami. Kumulární expanze je nezbytná pro průběh meiotického zrání, ovulaci a úspěšné oplození. V biotechnologiích je kumulární expanze využívána jako marker vitality kumulo-oocytárních komplexů (COC).

Existuje množství faktorů, které se podílejí na meiotickém zrání oocytů a ovlivňují tak jejich výslednou kvalitu. Mezi tyto faktory lze zařadit skupinu plyných molekul s fyziologickým účinkem, tzv. gasotransmitery. Gasotransmitery byly objeveny v roce 1978, když americký fyziolog Dr. Furchgott objevil v cévním endotelu neznámou látku schopnou rozšiřovat cévy. Později bylo zjištěno, že touto látkou je oxid dusnatý. Tento významný objev byl oceněn Nobelovou cenou v oboru lékařství a fyziologie.

Gasotransmitery byly dříve považovány zejména za látky s toxickým efektem na živé organismy. Nyní je zřejmá jejich významná fyziologická úloha v endogenních koncentracích. V současnosti se studium zaměřuje i na další gasotransmitery, jako je sulfan a oxid uhelnatý. Intenzivně je studována úloha gasotransmiterů v reprodukční soustavě samců a samic, kde se gasotransmitery podílí také na gametogeneze. Vliv gasotransmiterů na meiotické zrání a kumulární expanzi zatím není zcela objasněn a je předmětem intenzivního výzkumu.

2 Literární rešerše

2.1 Oogeneze

Oogeneze je proces přeměny primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells - PGC) v oocyty schopné oplození. Tento proces začíná již v prenatalním období samice, pokračuje v pubertě a probíhá až do klimakteria. Oogeneze tak představuje jeden z vysoce specializovaných a regulovaných procesů ve fyziologii savců (Wassarman *et* Albertini, 1994).

2.1.1 Embryonální vývoj zárodečných buněk a folikulogeneze

Oogeneze začíná vývojem primordiálních zárodečných buněk v časné fázi embryogeneze. Tyto velké buňky jsou extragonadálního původu a mají základ ve žloutkovém váčku embrya. Primordiální zárodečné buňky migrují z kaudální strany žloutkového váčku, nejprve pasivně přes epitel prvostřeva, později améboidním pohybem do míst pozdějšího vývoje gonád (Wassarman *et* Albertini, 1994). Migraci lze také vysvětlit pasivním posouváním primordiálních zárodečných buněk vlivem růstu embrya (Freeman, 2003).

Po ukončení migrace primordiálních zárodečných buněk do genitálních lišt se tyto buňky meioticky dělí a diferencují na oogonie, pro které je charakteristické další intenzivní mitotické dělení. V reprodukční biologii platilo dogma, že schopnost obnovovat zárodečné buňky ztrácejí samice již v období fetálního vývoje a zásoba oogonií tak po narození nenarůstá a je konečná (Wassarman, 1988). Tuto teorii však vyvrátil Johnson *et al.* (2004), který prokázal přítomnost zárodečných kmenových buněk (germ stem cells - GSCs) na ovarích myši. Zárodečné kmenové buňky tak udržují neustálou produkci oocytů a folikulů v postnatálním životě samice (Johnson *et al.*, 2004).

Během prenatalního vývoje vstupují oogonie do meiózy, procházejí stádií profáze 1. meiotického dělení - leptotenne, zygotenne a pachytenne (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998). Ve fázi diplotene (dictyotene) se meióza spontánně zastaví, tyto buňky se označují jako primární oocyty v 1. meiotickém bloku (Wassarman, 1988). Meióza začíná u prasnic 40. až 50. den prenatalního vývoje a pokračuje do 5. - 20. dne po narození (Black *et* Erickson, 1968; Wassarman, 1988). Ke znovu zahájení meiotického dělení dochází po tzv. fázi růstu oocytu. Pouze plně dorostlé oocyty jsou schopny pokračovat v meióze (Wassarman, 1988).

Ve fázi množení se oogonie začínají obklopotvat somatickými buňkami, které tvoří základ granulózniých buněk pozdějšího folikulu.

Folikulogeneze

Folikulární vývoj začíná krátce po osídlení genitálních lišt primordiálními zárodečnými buňkami v prenatalním vývoji, kdy se formují tzv. klastry tvořené oogoniemi. Oogonie jsou obklopené somatickými buňkami, prekurzory granulózniých buněk. Zahájení meiózy oogonií a jejich přeměnou v oocyty je podnětem pro rozdělení klastru v jednotlivé buňky obklopené jednou vrstvou plochých pre-granulózniých buněk. Tyto útvary se označují jako primordiální folikuly, které jsou od sebe navzájem odděleny (Merchant-Larios *et Chimal-Monroy*, 1989). Po dokončení organogeneze vaječnicků jsou folikuly lokalizovány v matrix z kolageniých a elastických vláken v korové části vaječnicku (Červený *et al.*, 1999).

Pre-granulóznií buňky primordiálního folikulu se v dalším vývoji dělí a dochází k jejich proliferaci a diferenciaci, mění svůj tvar z plochých na kubické a vzniká primární folikul. Kubické buňky jsou označovány jako granulóznií buňky. Folikulárním růstem po dosažení pohlavní dospělosti samice vznikají sekundární folikuly, které jsou charakteristické 2 a více vrstvami granulózniých buněk (Fair, 2003).

Granulóznií buňky dále diferencují na kumulární buňky a murální granulóznií buňky. Kumulární buňky obklopují oocyt a jejich nejvnitřnější vrstva je nazývána *corona radiata*. Murální granulóznií buňky tvoří výstelku stěny folikulu (Buccione *et al.*, 1990). Kumulární buňky komunikují s oocytem prostřednictvím mezibuněčných spojů typu gap junction. Tato spojení jsou tvořena proteiny z rodiny konnexinů. Spojení gap junction mezi kumulárními buňkami tvoří převážně connexin 43, mezi kumulárními buňkami a oocytem se uplatňuje především connexin 37 (Kidder *et Mhawi*, 2002).

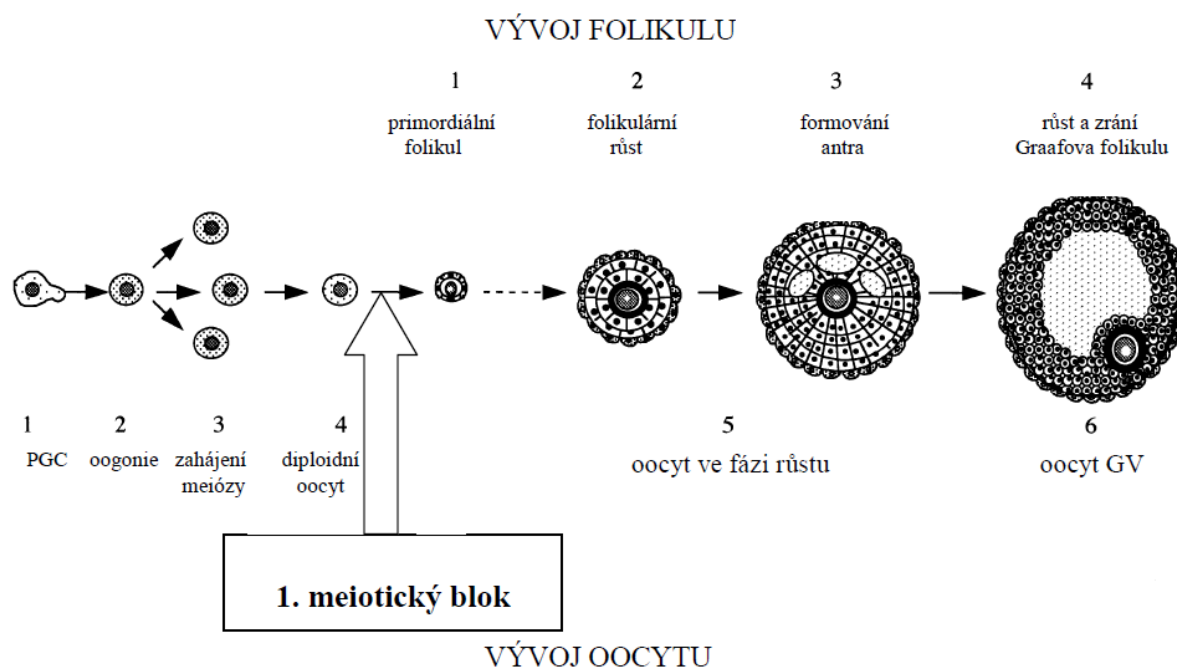
Pokračujícím růstem vznikají terciární antrální folikuly, pro něž je charakteristická dutina (tzv. *antrum*), vyplněná folikulární tekutinou. Zralé antrální folikuly jsou také nazývány Graafovi folikuly (Aerts *et Bols*, 2010).

Důležitým regulačním faktorem post-pubertální folikulogeneze je hormonální stimulace gonadotropiny. Pro vývoj folikulů je nezbytný folikulostimulační hormon (FSH). Receptory pro FSH mají v primordiálních folikulech granulóznií buňky, které se současně podílejí na regulaci růstu oocytu (Senbon *et al.*, 2003) produkcí růstových faktorů (Nilsson *et Skinner*, 2001). Schopnost aktivace růstu primordiálního folikulu souvisí rovněž se stupněm vývoje oocytu. Oocyt musí dosáhnout 1. meiotického bloku, aby mohl folikul podstoupit fázi

růstu (Yang *et Fortune*, 2008). K procesu folikulogeneze přispívá oocyt produkcí transkripčních faktorů (Soyal *et al.*, 2000) a růstových faktorů, např. růstového diferenciačního faktoru 9 (growth differentiation factor 9 - GDF9), kostního morfogenetického proteinu 15 (bone morphogenetic protein 15 - BMP15) (Elvin *et al.*, 2000; Knight *et Glister*, 2003) a fibroblastového růstového faktoru (fibroblast growth factor - FGF) (Nilsson *et al.*, 2001).

Stádia savčí oogeneze a folikulogeneze jsou znázorněny na obrázku 1. od vývoje primordiálních zárodečných buněk (PGC) do fáze zárodečného váčku (germinal vesicle – GV) v Graafově folikulu.

Obr. 1. Folikulogeneze a oogeneze (upraveno dle Picton *et al.*, 1998)



2.1.2 Fáze růstu

Oocyty jsou během fáze růstu intenzivně metabolicky aktivní, mnohonásobně zvětšují svůj objem a dochází ke změnám v jejich struktuře. Prasečí oocyty zvětší svůj průměr z 30 μm na 120 μm (Motlík *et Fulka*, 1986).

Výběr oocytů, které vstoupí do fáze růstu, je patrně regulován hypofyzárními gonadotropiny. Oocyty jsou schopné růstu i bez stimulace gonadotropiny, jak bylo zjištěno u samic s odstraněnou hypofýzou či v podmínkách *in vitro* (Wang *et* Greenwald, 1993).

Oocyty rostou současně s folikulem, v jehož prostředí se oocyt nachází a podstupují společně řadu morfologických stádií. Oocyt dokončuje svůj růst před vytvořením dutiny folikulu. K růstu většiny folikulů tak dochází až po ukončení růstu oocyty. Růst oocyty je kontinuální děj končící buď ovulací zralého oocyty nebo atrézií oocyty i jeho folikulu (Wassarman, 1988).

Ve fázi růstu oocyty se současně s oocytem zvětšuje také jádro - zárodečný váček (germinal vesicle - GV). Současně s jádrem podléhá progresivním změnám i jádérko, nutné pro intenzivní syntézu rRNA (Wassarman, 1988).

Ve fázi růstu se výrazně mění počet a struktura mitochondrií, které mají v nedorostlém oocyty protáhlý tvar, četné příčně orientované krysty a obvykle jedinou vakuolu. S pokračujícím růstem se hromadí mitochondrie oválného a kulatého tvaru, vakuolizované s cylindricky uspořádanými krysty. Ve fázi růstu je také mnoho mitochondrií pozorováno ve tvaru činky, což je ukazatelem jejich intenzivního růstu a dělení. Plně vzrostlé oocyty obsahují kulaté nebo oválné, průměrně 0,5 μm velké, plně vakuolizované mitochondrie, se soustředně uspořádanými klenutými krysty (Wassarman, 1988).

Vylučováním glykoproteinů vzniká během růstu *zona pellucida* (ZP), glykoproteinová membrána, která tvoří ochranný obal kolem oocyty. Glykoproteiny, vylučované oocytem během růstu, vytváří mezi oocytem a kumulárními buňkami dlouhá, pravidelně uspořádaná filamenta. Ta společně s růstem přibývají, propojují se a tvoří tak hustou síť silnou až 15 μm , která obklopuje oocyt (Wassarman *et* Albertini, 1994). K udržování strukturální integrity jsou nezbytné zonální glykoproteiny ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Dlouhá vlákna jsou tvořena heterodimery ZP2 a ZP3. ZP1 pak slouží jako spojovací článek utvářející trojrozměrnou strukturu (Bleil *et* Wassarman, 1980). Kromě stavební funkce má každý z glykoproteinů také svou biologickou funkci. ZP3 tak slouží jako primární receptor pro spermie a iniciuje akrozomální reakci. ZP2 se uplatňuje jako sekundární receptor, na který se spermie váže, a který usnadňuje spermii pronikání skrz *zona pellucida* (Picton *et al.*, 1998). Zonální glykoproteiny jsou také nezbytné pro normální vývoj folikulů (Hurk *et* Zhao, 2005).

V kortikální oblasti se během růstu formují kortikální granula, malé kulovité orgány, které během oplodnění splynou s cytoplazmatickou membránou oocyty, tzv. oolemou, a uvolní svůj obsah do perivitellinního prostoru. Tento děj způsobuje při oplodnění změny ve funkčních vlastnostech *zona pellucida* a zabraňuje tak vzniku polyspermie. Kortikální granula

se v oocytu akumulují a jejich počet výrazně roste před ovulací a možným oplodněním (Wassarman, 1988). Populace kortikálních granul je heterogenní a jejich vznik je odvozen od Golgiho komplexu, endoplazmatického retikula a multivezikulárních tělísek (Wassarman, 1988). S rostoucí produkcí kortikálních granul je spojeno zvětšování Golgiho komplexu a endoplazmatického retikula (Hyttel *et al.*, 1999).

Během fáze růstu se zvyšuje absolutní počet ribozomů, jejich koncentrace ale v důsledku rostoucího objemu cytoplazmy klesá. Syntéza RNA začíná s měnící se strukturou jadérka, v kterém se utváří fibrilární centra. Zvyšuje se aktivita RNA-polymerázy, probíhá transkripce a zvětšuje se tak množství RNA v oocytu (Wassarman, 1988).

Syntéza a akumulace RNA je nezbytná pro proteosyntézu. Během fáze růstu jsou intenzivně syntetizovány především zmíněné zonální glykoproteiny, dále strukturní proteiny tubulin a aktin, mitochondriální a ribozomální proteiny, proteiny kortikálních granul a histony (Wassarman *et al.*, 1994).

Po dokončení fáze růstu je oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV-oocyt), plně dorostlý a meioticky kompetentní. Meiotická kompetence spočívá ve znovuzahájení a dokončení meiotického zrání, tedy ve schopnosti projít rozpadem zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown – GVBD) a přechodem z 1. meiotického dělení do 2. meiotického dělení (Wassarman, 1988). Nedorostlé prasečí oocyty o velikosti 100 - 110 μm mají jen neúplnou meiotickou kompetenci. Jsou schopné prodělat GVBD, ale nepokračují dále v meiotickém zrání (Sorensen *et al.*, 1976). Úplné meiotické kompetence dosáhnou pouze plně dorostlé prasečí oocyty po dosažení velikosti 120 μm (Motlík *et al.*, 1984).

2.1.3 Fáze zrání

Meióza, též meiotické dělení, je specializované buněčné dělení. Z diploidních primordiálních buněk v procesu oogeneze vznikají haploidní gamety, nezbytné pro pohlavně se rozmnožující organismy. Meióza sestává ze dvou po sobě následujících dělení, jejichž hlavním cílem je rekombinace genetického materiálu, náhodná segregace chromozómů do gamet a redukce počtu chromozómů (Gowen, 1933; Kleckner, 1996).

1. meiotické dělení (meióza I), také redukční dělení, je charakteristické párováním zreplikovaných homologních chromozómů, čímž vznikají tzv. bivalenty se čtyřmi chromatidami. To umožňuje překřížení nesesterských chromatid, tzv. crossing-over, při

kterém dochází k rekombinaci genů. Mezi prvním a druhým meiotickým dělením nedochází k replikaci DNA a při druhém meiotickém dělení se sesterské chromatidy rozcházejí jako při běžné mitóze (Alberts et al., 1998).

Savčí oocyt vstupuje do meiózy krátce po začátku oogeneze. Meiotické dělení je záhy přerušeno tzv. 1. meiotickým blokem, v diktyotene profáze 1. meiotického dělení (Eppig *et* Downs, 1984; Wassarman, 1988).

Meiotické zrání začíná uvolněním 1. meiotického bloku a procesem GVBD (Thibault *et al.*, 1987). Ten je zahájen mírným zvlněním jaderné membrány a kondenzací chromozomů. Postupně dochází k úplnému rozptýlení jaderné membrány do membránových dubletů a její agregaci s endoplazmatickým retikulem (Wassarman, 1988). V prostředí *in vivo* je proces GVBD regulován sekrecí luteinizačního hormonu (Dekel *et al.*, 1981), v podmínkách *in vitro* podstupuje oocyt GVBD spontánně po uvolnění z folikulu a přerušeni komunikace s kumulárními buňkami (Wassarman, 1988).

Po dosažení metafáze II je meiotické zrání spontánně zablokováno v 2. meiotickém bloku. Meióza je kompletně dokončena až po oplození (Wassarman, 1988). Fáze zrání v podmínkách *in vitro* u prasete trvá přibližně 44 – 48 hod. (Hirao *et al.*, 1994; Hurk *et* Zhao, 2005).

Během zrání musí oocyt podstoupit řadu změn, jako je například reorganizace organel, syntéza a uchování transkriptů a proteinů a změny v buněčném metabolismu (Krisher, 2004). Během zahájení GVBD mitochondrie agregují kolem zárodečného váčku a poskytují zdroj energie. Kortikální granula se posouvají směrem k cytoplazmatické membráně, jejich správná lokalizace je podstatná zejména v průběhu oplození. Během vydělení 1. pólového tělíška dochází k tvorbě perivitelinního prostoru (Thibault *et al.*, 1987). Důležitá je také reorganizace cytoskeletu, která zajistí asymetrické dělení oocytu (Krisher, 2004). Pro strukturální změny oocytu během zrání jsou nezbytné změny v aktivitě klíčových faktorů v cytoplazmě, kde regulují meiotické zrání.

2.1.4 Faktory regulující meiotické zrání

Na znovu zahájení meiózy se podílí gonadotropní hormony FSH a LH (Eppig *et* Downs, 1984). Své účinky uplatňují prostřednictvím kumulárních buňček, které disponují receptory v cytoplazmatických membránách (Peng *et al.*, 1991). Vazba gonadotropních

hormonů na receptory kumulárních buněk ovlivňuje uvolnění druhých buněčných posílů. To vede k výstupu z prvního meiotického bloku a znovuzahájení meiózy. Touto cestou se na znovuzahájení meiózy podílí cAMP, cGMP a Ca^{2+} ionty (Lindner, *et al.*, 1974; Downs, *et al.*, 1988; Eppig, 1989).

Ca^{2+} ionty

Ca^{2+} ionty plní úlohu intracelulárního posla. Vážou se na specifické intracelulární proteiny, z nichž je nejčtenější kalmodulin (CaM). Při vazbě Ca^{2+} na kalmodulin dojde ke změně konformace, která umožňuje vázat cílové proteiny a měnit jejich aktivitu. Důležitým cílem pro tento komplex jsou Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kinázy (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases - CaMKs), které fosforylují další proteiny (Alberts *et al.*, 1998).

LH-indukovaný nárůst koncentrace Ca^{2+} v kumulárních buňkách předchází vzestupu Ca^{2+} v oocyty (Mattioli *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2013). Ca^{2+} ionty v oocyty aktivují další Ca^{2+} -dependentní signální dráhy zapojené do regulace zrání. Jedním z možných cílů Ca^{2+} v oocyty je adenylát-cykláza. U hlodavců je jedna z Ca^{2+} /kalmodulin dependentních protein kináz (CaMKII) schopná adenylát-cyklázu inaktivovat. To vede k poklesu koncentrace cAMP a znovu zahájení meiózy (Horner *et al.*, 2003). Naopak v kumulárních buňkách skotu rostoucí koncentrace Ca^{2+} iontů zvyšuje hladinu cAMP (Lastro *et al.*, 2006). Další z možných cílů Ca^{2+} iontů je zrání/M-fázi podporující faktor (maturation/M-phase promoting factor – MPF). Prasečí oocyty vystavené inhibitoru CaMKII nebo antagonistům kalmodulinu nejsou schopné akumulovat regulační podjednotu MPF cyklin B a nedokážou plně fosforylovat mitogeny aktivované protein kinázy (mitogen activated protein kinases – MAPK). Oocyty tak nemohou znovu zahájit meiózu (Fan *et al.*, 2003).

Ca^{2+} ionty také aktivují signální dráhu MAPK v kumulárních buňkách, která je zapojena do sekrece progesteronu a estrogenu (Miyoshi *et al.*, 2007; Ebeling *et al.*, 2011).

V současné době je prokázána významná úloha dalšího prvku v meiotickém zrání oocyty, kterým je zinek (Zn). Bylo dokázáno, že zinek je nezbytný pro dokončení meiózy oocytů myši (Kim *et al.*, 2010) a podílí se na prevenci předčasněho rozpadu zárodečného váčku (Kong *et al.*, 2012). Zinek je také potřebný pro vytvoření druhého meiotického bloku prostřednictvím zinek vázajícího proteinu - inhibitoru časně meiózy 2 (early meiosis inhibitor 2 – EMI2), který inhibuje anafázi podporující komplex (anaphase promoting komplex), což vede k degradaci cyklinu B1 během metafáze II (Shoji *et al.*, 2006). Hladinu zinku v oocyty regulují kumulární buňky, které jsou schopné potlačovat zinek v oocyty během zrání (Lisle *et al.*, 2013).

cAMP

Hladina cAMP v savčích oocytech hraje klíčovou roli v meiotickém zrání. cAMP působí jako inhibitor meiotického zrání. cAMP je syntetizován adenylát-cyklázou a štěpen fosfodiesterázou. Pokles cAMP je způsoben potlačení aktivity adenylát-cyklázy a aktivací fosfodiesterázy katalyzující štěpení fosfodiesterové vazby cAMP (Conti, 1998).

Vysoká koncentrace cAMP v savčím oocytu udržuje diktyotenní blok prostřednictvím aktivní cAMP-dependentní proteinkinázy (cAMP-dependent protein kinase - PKA), která potlačuje aktivaci faktorů podporujících meiotické zrání. Preovulační LH vlna způsobuje pokles koncentrace cGMP v granulózních buňkách a v oocytu. Pokles koncentrace cGMP je odpovědný za aktivaci fosfodiesterázy a degradaci cAMP. Nízká koncentrace cAMP umožní aktivaci MPF a znovu zahájení meiózy (Conti *et al.*, 2012).

MPF (maturation/M-phase promoting factor - zrání/M-fázi podporující faktor)

Fosforylační a defosforylační kaskády se podílejí na regulaci meiotického zrání. Protein, který je odpovědný za nástup zrání oocytu a rozpad zárodečného váčku se označuje jako MPF (Masui *et Markert*, 1971; Sorensen *et al.*, 1985; Gordo *et al.*, 2001)

MPF je komplex tvořený dvěma podjednotkami: regulační a katalytickou. Regulační podjednotkou je cyklin B, který má 3 typy – B1, B2 a B3. Za aktivitu MPF je u savců odpovědný typ B1. Katalytickou podjednotkou je serin/threonin kináza (serine/threonine kinase - p34^{Cdc2}). Po asociaci obou podjednotek je p34^{Cdc2} fosforylována na 14-treoninu (T14) a 15-tyrosinu (Y15) inhibičními kinázami Myt1 a Wee1. V této inaktivní formě (pre-MPF) je komplex akumulován během fáze růstu oocytu (Norbury *et Nurse*, 1992; Nebreda *et al.*, 1995). Znovu zahájení meiotického dělení, je závislé na defosforylaci inhibičních fosfátů na T14 a Y15 fosfatázou cdc25 (Taieb *et al.*, 1997; Trounson *et al.*, 2001). Za aktivaci cdc25 je odpovědná polo-kináza 1 (Polo-like kinase 1 – Plk1) (Abrieu *et al.*, 1998; Karašskou *et al.*, 1999). Aktivace pre-MPF vyžaduje také inhibici kinázy Wee1 (Coleman *et Dunphy*, 1994). Na aktivaci fosfatázy cdc25 a inhibici kinázy Wee1 se podílí také samotné MPF a tyto procesy jsou tak součástí tzv. autoakcelerační smyčky MPF (Nebreda *et al.*, 1995).

Aktivní MPF fosforyluje laminy jaderné membrány. Fosforylace jaderných laminů způsobuje desintegraci jaderné membrány a GVBD. MPF je odpovědný za fosforylaci histonů a kondenzaci chromatinu (Alberts *et al.*, 1998).

Po dosažení metafáze I dochází k přechodnému poklesu aktivity MPF (viz obr. 2), kdy dochází k vydělení prvního pólového tělíska. Přechod z metafáze I do anafáze I je způsoben poklesem aktivity MPF. K poklesu aktivity MPF dochází prostřednictvím degradace cyklinu B. Ta je realizována ubiquitin-dependentní proteolýzou. MPF reguluje spojení cyklinu B a ubiquitinu, což vede k jeho rychlé destrukci (Glotzer *et al.*, 1991).

K dosažení metafáze II a dokončení meiotického zrání oocyty dochází po další reaktivaci MPF (Hampl, 1995; Sugiura *et al.*, 2006). Aktivita MPF zůstává v MII-oocytech vysoká až do aktivace oocyty spermií a podílí se tak na udržení 2. meiotického bloku (Yanagimachi, 1988).

MAPK (mitogeny aktivovaná protein kináza – mitogen activated protein kinase)

Dalším známým faktorem zepojeným do regulace zrání je mitogeny aktivovaná protein kináza (MAPK, extracellular signal-regulated kinase – ERK). MAPK patří do skupiny serin/treonin proteinkináz a nabývá několika izoform, z nichž jsou nejčastěji exprimovány izoformy MAPK1 (ERK1) a MAPK2 (ERK2) (Davis, 1993).

Aktivace MAPK je regulována signální kaskádou, zahájenou aktivací MAPKKK (Mos), která aktivuje MAPKK (Mek). Mek kináza aktivuje MAPK fosforylací serinových a treoninových zbytků (Matsuda *et al.*, 1992). Celá kaskáda je regulována prostřednictvím G-proteinů a membránových tyrozin-kináz (Roux *et al.*, 2004) a přenáší tak u eukaryot různé extracelulární signály ke svým intracelulárním cílům (Davis, 1993; Nishida *et al.*, 1993).

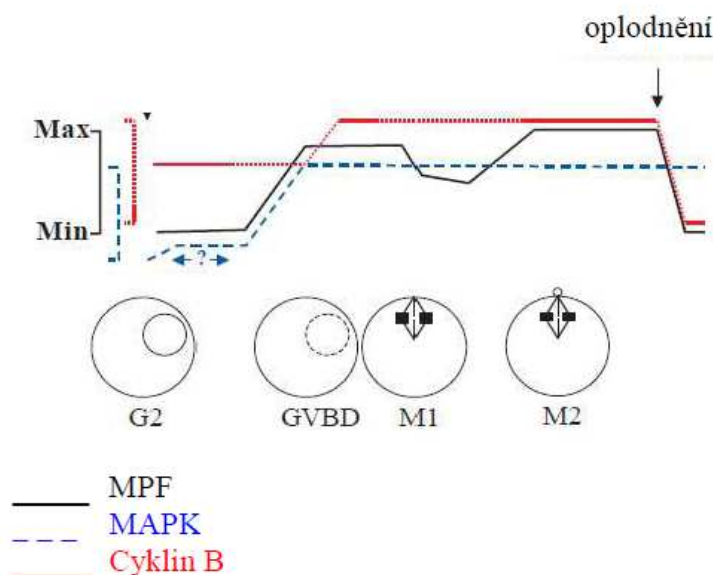
Obě nejčastější izoformy MAPK (ERK1 a ERK2) jsou přítomné v prasečím oocyty ve fázi GV a jejich výrazná aktivace byla zjištěna v metafázi I (MI) meiotického zrání, což poukazuje na zapojení MAPK kaskády do regulace zrání (Inoue *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1996). Další studium prasečích oocytů ukázalo, že neaktivní MAPK je lokalizována v cytosolu oocytů ve stadiu GV a část aktivní MAPK se přemisťuje do zárodečného váčku těsně před GVBD. Exogenní zdroj MAPK indukuje GVBD, což naznačuje, že MAPK zprostředkovává zrání indukující signály z cytoplazmy do jádra a způsobuje tak znovu zahájení meiózy (Inoue *et al.*, 1998).

Aktivita MAPK v prasečích oocytech vzrůstá současně s aktivitou MPF. Aktivita MAPK zůstává na rozdíl od aktivity MPF vysoká i během přechodného poklesu MPF v anafázi I a telofázi I (Sun *et al.*, 2001)

MAPK v oocytu fosforyluje cytoskeletární proteiny a jaderné laminy, které se podílejí na meiotickém dělení (Wehrend *et* Meinecke, 1998). Aktivní MAPK je potřebná k udržení kondenzovaného stavu chromozómů a vydělení pólového tělíska (Hunter, 2000).

Možná úloha aktivních MAPK v granulózních buňkách je podporovat meiózu aktivující sterol (meiosis activating sterol - MAS), který prostřednictvím spojů gap junction indukuje aktivaci MPF (Jin *et al.*, 2006). Další úlohou může být stimulace syntézy steroidů, které se vážou na receptory oocytu a aktivují tak MAPK v oocytu (Jamnongjit *et al.*, 2005). Aktivní MAPK v granulózních buňkách mohou také inaktivovat connexin 43 a connexin 37. Inaktivací těchto konnexinů je ukončen přenos cAMP do oocytu (Sela-Abramovich *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2006). Defosforylace konnexinů a desintegrace gap junction přispívají ke znovu zahájení meiózy v důsledku omezení toku inhibičních faktorů meiotického zrání do oocytu (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

Obr. 2. Aktivita MPF, MAPK a cyklinu B v oocytu (upraveno dle Abrieu *et al.*, 2001)



Zmíněné faktory jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu také v somatických buňkách. V tělních tkáních se na buněčné signalizaci podílí rovněž plynné molekuly s fyziologickým významem, tzv. gasotransmitery. Intenzivně je zkoumána jejich úloha v reprodukční soustavě, včetně jejich zapojení do regulace meiotického zrání.

2.2 Gasotransmitery

Gasotransmitery jsou plynné molekuly uvolňované specifickými enzymy, které jsou exprimovány v různých savčích tkáních. V endogenních koncentracích se gasotransmitery podílejí na buňčné signalizaci. Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO) (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987), sulfan (H₂S) a oxid uhelnatý (CO) (Wang, 2002).

Každý z těchto gasotransmiterů plní v živočišných buňkách úlohu druhého posla a je zapojen do řady fyziologických procesů prostřednictvím buněčných a molekulárních cílů (Mustafa *et al.*, 2009). Gasotransmitery jsou schopny volně prostupovat přes membrány a k signalizaci tak nevyužívají membránových receptorů (Wang, 2002). Jejich účinky na buňku mohou být zprostředkovány dalším druhým poslem a jejich signální dráhy se vzájemně propojují (Pae *et al.*, 2009). Společným rysem gasotransmiterů je také rychlá degradace po jejich uvolnění (Wang, 2002).

Gasotransmitery se podílejí na regulaci fyziologických procesů jako je cévní homeostáza, přenos nervových vzruchů, obranyschopnost nebo zánět (Pae *et al.*, 2009). Gasotransmitery uplatňují svou funkci také v samčí i samičí reprodukční soustavě. U samic pak mají vliv na hormonální regulaci, kontrakce děložní svaloviny, vývoj oocytů a meiotické zrání (Šmelcová *et Tichovská*, 2011).

Gasotransmitter oxid dusnatý je v organismu syntetizován syntázou oxidu dusnatého (NOS). NOS se vyskytuje ve třech izoformách, které jsou pojmenované podle první lokalizace v organismu. Indukovatelná NOS (iNOS) byla poprvé nalezena v makrofázích, endoteliální NOS (eNOS) v cévním endotelu a nervová NOS (nNOS) v nervové tkáni. Všechny izoformy NOS umožňují produkci oxidu dusnatého katalýzou konverze L-argininu na citrulin a oxid dusnatý (Lamas *et al.*, 1992).

V prasečích oocytech byla detekována mRNA všech izoform NOS a v kumulárních buňkách mRNA izoformem eNOS a iNOS (Chmelíková *et al.*, 2010).

Oxid dusnatý se uplatňuje svými účinky v kardiovaskulárním systému při regulaci krevního tlaku (Gómez-Fernández *et al.*, 2004), v imunitním systému (Broillet, 1999) a v centrální nervové soustavě (Muramatsu *et al.*, 2000). V reprodukční soustavě samců ovlivňuje oxid dusnatý hormonální regulaci (McCann, 1982), je zapojen do spermatogeneze (Davidoff *et al.*, 1997) a do regulace erekce (Ignarro *et al.*, 1990). V samičí reprodukční soustavě má oxid dusnatý vliv na kontraktilitu dělohy a udržení březosti (Farina *et al.*, 2001). Stejně jako u samců, i u samic má oxid dusnatý vliv na hormonální regulaci (Van Voorhis *et al.*, 1995) a vývoj zárodečných buněk. Zapojení oxidu dusnatého do regulace meiotického

zrání je nezbytné pro přechod z meiózy I do meiózy II (Jablonka-Shariff *et al.*, 1998). NOS je exprimována v cytoplazmě oocyty i v kumulárních buňkách. Během meiotického zrání je oxid dusnatý produkován kumulo-oocytárním komplexem (COC) a je nezbytný pro GVBD a dosažení MII (Chmelíková *et al.*, 2010).

Gasotransmitter oxid uhelnatý je v buňkách uvolňován enzymem hem oxygenázou (HO) během degradace hemu (Tenhunen *et al.*, 1969). HO se vyskytuje ve třech izoformách – HO1, HO2 a HO3. HO1 je produkována buňkami zejména vlivem buněčného stresu (Chin *et al.*, 2009). HO2 byla detekována v cévním endotelu, kde se podílí na relaxaci cév (Zakhary *et al.*, 1996). HO3 se uplatňuje v regulaci buněčných procesů vázaných na hem (McCoubrey *et al.*, 1997). V somatických buňkách je jednou z cílových molekul hem oxygenázy guanylát-cykláza, která syntetizuje cGMP (Morita *et al.*, 1995).

Oxid uhelnatý se podílí na regulaci zánětlivých procesů (Freitas *et al.*, 2006), reguluje cévní tonus (Johnson *et al.*, 2000), má antiapoptotické účinky (Soares *et al.*, 2002) a účastní se přenosu nervového vzruchu (Johnson *et al.*, 2000). Podobně jako oxid dusnatý se i oxid uhelnatý uplatňuje v samčí a samičí reprodukční soustavě (Lamar *et al.*, 1996). Tak jako v somatických buňkách, lze předpokládat zapojení oxidu uhelnatého do regulace cGMP v granulózních buňkách, kde byla hem oxygenáza detekována (Harada *et al.*, 2004).

2.3 Sulfan

Sulfan (H_2S) je bezbarvý hořlavý plyn s charakteristickým zápachem. Ve vysokých koncentracích je sulfan toxická látka s širokospektrálním účinkem na orgánové soustavy. Toxickým účinkům podléhají zejména sliznice dýchacích cest a tkáně náročné na zásobení kyslíkem, především centrální nervová soustava (Reiffenstein *et al.*, 1992). Endogenně uvolňovaný sulfan se uplatňuje ve fyziologických procesech savců (Wang, 2002).

Sulfan je v savčích buňkách endogenně syntetizován enzymy cystationin γ lyázou (cystathionine γ lyase - CSE), cystationin β syntázou (cystathionine β synthase - CBS) (Wang, 2002) a 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase - 3-MST) (Shibuya *et al.*, 2009). CSE a CBS patří mezi pyridoxal-5-fosfát dependentní enzymy (Stipanuk *et Beck*, 1982) a jejich společným substrátem je sirná aminokyselina L-cystein (Chen *et al.*, 2004). Pro 3-MST je substrátem 3-merkaptopyruvát (Shibuya *et al.*, 2009). CBS a CSE jsou enzymy zodpovědné za produkci většiny endogenního sulfanu v organismu savců (Zhao *et al.*, 2001). Dalším zdrojem endogenního sulfanu je redukce elementární síry na sulfan při oxidaci glukózy (Searcy *et Lee*, 1998)

CSE, také cystationáza (cystathionase - CTH), štěpí cystathionin na cystein a katalyzuje další reakce L-cysteinu, L-cystinu a L-homoserinu (Stárka, 2009). CBS je enzym, který tvoří cystathionin. Katalyzuje β -substituci mezi L-serinem, L-cysteinem, cysteinovými thioetery, dalšími β -substituovanými R-L-aminokyselinami nebo mezi různými merkaptany (Braunstein *et al.*, 1971; Nakagawa *et Kimura*, 1968; Schlossmann *et al.*, 1962).

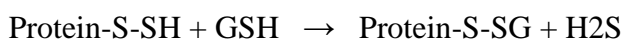
Expres CBS a CSE je tkáňově specifická (Zhao *et al.*, 2001). CBS je exprimována v hipokampu, mozečku, mozkové kůře a v mozkovém kmeni (Awata *et al.*, 1995). Aktivita a exprese CSE je vyšší v aortě, mezenterických tepnách, portálních žilách a jiných cévních tkáních (Hosoki *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001). CSE se tedy uplatňuje především v kardiovaskulárním systému (Wang, 2002), zatímco v centrální nervové soustavě dominuje CBS. V některých tkáních jsou CSE i CBS pro produkci sulfanu nezbytné obě (Wang, 2002; Boehning *et Snyder*, 2003).

Expres CSE a CBS byla také zjištěna v samčí a samičí reprodukční soustavě. U samců je CBS přítomna v Leidigových, Sertoliho a zárodečných buňkách, CSE jen v Sertoliho buňkách a nezralých zárodečných buňkách (Sugiura *et al.*, 2005). U samic jsou tyto enzymy exprimovány v děloze a placentě (Patel *et al.*, 2009), vysoká exprese CBS byla

prokázána také v granulózních a kumulárních buňkách (Liang *et al.*, 2006) a v kumulo-oocytárních komplexech (Regassa *et al.*, 2011).

Sulfan je v organismu nejčastěji metabolizován na sulfát a thiosulfát prostřednictvím mitochondriální oxidace (Caliendo *et al.*, 2010), malá část sulfanu je v cytoplazmě metylována na methylmerkaptan a dimethylsulfát. Třetí možnou cestou katabolismu je vazba na hemoglobin (Stárka, 2009).

Signalizace sulfanu nejčastěji spočívá v tzv. sulfhydrataci proteinů (Mustafa *et al.*, 2009; Sen *et Snyder* 2010). Sulfhydratace je proces, v němž sulfan váže další atom síry k thiolové skupině (-SH) cysteinového zbytku v proteinech, tedy tvoří hydropersulfidovou skupinu (-SSH) a tím sulfan aktivuje enzymy (Mustafa *et al.*, 2009). Vnější atom síry této skupiny je silně redoxně labilní a je snadno přeměněn redukčními činidly, jako je dithiothreitol, cystein nebo glutathion (GSH), na sulfan (Beinert, 2000):



Sulfhydratací se síra váže k mnoha proteinům, jedná se např. o albumin, aktin, β -tubulin, CSE, CBS, některé fosfatázy a katalázy či glycerinaldehyd – 3 – fosfát dehydrogenázy (Mustafa *et al.*, 2009).

Nejlépe jsou účinky sulfanu popsány v krevním oběhu. Sulfan je produkován v srdci a v hladkosvalových buňkách cévních stěn (Geng *et al.*, 2004) a vyvolává hyperpolarizaci a vasorelaxaci cévního endotelu a hladkosvalových buněk aktivací draselných kanálů (Mustafa *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2008). V centální nervové soustavě je sulfan uvolňován především v hipokampu a mozkové kůře a podílí se na přenosu informací mezi nervovými buňkami a na procesu utváření paměti. Fyziologická koncentrace sulfanu v mozkové tkáni je 50 – 160 μM (Abe *et Kimura*, 1996). Svými antioxidačními účinky sulfan předchází oxidačnímu poškození buněk (Taniguchi *et al.*, 2011). Sulfan je schopen inhibovat expresi prozánětlivých faktorů (Oh *et al.*, 2006) a potlačovat procesy stárnutí buněk a organismu. Sulfan působí cytoprotektivně a anti-apoptoticky (Zhang *et al.*, 2013), v nádorových buňkách však může působit i pro-apoptoticky (Predmore *et al.*, 2012).

Svými účinky se sulfan uplatňuje také v samčí reprodukční soustavě, kde má proerektivní funkci (Srilatha *et al.*, 2006) a v samičí reprodukční soustavě (Srilatha *et al.*, 2009), kde tlumí děložní kontrakce (Sidhu *et al.*, 2001) a relaxuje hladké svalstvo

prostřednictvím signální dráhy oxidu dusnatého (Srilatha *et al.*, 2009). Vyblokováním genu pro CBS u myši dochází k poruchám plodnosti (Guzmán *et al.*, 2006). Potlačení exprese enzymu CBS v granulózních buňkách vede k inhibici meiotického zrání (Liang *et al.*, 2007), předpokládáný je vliv sulfanu také na kumulární expanzi.

2.4 Kumulární expanze

Savčí oocyty jsou v Graafově folikulu bezprostředně obklopeny kompaktní vrstvou kumulárních buněk. Ty jsou součástí tzv. vejconosného hrbolku - *cumulus oophorus*. Kumulární buňky jsou zapojeny v růstu a zrání oocytů a společně s oocytem tvoří kumulo-oocytární komplex (COC) (Dekel *et al.*, 1979).

V primárních folikulech, které obsahují rostoucí oocyt, proliferují granulózní buňky. Během utváření dutiny folikulu granulózní buňky diferencují na kumulární buňky a murální buňky. Kumulární buňky obklopují oocyt. Murální granulózní buňky tvoří výstelku stěny folikulu (Buccione *et al.*, 1990).

Kumulární buňky pak společně s oocytem vytvářejí mezibuněčné spoje typu gap junction, které jsou pro růst a vývoj oocytu nezbytné. Kumulární buňky tak poskytují oocytu živiny a kontakt s vnějším prostředím. Spoje gap junction ve skutečnosti zajišťují membránová propojení, která umožňují rychlou dopravu malých metabolitů a regulačních molekul do oocytu. Tato vlastnost kumulárních buněk společně s jejich specifickou metabolickou kapacitou hraje hlavní úlohu při zrání oocytů (Gilula *et al.*, 1978).

Během preovulační periody u většiny savců kumulární buňky syntetizují a ukládají extracelulární matrix (ECM) bohatou na kyselinu hyaluronovou (HA), proteiny a další proteoglykany, a tvoří tak prostředí pro oplodnění *in vivo* (Eppig, 1979; Mlynářčiková *et al.*, 2009). Tento fenomén je označován jako kumulární expanze a usnadňuje uvolnění kumulo-oocytárního komplexu z folikulární stěny, jeho uvolnění při ovulaci a zachycení nálevkou vejcovodu. Kumulární expanze je nezbytná pro úspěšné oplodnění a vývoj zygoty (Chen *et al.*, 1993; Vanderhyden *et Armstrong*, 1989). Odpovídající složení a vznik kumulární extracelulární matrix je nezbytné pro ovulaci, efektivní průchod oocytu vejcovodem a pro oplodnění (Russell *et Salustri*, 2006).

Kumulární buňky jsou také nezbytné pro meiotickou a vývojovou kompetenci (Qian *et al.*, 2003) a ovlivňují tak kvalitu meiotického zrání *in vitro* (Karja, 2008). Absence kumulárních buněk narušuje lipidový metabolismus oocytu a tím reguluje syntézu mastných kyselin a lipolýzu důležitou pro energii k dozrání oocytu, oplození a k jeho časnému embryonálnímu vývoji (Auclair *et al.*, 2013). Vlivem kumulární expanze dochází k přerušení spojů gap junction. Následkem toho oocyt nemůže přijímat inhibiční molekuly z kumulárních buněk a dojde k znovu zahájení meiózy (Šutovský *et al.*, 1994)

Složky kumulární extracelulární matrix jsou syntetizovány kumulárními buňkami pod kontrolou endokrinních faktorů produkovaných granulózními buňkami nebo vstupujícími do folikulů z krevní plazmy. V regulaci kumulární expanze se významně uplatňuje preovulační vlna LH. Vedle LH vlny hraje v indukci kumulární expanze důležitou roli také růstový diferenciacní faktor 9 (growth differentiation factor 9 - GDF-9) (Elvin *et al.*, 1999). Působení tohoto faktoru je pozorováno během celého folikulárního vývoje. V kumulárních buňkách může LH aktivovat GDF-9 indukcí proteáz, které ho uvolnily z jejich inaktivních proteoglykanů, nebo stimulací tvorby specifických GDF-9 receptorů (Richards *et al.*, 2002). Aktivovaný GDF-9 vyvolává sekreci hyaluronové kyseliny kumulárními buňkami, která společně s proteiny formuje matrix charakteristickou pro kumulární expanzi. GDF-9 také indukuje cyklooxygenázu 2 (COX-2) (Elvin *et al.*, 1999). COX-2 je nutná pro syntézu prostaglandinu E2, který se váže na prostaglandin E2 receptory (EP2). Některé experimenty ukazují, že toto pozdější složení je nezbytné pro kumulární expanzi a ovulaci (Richards *et al.*, 2002).

GDF-9 regulující kumulární expanzi potlačuje také produkci plasminogenového aktivátoru urokinázového typu (uPA) v granulózních buňkách (Elvin *et al.*, 1999). Plasminogenové aktivátory (PA) jsou serinové proteázy, které štěpí plazminogen na aktivní proteázový plazmin (Dow *et al.*, 2002). Tyto enzymy jsou zapojeny do přestavby extracelulární matrix v několika tkáních včetně vaječníků. Plasminogenové aktivátory urokinázového typu mění strukturu preovulačních folikulů na ovulační. Preovulační vlna LH způsobí nejen aktivaci GDF-9, ale také produkci tkáňových plasminogenových aktivátorů (tPA), které předcházejí degradaci kumulární extracelulární matrix (Salustri, 2000). Oocyty akumulují mRNA tkáňových plasminogenových aktivátorů během růstové fáze a translace této mRNA je spuštěna po obnovení meiotického zrání (Hurk *et Zhao*, 2005). Tyto údaje poukazují na náročnou souhru mezi oocytem a kumulárními buňkami v řízení integrity kumulo-oocytárních komplexů.

Kompaktní kumulo-oocytární komplexy podléhají v podmínkách *in vitro* expanzi, pokud jsou pod vlivem gonadotropních hormonů, jako je FSH (Eppig, 1979), přes mechanismus, který je zprostředkován cAMP (Dekel *et Kracier*, 1978).

V procesu kumulární expanze se dále uplatňuje přítomnost a metabolická aktivita oocyty. Pro stanovení, zda plní oocyt úlohu v regulaci kumulární expanze *in vitro*, je využíván postup oocytomie, kdy je oocyt odstraněn z izolovaných kumulo-oocytárních komplexů. Myší kumulo-oocytární komplexy zbavené oocytů, sestávající z kumulárních

buněk spojených se *zona pellucida*, nereagovali na FSH kumulární expanzí a tvorbou hyaluronové kyseliny. Naproti tomu hladina extracelulárního cAMP po stimulaci FSH u kumulo-oocytárních komplexů zbavených oocytů vzrostla na stejnou úroveň jako u neporušených kumulo-oocytárních komplexů. Kumulo-oocytární komplexy zbavené oocytu produkují hyaluronovou kyselinu a podstupují kumulární expanzi pouze pokud jsou kultivovány v mediu s plně dorostlými oocyty. Za stimulaci kumulární expanze oocyttem je odpovědný faktor umožňující expanzi kumulu (cumulus expansion enabling factor - CEEF) secernovaný oocyttem, bez kterého není kumulární expanze myších kumulo-oocytárních komplexů možná (Buccione *et al.*, 1990; Nagyová *et al.*, 1999). CEEF produkovaný oocyttem není nezbytný pro kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů. Prasečí kumulární a granulózní buňky jsou u prasat schopny samy produkovat CEEF, a tím se spolu s oocyttem podílet na autokrinní regulaci kumulární expanze (Nagyová *et al.*, 1999).

Za regulaci kumulární expanze jsou odpovědné také další faktory, jako je epidermální růstový faktor (epidermal growth factor – EGF) a růstový faktor podobný inzulinu (insulin-like growth factor – IGF) (Němcová *et al.*, 2007). Jejich přítomnost ve folikulární tekutině se podílí na parakrinní regulaci kumulární expanze a zrání oocytu (Naito *et al.*, 1988). Prasečí folikulární tekutina dále obsahuje teplotně-stabilní faktor (heat-stable factor), který podporuje kumulární expanzi (Dean *et al.*, 1994). Ačkoli povaha řady faktorů folikulární tekutiny nebyla dosud přesně objasněna, je folikulární tekutina používána jako složka kultivačního media používaného pro zrání oocytů (Nakayama *et al.*, 1996).

Mezi molekuly regulující kumulární expanzi patří skupina gasotransmiterů. Dosud byla studována úloha oxidu dusnatého v regulaci kumulární expanze. Bylo zjištěno, že donor oxidu dusnatého inhibuje kumulární expanzi prasečích oocytů (Tao *et al.*, 2005), zatímco u ovcí je syntáza oxidu dusnatého (NOS) a produkce oxidu dusnatého nutná pro úplnou kumulární expanzi (Amale *et al.*, 2011).

Limitující fáze v optimalizaci zrání *in vitro* je výběr kvalitních oocytů s dostatečným počtem vrstev kumulárních buněk. Jak uvádějí Davachi *et al.* (2012), existuje vztah mezi počtem těchto vrstev a schopností vývoje kumulo-oocytárních komplexů *in vitro*. Přítomnost 3 a více vrstev kumulárních buněk v kumulo-oocytárních komplexech vedou k lepší kumulární expanzi během *in vitro* zrání. Prasečí oocyty s vysoce kvalitní cytoplazmou a dostatečným množstvím kumulárních buněk mají mnohem větší šanci na zrání *in vitro*. Proto je kvalitní cytoplazma a kompaktní vrstva kumulárních buněk selekčním kritériem pro výběr oocytů k *in vitro* kultivaci (Karja, 2008).

Měření kumulární expanze

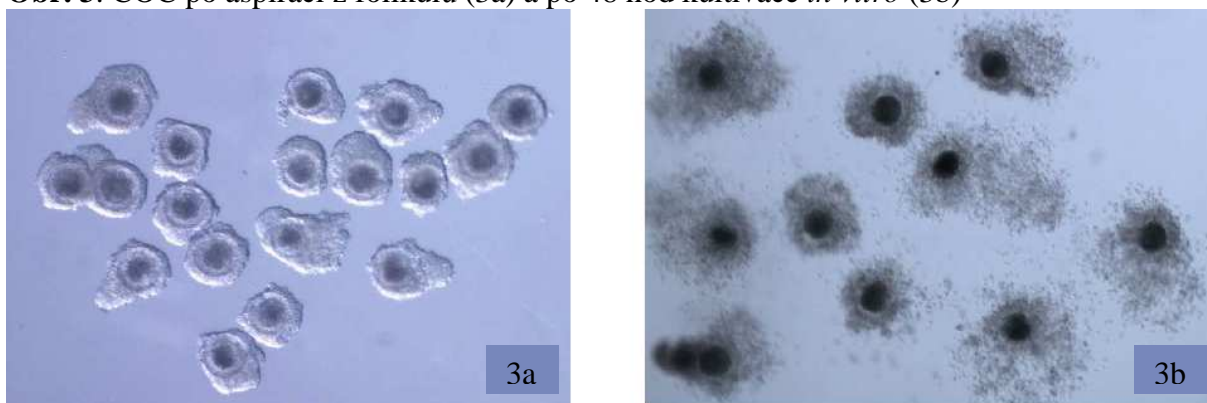
Intenzitu kumulární expanze je možné posuzovat přímo, měřením plochy expandovaného kumulu, nebo nepřímo kvantifikací glykosaminoglykanů (GAG). Tao *et al.* (2005) definoval tři třídy pro orientační analýzu kumulární expanze:

- I) Kumulo-oocytární komplexy s kompletní expanzí ve všech vrstvách kumulárních buněk
- II) Kumulo-oocytární komplexy s částečnou expanzí vnějších vrstev kumulárních buněk
- III) Kumulo-oocytární komplexy bez kumulární expanze.

Problémem této metody je subjektivní posuzování.

Další přímou metodou je výpočet plochy expandovaného kumulu. Tato metoda je založena na proměření snímků kumulo-oocytárních komplexů a výpočtu plochy podle vzorce: plocha [mm²] = délka (vzdálenost dvou nejvzdálenějších bodů kumulu v mm) x šířka (vzdálenost dvou nejbližších bodů kumulu v mm) x konstanta 0,7854 (Dean *et al.*, 1994). V současnosti je možné snímky podrobit softwarové analýze obrazu. Nevýhodou této metody je subjektivní výběr měřených vzdáleností a nepostihnutí trojrozměrné struktury expandovaného kumulu (viz Obr. 3). Výhodou obou těchto metod jsou nízké náklady a možnost neinvazivního sběru dat v průběhu kultivace v *in vitro* podmínkách.

Obr. 3. COC po aspiraci z folikulů (3a) a po 48 hod kultivace *in vitro* (3b)

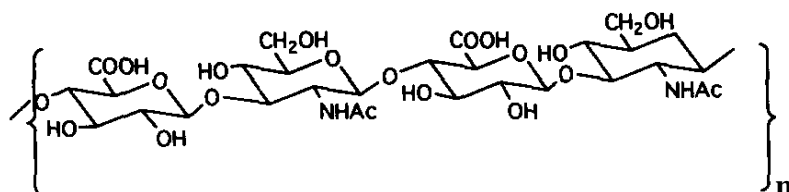


3a. Prasečí kumulo-oocytární komplexy po aspiraci z oocyty vybrané na základě počtu vrstev kumulárních buněk a kvality cytoplazmy. 3b. Kumulo-oocytární komplexy po 48 hodinové kultivaci *in vitro*. Odlišné tvary expandovaných kumulů způsobují chybu v přímých metodách měření intenzity kumulární expanze.

Intenzita kumulární expanze je závislá na obsahu hyaluronové kyseliny v extracelulární matrix (Dekel *et al.*, 1979). Kumulární expanze lze proto nepřímo kvantifikovat měřením hyaluronové kyseliny. Hyaluronová kyselina je makromolekulární

sloučenina s relativní molekulární hmotností větší než 10^6 (Takehi *et al.*, 1993). Skládá se z opakující se disacharidové jednotky N-acetyl-D-glukosamin a D-glukuronové kyseliny se střídavými β -(1,3) a β -(1,4) vazbami a je variabilní ve své délce počtem těchto podjednotek, kterých může být zhruba 10 až 1 000 (Meyer, 1958) viz obr. 4.

Obr.4. Struktura kyseliny hyaluronové (Takehi *et al.*, 1993)



Možný způsob kvantifikace hyaluronové kyseliny je radioaktivní značení prekurzorů glykosaminoglykanů použitých v podobě přísadku do kultivačního média (Eppig, 1980). Prekurzorem může být [^3H]glukosamin pro hyaluronovou kyselinu. Pomocí radioaktivního signálu emitovaného prekurzory glykosaminoglykanů lze kvantifikovat obsah hyaluronové kyseliny (Solursh, 1976).

Mezi další postupy stanovení hyaluronové kyseliny či jiných glykosaminoglykanů patří spektrofotometrické měření koncentrace hyaluronové kyseliny (Chen *et al.*, 2005), imunologické metody stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny metodou ELISA (Kongtawelert *et Ghosh*, 1990) a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Volpi, 2000). Tyto metody jsou standardně používané pro vzorky somatických tkání nebo plazmu, ale zatím nebyly zavedeny pro stanovení hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech a pro měření intenzity kumulární expanze.

3 Hypotézy a cíl práce

Byla stanovena hypotéza, že gasotransmitter sulfan je zapojen do regulace kumulární expanze a meiotického zrání prasečích oocytů kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Cílem práce bylo:

- a) stanovit vliv koncentrace donoru sulfanu na kumulární expanzi a meiotické zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů podle obsahu hyaluronové kyseliny po 48 hod. kultivace v podmínkách *in vitro*;
- b) zhodnotit vliv nejúčinnější koncentrace donoru sulfanu na průběh kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů podle obsahu hyaluronové kyseliny po 12 – 48 hod. kultivace v podmínkách *in vitro*;

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy byly získávány z vaječníků dosud necyklujících prepubertálních prasniček. Vaječnky byly dopraveny do laboratoře z jatek do dvou hodin po odběru ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) při 39 °C. Pomocí jehly 20G byla provedena aspirace ovariálních folikulů o průměru 2 - 5mm. Tenkou skleněnou pipetou byly z folikulární tekutiny pod binolupou vybrány oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a souvislou vrstvou kumulárních buněk.

4.1.2 Kultivační médium

Pro kultivaci kumulo-oocytárních komplexů bylo použito kultivační médium M199 (Life Technologies, Paisley, Skotsko). 100ml média bylo doplněno o 273 mg NaHCO₃, 60 mg laktátu vápenatého, 25 mg pyruvátu sodného, 150 mg HEPES a 2,5 mg gentamicinu (Sigma-Aldrich, USA) a 10 % (v/v) fetálního bovinního séra (GibcoBRL; Life Technologies, Deutsdsland).

Připravené kultivační médium bylo přefiltrováno do 100 ml skleněné baňky. Médium bylo před použitím temperováno minimálně 30 min v termoboxu (39 °C, 5 % CO₂). Krátce před použitím bylo do 1 ml média přidáno 0,3 ml gonadotropních hormonů eCG a hCG v poměru 13,5 I.U. : 6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holland).

4.1.3 Použité chemikálie a roztoky

- Donor sulfanu: Na₂S.9H₂O (Sigma-Aldrich, USA), naváženo příslušné množství donoru a rozpuštěno v kultivačním médiu na cílovou koncentraci Na₂S 0,15; 0,3; 0,6 a 0,9 mM
- Fixační roztok: etanol a kyselina octová (Sigma-Aldrich, USA) v poměru (3:1 v/v)
- Barvicí roztok: orcein 2,0 g (Sigma Aldrich, USA), citrát sodný 1,0 g (Sigma-Aldrich, USA) ve 100 ml 50 % kyselině octové (Sigma-Aldrich, USA)

- Roztoky proteáz:
 - proteáza z *Aspergillus oryzae* (Novozymes, Denmark) ředěno 1:100 v PBS
 - proteáza z *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Denmark) ředěno 1:100 v PBS

4.2 Metody

4.2.1 *In vitro* kultivace kumulo-oocytárních komplexů

Před kultivací byly kumulo-oocytární komplexy třikrát propláchnuty v kultivačním médiu. Kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány v podmínkách *in vitro* do stadia metafáze II. Kultivace probíhala v 1 ml kultivačního média ve sterilních 4-důlkových miskách (Nunc, Roskilde, Denmark) v podmínkách řízené atmosféry při teplotě 39 °C a atmosféře 5 % CO₂ ve směsi se vzduchem.

Účinky sulfanu byly sledovány pomocí donoru sulfanu rozpuštěného v kultivačním médiu. Kontrolní skupinou byly kumulo-oocytární komplexy kultivované v kultivačním médiu bez přídavku donoru sulfanu.

Do experimentů byly použity jen ty oocyty, kde kontrolní skupina dosáhla fáze MII po 48 hod kultivace v minimálně 85%.

4.2.2 Fixace a barvení oocytů

Po skončení kultivace byly kumulo-oocytární komplexy kontrolní skupiny zbaveny kumulárních buněk pomocí tenkostěnné kapiláry, montovány na podložní sklíčko a fixovány ve fixačním roztoku po dobu minimálně 24 hod. Pro vyhodnocení fáze zrání byl barven chromatin fixovaných oocytů barvicím roztokem. Fáze jaderného zrání byla vyhodnocena světelným mikroskopem Nikon Eclipse s fázovým kontrastem při zvětšení 400x. Bylo rozlišováno pět stádií jaderného zrání oocytů: GV – zárodečný váček; LD – pozdní diakineze; MI – metafáze 1. meiotického dělení; AITI – přechod z anafáze do telofáze 1. meiotického dělení; MII – metafáze 2. meiotického dělení.

4.2.3 Měření kumulární expanze

Jako ukazatel intenzity kumulární expanze kumulo-oocytárních komplexů byl využit obsah hyaluronové kyseliny. Pro stanovení kyseliny hyaluronové byl využit komerčně dostupný kit QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay (Biotech, USA). Tento kit je určený pro determinaci hyaluronové kyseliny v plazmě a bylo nutno nejprve metodiku modifikovat tak, aby byl použitelný pro měření hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech.

Prvním krokem bylo uvolnění hyaluronové kyseliny z kumulo-oocytárních komplexů, z kterých byly po ukončení kultivace odebrány expandované kumuly. Expandované kumuly byly následně vystaveny proteolytickému štěpení přidáním 30 μ l roztoku proteázy z *Aspergillus oryzae*. Po 2 hodinách kultivace při 45 °C bylo do vzorku přidáno 30 μ l roztoku proteázy z *Bacillus licheniformis* a vzorek byl kultivován další 3 hod. Po uvolnění hyaluronové kyseliny byly vzorky centrifugovány 5 min. při 10 000 otáčkách.

Během kultivace kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro* dochází k samovolnému uvolňování hyaluronové kyseliny do okolního prostředí. Z toho důvodu byl analyzován také vzorek kultivačního média.

V získaném supernatantu (lyzát expandovaného kumulu) a kultivačním médiu byla měřena koncentrace hyaluronové kyseliny dle následujícího postupu. Standardy, kontroly a vzorky byly 10x naředěny Reaction puřrem. 100 μ l zředěného standardu hyaluronové kyseliny, kontrol a vzorků bylo napipetováno do jamek ELISA destičky. Následovala inkubace 60 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci se jamky 4x promyly roztokem PBS. Do jamek bylo přidáno 100 μ l HRP+HABP (Horseradish Peroxidase + Hyaluronate binding protein) a inkubovalo se 30 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci se jamky vymyly 4x roztokem PBS a přidalo se do jamek 100 μ l Substrate roztoku. Následovala inkubace 30 min při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 100 μ l Stopping roztoku a provedlo se spektrofotometrické měření koncentrace hyaluronové kyseliny při 450 nm.

Výsledná koncentrace HA se odečetla z kvadratické křivky. Celkové množství hyaluronové kyseliny bylo stanoveno jako součet množství hyaluronové kyseliny naměřené v lyzátu expandovaného kumulu a v kultivačním médiu. Celkové množství hyaluronové kyseliny bylo vztaženo ke kontrolní skupině a vyjádřeno relativně.

4.2.4 Statistická analýza

Všechny experimenty byly zopakovány minimálně 3x. Výsledky byly podrobeny statistické analýze v programu SAS 9.0. Zastoupení stádií meiotického zrání bylo vyjádřeno procentuálně. Rozdíly mezi kontrolou a pokusnými skupinami byly hodnoceny analýzou rozptylu - t-testem. Produkce hyaluronové kyseliny byla vztažena ke kontrolní skupině a vyjádřena relativně. Rozdíly v produkci hyaluronové kyseliny mezi kontrolou a pokusnými skupinami byly hodnoceny analýzou rozptylu – Sheffeho testem. Rozdíly s P-hodnotou nižší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

4.2.5 Schéma experimentů

1) Vliv koncentrace Na_2S na kumulární expanzi a meiotické zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů po 48 hod. kultivace

Pro stanovení vlivu sulfanu na kumulární expanzi a meiotické zrání byly kumulo-oocytární komplexy kultivovány po dobu 48 hodin v médiu s přídavkem donoru sulfanu v koncentraci: 0,15; 0,3; 0,6 a 0,9 mM. Kontrolní skupina byla kultivována v médiu bez donoru sulfanu. Po skončení kultivace byla u kumulo-oocytárních komplexů stanovena fáze jaderného zrání oocytů a obsah kyseliny hyaluronové v expandovaném kumulu.

2) Vliv nejúčinnější koncentrace donoru sulfanu na průběh kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů

Průběh kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů byl sledován u nejúčinnější koncentrace donoru sulfanu zjištěné v předchozím experimentu (0,3 mM). Kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány v médiu s přídavkem donoru sulfanu po dobu 12, 24, 36 a 48 hodin. Kontrolní skupina byla kultivována v médiu bez donoru sulfanu. Po skončení kultivace byla u kumulo-oocytárních komplexů stanovena fáze jaderného zrání oocytů a obsah kyseliny hyaluronidové v expandovaném kumulu.

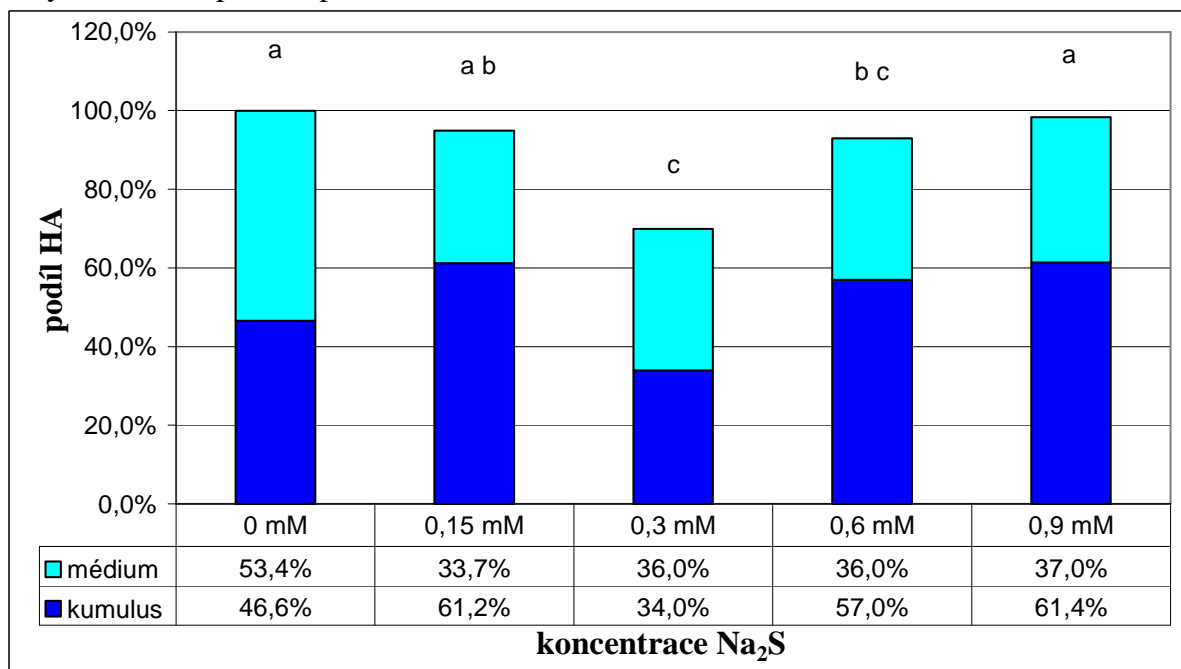
5 Výsledky

5.1 Vliv koncentrace Na_2S na kumulární expanzi a meiotické zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů po 48 hod. kultivace

V experimentu byla hodnocena kumulární expanze a meiotické zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů kultivovaných 48 hod. v přítomnosti donoru sulfanu Na_2S v koncentraci 0,15; 0,3; 0,6 a 0,9 mM. Po skončení kultivace byla hodnocena míra kumulární expanze prostřednictvím měření koncentrace hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu a hyaluronové kyseliny uvolněné do kultivačního média v průběhu kultivace. Dále bylo hodnoceno jaderné zrání oocytů.

Přítomnost donoru sulfanu Na_2S potlačovala celkovou produkci hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace v závislosti na koncentraci donoru. Inhibiční efekt Na_2S ale nevykazoval lineární průběh inhibice. Statisticky významně byla potlačena produkce hyaluronové kyseliny pouze u koncentrace donoru 0,3 mM a 0,6 mM, a to o 30% a 7%. Potlačení produkce hyaluronové kyseliny v pokusné skupině 0,15 a 0,9 mM Na_2S bylo statisticky nevýznamné. V pokusné skupině vystavené působení donoru o koncentraci 0,9 mM došlo v porovnání s kontrolní skupinou k statisticky významnému potlačení uvolňování hyaluronové kyseliny do okolního média (viz graf 1).

Graf 1. Vliv donoru sulfanu Na₂S na množství hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu (kumulus) a kultivačním médiu (médiu) po 48 hod kultivace prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*.



Množství hyaluronové kyseliny (HA) v experimentálních skupinách (0,15 – 0,9 mM Na₂S) je vyjádřeno jako procentuální podíl vztážený k množství hyaluronové kyseliny v kontrolní skupině (0,0 mM).

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami jsou vyznačeny rozdílnými superskripty

Vliv donoru sulfanu Na₂S na meiotické zrání byl posuzován dle fáze jaderného zrání. Přítomnost Na₂S v koncentraci 0,15 – 0,9 mM neovlivnila procento oocytů, které dosáhly po 48 hod. kultivace *in vitro* stádia MII. (viz tab. 1).

Tab. 1. Vliv Na₂S na meiotické zrání prasečích oocytů po 48 hod kultivace *in vitro*

Koncentrace Na ₂ S	Fáze jaderného zrání (% ± SD)					n
	GV	LD	MI	AITI	MII	
0,0 mM	-	-	1,1±0,4 ^a	-	98,9±0,4 ^a	180
0,15 mM	-	-	0,8±0,4 ^a	-	99,2±0,4 ^a	120
0,3 mM	-	-	-	-	100,0±0,4 ^a	80
0,6 mM	-	-	-	-	100,0±0,4 ^a	120
0,9 mM	-	-	-	-	100,0±0,4 ^a	120

GV – % oocytů ve stádiu zárodečného váčku; LD – % oocytů ve stádiu pozdní diakineze; MI – % oocytů ve stádiu metafáze 1. meiotického dělení; AITI – % oocytů ve stádiu anafáze a telofáze 1. meiotického dělení; MII – metafáze 2. meiotického dělení

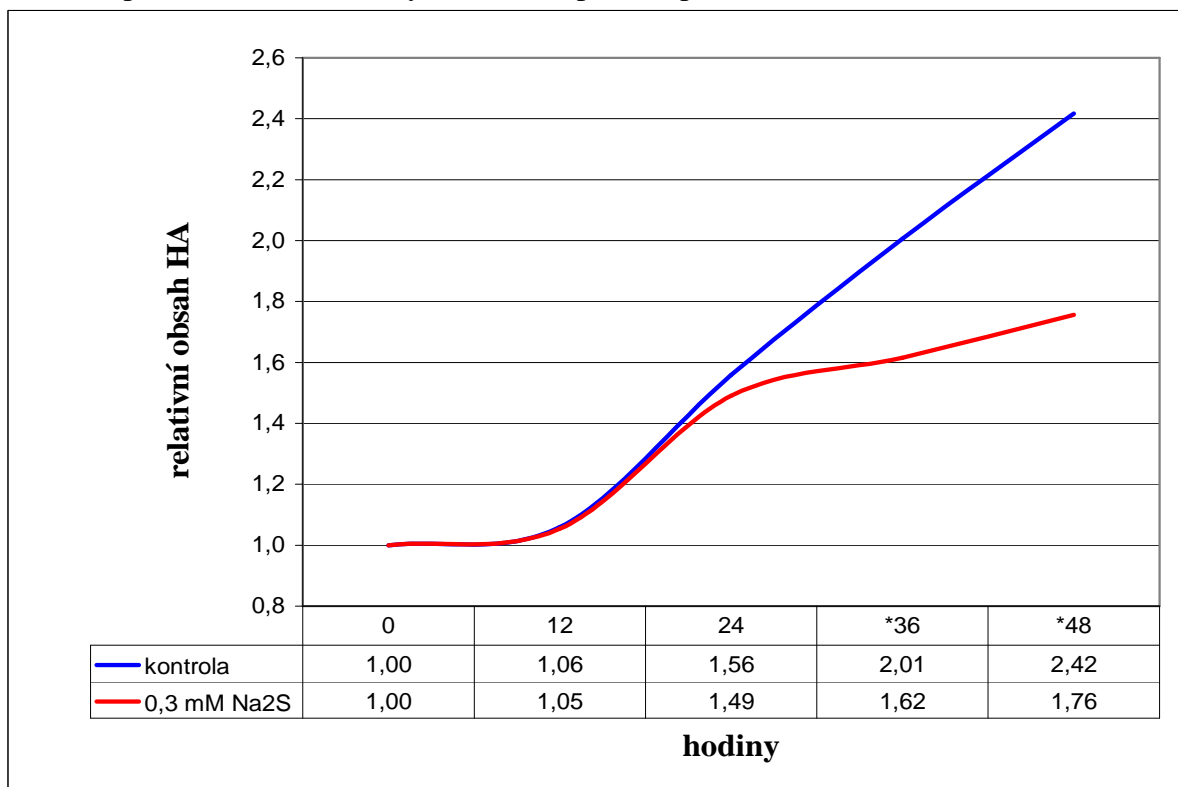
^{a,b} Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami pro každé stádium meiotického zrání jsou vyznačeny rozdílnými superskripty.

5.2 Vliv neúčinnější koncentrace donoru sulfanu na průběh kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů

V experimentu byl vyhodnocen průběh kumulární expanze a meiotického zrání kumulo-oocytárních komplexů během 48 hodin kultivace v přítomnosti donoru sulfanu v *in vitro* podmínkách. Pro experiment byla zvolena koncentrace donoru, která měla v předchozím experimentu největší efekt (0,3 mM Na₂S). Kumulární expanze hodnocená prostřednictvím stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu a hyaluronové kyseliny uvolněné do kultivačního média v průběhu kultivace s donorem sulfanu byla hodnocena v 0, 12, 24, 36 a 48 hodinách kultivace. Kontrolní skupina byla kultivována v médiu bez přítomnosti donoru sulfanu.

Donor sulfanu Na₂S v koncentraci 0,3mM snižoval celkovou produkci hyaluronové kyseliny. Tento efekt se projevil statisticky významně po 36 hod. kultivace *in vitro* a přetrvával i po 48 hod. (viz graf 2).

Graf 2. Vliv Na₂S na celkové množství hyaluronové kyseliny v průběhu 48 hodinové kultivace prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*.

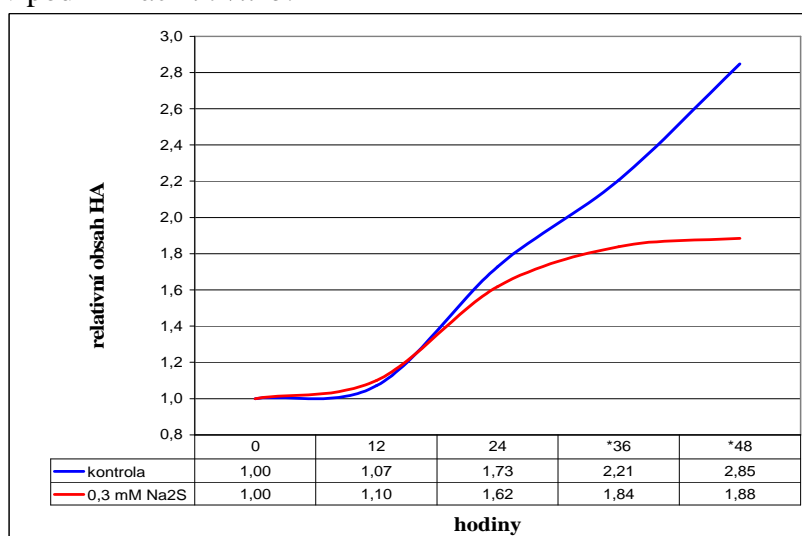


Produkce hyaluronové kyseliny v pokusné a kontrolní skupině je vyjádřena jako relativní hodnota (relativní obsah HA) celkového množství hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu a kultivačním médiu vztažená k této hodnotě naměřené u oocytů ve stádiu GV (0 hod).

*Statisticky významný rozdíl vzhledem ke kontrolní skupině ($p < 0,05$).

Potlačení produkce hyaluronové kyseliny při kultivaci kumulo-oocytárních komplexů v přítomnosti donoru sulfanu Na_2S v koncentraci 0,3 mM se statisticky významně projevilo jak na množství hyaluronové kyseliny v samotném lyzátu expandovaného kumulu (graf 3), tak i v samotném kultivačním médiu (graf 4). Efekt donoru byla statisticky významný po 36 hod. kultivace *in vitro* a přetrvával do 48 hod.

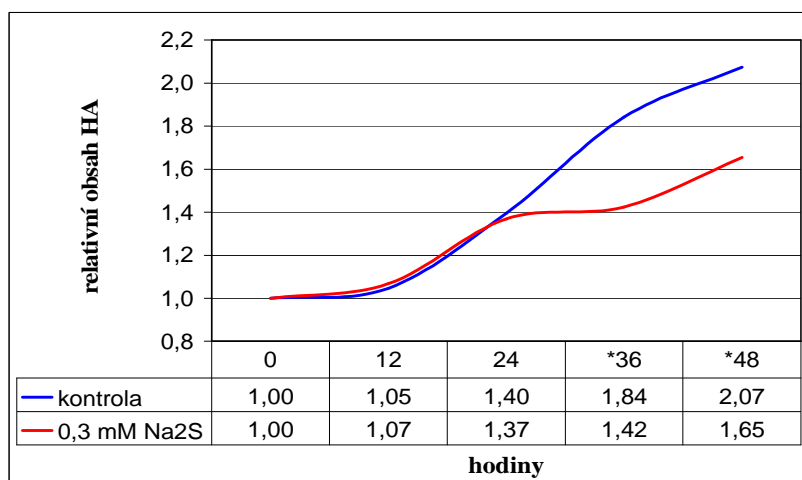
Graf 3. Vliv donoru sulfanu Na_2S na množství hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu v průběhu 48 hodinové kultivace prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*.



Produkce hyaluronové kyseliny v pokusné a kontrolní skupině je vyjádřena jako relativní hodnota (relativní obsah HA) celkového množství hyaluronové kyseliny v lyzátu expandovaného kumulu vztahovaná k této hodnotě naměřené u oocytů ve stádiu GV (0 hod).

*Statisticky významný rozdíl vzhledem ke kontrolní skupině ($p < 0,05$).

Graf 4. Vliv donoru sulfanu Na_2S na množství hyaluronové kyseliny v kultivačním médiu v průběhu 48 hodinové kultivace prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*.



Produkce hyaluronové kyseliny v pokusné a kontrolní skupině je vyjádřena jako relativní hodnota (relativní obsah HA) celkového množství hyaluronové kyseliny v kultivačním médiu vztahovaná k této hodnotě naměřené u oocytů ve stádiu GV (0 hod).

*Statisticky významný rozdíl vzhledem ke kontrolní skupině ($p < 0,05$).

Vliv donoru sulfanu Na₂S na meiotické zrání prasečích oocytů byl posuzován dle fáze jaderného zrání. Přítomnost Na₂S v koncentraci 0,3 mM akceleruje meiotické zrání prasečích oocytů. Donor sulfanu Na₂S statisticky významně urychluje po 36 hod. přechod z meiózy I do meiózy II, zatímco oocyty kontrolní skupiny přetrvávají v metafázi I (21,7% vs. 0,0%). Donor sulfanu Na₂S po 36 hod. statisticky významně urychluje dosažení MII (38,3% vs. 62,5%). Po 48 hod. kultivace dosáhla pokusná i kontrolní skupina metafáze II bez rozdílu (viz Tab. 2) stejně jako v předchozím pokusu.

Tab. 2. Vliv donoru sulfanu Na₂S na meiotické zrání prasečích oocytů v průběhu 48 hodinové kultivace

		Fáze meiotického zrání (% ± SD)					n
		GV	LD	MI	AITI	MII	
12 h	kontrola	100±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	-	-	-	120
	0,3 mM Na ₂ S	98,3±1,4 ^a	1,7±1,4 ^a	-	-	-	120
24 h	kontrola	-	3,3±3,8 ^a	96,7±3,8 ^a	-	-	120
	0,3 mM Na ₂ S	-	0,0±0,0 ^a	100±0,0 ^a	-	-	120
36 h	kontrola	-	-	21,7±2,9 ^a	40,0±4,3 ^a	38,3±3,8 ^a	120
	0,3 mM Na ₂ S	-	-	0,0±0,0 ^b	37,5±6,6 ^a	62,5±6,6 ^b	120
48 h	kontrola	-	-	-	-	100±0,0 ^a	120
	0,3 mM Na ₂ S	-	-	-	-	100±0,0 ^a	120

GV – % oocytů ve stádiu zárodečného váčku; LD – % oocytů ve stádiu pozdní diakineze; MI – % oocytů ve stádiu metafáze 1. meiotického dělení; AITI – % oocytů ve stádiu anafáze a telofáze 1. meiotického dělení; MII – metafáze 2. meiotického dělení

^{a,b} Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami pro každé stádium meiotického zrání jsou vyznačeny rozdílnými superskripty.

6 Diskuse

Proces kumulární expanze, během které syntetizují kumulární buňky zrajících savčích oocytů extracelulární matrix bohatou na glykosaminoglykany je jeden z důležitých markerů průběhu meiotického zrání (Dekel *et al.*, 1979; Eppig, 1979). Tento proces je řízen gonadotropními hormony, které prostřednictvím granulózních buněk regulují parakrinní sekreci kumulárních buněk uvnitř folikulu (Wassarman, 1988; Motlík *et al.*, 1998). Na řízení kumulární expanze se podílí také faktory přítomné ve folikulární tekutině (Naito *et al.*, 1988; Němcová *et al.*, 2007) a faktory samotného oocyta (Nagyová *et al.*, 2000). Kromě toho se regulace kumulární expanze zřejmě účastní i gasotransmitery. I když v odborné literatuře nejsou zatím dostupné informace o efektu sulfanu u prasečích kumulo-oocytárních komplexů, lze předpokládat, že sulfan bude působit obdobně jako oxid dusnatý, protože oba gasotrasmitery se podílí na řadě fyziologických procesů obdobným způsobem. Oba plyny se např. účastní vasodilatace krevních cév (Zhao *et al.*, 2001; d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2009). Oxid dusnatý reguluje aktivitu proteinů jejich nitrosylací a sulfan sulfhydratací, enzymy zodpovědné za produkci gasotransmiterů jsou řízené prostřednictvím Ca^{2+} a kalmodulinu (Mustafa *et al.*, 2009). Vliv oxidu dusnatého (NO) na kumulární expanzi byl u prasečích oocytů již popsán (Tao *et al.*, 2005; Amale *et al.*, 2011).

Naše experimenty prokázaly inhibující efekt donoru sulfanu Na_2S na celkovou produkci hyaluronové kyseliny v prasečích kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace. Vliv sulfanu na průběh kumulární expanze u prasečích kumulo-oocytárních komplexů nebyl zatím studován. Byl však prokázán podíl sulfanu na řízení funkce jak v samčích (Srilatha *et al.*, 2006), tak v samičích reprodukční soustavě (Sidhu *et al.*, 2001; Srilatha *et al.*, 2009). U myších kumulárních a granulózních buněk (Liang *et al.*, 2006) a u hovězích kumulo-oocytárních komplexů (Regassa *et al.*, 2011) byla popsána exprese enzymu cystationin β syntázy (CBS), která se v buňce účastní produkce sulfanu. Potlačení exprese CBS v granulózních buňkách myší vede k inhibici meiotického zrání (Liang *et al.*, 2007). U prasečích kumulo-oocytárních komplexů má podobný efekt jako sulfan v našich experimentech gasotransmitter oxid dusnatý, který inhibuje kumulární expanzi (Tao *et al.*, 2005).

Nejsilnější inhibiční efekt měla v našich experimentech koncentrace donoru sulfanu 0,3 mM v médiu. Potlačení celkové produkce hyaluronové kyseliny bylo statisticky

významné od 36 hodiny kultivace. Zdá se, že sulfan působí na kumulární expanzi podobně jako oxid dusnatý. Viana et al. (2007) prokázal potlačení kumulární expanze po 24 hod. kultivace v přítomnosti donoru oxidu dusnatého u oocytů skotu. Efekt nižší ani vyšší koncentrace donoru sulfanu v médiu nebyl statisticky významný. Zdá se, že by sulfan mohl mít při svém působení v buňce podobný duální efekt závislý na koncentraci donoru, jako je tomu v případě oxidu dusnatého, který v nízkých koncentracích akceleruje meiotické zrání, ale ve vysokých koncentracích ho potlačuje (Bu *et al.*, 2003).

V našich experimentech donor sulfanu Na₂S v koncentraci 0,3 mM akceleroval jaderné zrání prasečích oocytů, ale efekt donoru byl statisticky průkazný po 24 hodinách kultivace v *in vitro* podmínkách. Nejistili jsme statisticky průkazný vliv sulfanu na průběh GVBD, ačkoliv bylo možné tento efekt předpokládat na základě experimentů s donory oxidu dusnatého. V podmínkách kultivace *in vitro* podstupuje oocyt GVBD spontánně po uvolnění z folikulu a po adekvátní stimulaci gonadotropními hormony (Motlík *et al.*, 1984; Wassarman, 1988). V prasečích oocytech je pro GVBD produkce oxidu dusnatého nezbytná (Chmelíková et al., 2010). Motlík et al. (1984) uvádí, že GVBD u prasečích oocytů nastává okolo 16 hod kultivace v *in vitro* podmínkách. Je tedy možné, že sulfan akceleruje GVBD v menší míře než oxid dusnatý a pokud by byl průběh jaderného zrání hodnocen nejen po 12 ale i po 16 hodinách, byla by akcelerace GVBD statisticky průkazná. I v případě jaderného zrání je možné, že sulfan vykazuje duální efekt v závislosti na zvolené koncentraci donoru, protože Bilodeau-Goeseels (2007) uvádí, že donor oxidu dusnatého ve vysokých koncentracích v oocytech skotu inhibuje GVBD, ale v nízkých koncentracích ho naopak stimuluje. Testovaná koncentrace zvolená na základě efektu na průběh kumulární expanze tedy nemusela být z hlediska jaderného zrání optimální.

Přechod z meiózy I do meiózy II a dosažení metafáze II akceleroval donor sulfanu statisticky významně. Podobný efekt nebyl popsán u oxidu dusnatého, i když oxid dusnatý je u prasečích oocytů nezbytný nejen pro přechod z meiózy I do meiózy II (Jablonka-Shariff et Olson., 1998), ale i pro dosažení metafáze II (Chmelíková *et al.*, 2010). Zdá se, že v případě regulace meiotického zrání se sulfan uplatňuje odlišným způsobem než oxid dusnatý.

Jednou z možných cest, kterými sulfan může ovlivňovat meiotické zrání, je regulace uvolňování Ca²⁺ iontů. Sulfan způsobuje nárůst Ca²⁺ v buňkách endotelu (Moccia et al, 2011). Ca²⁺ v oocytu může prostřednictvím CaMKII podporovat akumulaci cyklinu B (Fan *et al.*, 2003). Další možnou cestou, kterou sulfan reguluje meiotické zrání, je sulfhydratace. Tou sulfan zvyšuje katalytickou aktivitu enzymů (Paul et Snyder, 2012) a reguluje K_{ATP} kanálové proteiny (Mustafa *et al.*, 2011). Prostřednictvím sulfhydratace sulfan reguluje i aktivitu

tubulinu a aktinu (Mustafa *et al.*, 2009). Tubulin je součástí mikrotubulů, které tvoří dělicí vřeténko. To je zodpovědné za rozchod chromozomů během mitózy a meiózy. Aktinová vlákna se podílí na tvorbě kontraktálního prstence. (Alberts *et al.*, 1998). Sulfan by se tak mohl účastnit meiózy cestou sulfhydratace tubulinu dělicího vřeténka a aktinu kontraktálního prstence.

Na regulaci meiotického zrání se sulfan může podílet i prostřednictvím signální dráhy cAMP/PKA. Tato dráha je v oocytu zodpovědná za udržení 1. meiotického bloku (Pirino *et al.*, 2009). Sulfan v somatických buňkách tuto signální dráhu reguluje pomocí sulfhydratace (Njie-Mbye *et al.*, 2012). Sulfhydratací ovlivněná cAMP/PKA signální dráha by mohla být příčinou rychlejšího průběhu GVBD prasečích oocytů.

Další signální dráhou ovlivněnou v somatických buňkách sulfanem je PI3K/Akt (Chi *et al.*, 2010). Signalizace PI3K/Akt je u prasečích oocytů nezbytná pro regulaci kumulární expanze a přechod z meiózy I do meiózy II (Procházka *et al.*, 2012). Možnou příčinou akcelerace jaderného zrání prasečích oocytů sulfanem spolu s potlačením kumulární expanze je tedy ovlivnění PI3K/Akt sulfanem.

Mezi meiotickým zráním a kumulární expanzí existuje pozitivní vztah. Karja (2008) uvádí, že oocyty s pěti a více kompaktními vrstvami kumulárních buněk jsou v podmínkách *in vitro* úspěšnější v dosažení MII než oocyty s nekompaktním nebo poškozeným kumulem. Na kvalitě a počtu vrstev kumulárních buněk je závislá intenzita kumulární expanze, která rozhoduje o úspěšnosti meiotického zrání *in vitro* (Qian *et al.*, 2003). Sulfan kumulární expanzi potlačuje, ale meiotické zrání urychluje. Tento fakt pravděpodobně souvisí s regulací kumulární expanze prostřednictvím faktoru umožňující expanzi kumulu (CEEF), který je produkován oocytem (Eppig *et al.*, 1993). Sekreční aktivita oocytu včetně produkce CEEF po dosažení metafáze I ustává (Nagyová *et al.*, 2000). Je možné, že pokud vlivem zvýšené hladiny sulfanu dojde k akceleraci meiotického zrání, oocyt ukončí dříve produkci CEEF a k další kumulární expanzi již nedochází.

7 Závěr

Během meiotického zrání kumulární buňky syntetizují a akumulují složky extracelulární matrix a dochází tak ke kumulární expanzi. Intenzita kumulární expanze pozitivně koreluje s meiotickým zráním *in vitro* a může tak sloužit jako jeden z ukazatelů vitality dozrálých oocytů.

Našimi experimenty jsme prokázali, že sulfan jako gasotransmitter ovlivňuje kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů během kultivace v *in vitro* podmínkách, čehož se dá využít pro další studium k optimalizaci metod meiotického zrání *in vitro*. Kumulární expanze byla potlačena v závislosti na koncentraci donoru sulfanu Na_2S . Efekt sulfanu na průběh meiotického zrání oocytů ale nevykazoval lineární závislost na dávce donoru. Zdá se tedy, že sulfan může, podobně jako jiné gasotransmitery, mít duální efekt ovlivněný jeho koncentrací v buňce. Zároveň s potlačením kumulární expanze došlo vlivem sulfanu k akceleraci jaderného zrání. Další experimenty by bylo vhodné zaměřit na molekulární mechanismy působení sulfanu jako gasotransmitteru zejména ve vztahu k průběhu jaderného zrání, ověřit zda sulfan ovlivňuje expanzi kumulu prostřednictvím oocytu nebo zda ovlivňuje přímo produkci hyaluroné kyseliny kumulárními buňkami a také experimentálně ověřit možnost duálního působení sulfanu v závislosti na jeho koncentraci. Velmi zajímavé by bylo zjistit, zda nedochází k interakcím sulfanu s dalšími gasotransmitery.

8 Seznam literatury

- Abe, K., Kimura, H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* 16. 1066-1071.
- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbé, J. C., Dorée, M. 1998. The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *Journal of Cell Science*. 111. 1751-1757.
- Abrieu, A., Dorée, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. 114. 257-267.
- Aerts, J. M. J., Bols, P. E. J. 2010. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 171-179.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing s.r.o., Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 80-902906-0-4.
- Amale, M. H., Shahne, Z., Abavisani, A., Nasrollahi, S. 2011. Effects of inhibiting nitric oxide synthase on cumulus expansion and nuclear maturation of sheep oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 56 (6). 284–29.
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R., Uzbekova, S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* [online]. January 2013. [cit. 2013-03-09]. Dostupné z <<http://ajpendo.physiology.org/content/early/2013/01/11/ajpendo.00469.2012.reprint>>
- Awata, S., Nakayama, K., Suzuki, I., Sugahara, K., Kodama, H. 1995. Changes in cystathionine γ -lyase in various regions of rat brain during development. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 35. 1331-1338.
- Beinert, H. 2000. A tribute to sulfur. *European Journal of Biochemistry*. 267. 5657-5664.

- Bilodeau-Goeseels, S. 2007. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. *Theriogenology*. 68 (5). 693-701.
- Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anatomical Record*. 161. 45-56.
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. 1980. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology*. 76. 185-202.
- Boehning, D., Snyder, S. H. 2003. Novel neural modulators. *Annual Review of Neuroscience*. 26. 105-131.
- Braunstein, A. E., Goryachenkova, E. V., Tolosa, E. A., Willhardt, I. H., Yefremova, L. L. 1971. Specificity and some other properties of liver serine sulphhydrase: evidence for its identity with cystathionine-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 242. 247-260.
- Broillet, M.C. 1999. S-nitrosylation of proteins. *Cellular and Molecular Life Science*. 55. 1036-1042.
- Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207. 21-30.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543-547.
- Caliendo, G., Cirino, G., Santaqada, V., Wallace, J. L. 2010. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): developmental of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53(17). 6275- 286.
- Coleman, T. R., Dunphy, W. G. 1994. Cdc2 regulatory factors. *Current Opinion in Cell Biology*. 6. 877-882.
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F. J., Shitsukawa, K., Tsafiriri, A. 1998. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 9-14.
- Conti, M., Hsieh, M., Musa Zamah, A., Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 356. 65-73.

- Červený, Č., Komárek, V., Štěrbá, O. 1999. Koldův atlas veterinární anatomie. Grada, Praha. 701 s. ISBN 80-7169-352-9.
- Davachi, N. D., Kohram, H., Zainoaldini, S. 2012. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research*. 102. 37-42.
- Davidoff, M. S., Middendorff, R., Mayer, B., de-Vente, J., Koesling, D., Holstein, A. F. 1997. Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell and Tissue Research*. 287. 161-170.
- Davis, R. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 268. 14553-14556.
- Dean, F. P., Sato, E., Naito, K., Toyoda, Y. 1994. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101. 667-673.
- Dekel N, Hillensjo Y, Kraicer PF. 1979. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biology of Reproduction*. 20. 191-197.
- Dekel, N., Kracier, P. F. 1978 Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3', 5'-monophosphate. *Endocrinology*. 102. 1797-1802.
- Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., Beers, W. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*. 86 (2). 356-362.
- d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Maffia, P., Mirone, V., Imbimbo, C., Fusco, F., De Palma, R., Ignarro, L. J., Cirino, G. 2009. Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proceedings of the National academy of Science of the USA*. 106 (11). 4513-4528.
- Dow, M. P., Bakke, L. J., Cassar, C. A., Peters, M. W., Pursley, J. R., Smith, G. W. 2002. Gonadotrophin surge-induced upregulation of the plasminogen activators (tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator) and the urokinase plasminogen activator receptor within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biology of Reproduction*. 66. 1413-1421.
- Downs, S. M., Daniel, S. A., Eppig, J. J. 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth

factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *Journal of Experimental Zoology*. 245. 86-96.

- Ebeling, S., Topfer, D., Meinecke, B. 2011. Steroidogenesis and the influence of MAPK activity during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Reproduction in Domestic Animals*. 46. 513-519.
- Elvin, J. A., Yan, C., Matzuk, M. M., 2000. Oocyte-expressed TGFbeta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 159. 1-5.
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., Matzuk, M. M. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology*. 13. 1018-1034.
- Eppig, J. J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature*. 281. 483-484.
- Eppig, J. J. 1980. Role of FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biology of Reproduction*. 22. 629-633.
- Eppig, J. J. 1989. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 38. 3-8.
- Eppig, J. J., Downs, S. M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 30. 1-11.
- Eppig, J. J., Peters, A. H., Telfer, E. E., Wigglesworth, K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor. *Molecular Reproduction and Development*. 34(4). 450-456.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78. 203-216.
- Fan, H. Y., Huo, L. J, Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69. 1552-1564.
- Farina, M., Ribeiro, M. L., Franchi, A. 2001. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction*. 121. 403-407.
- Fortune, J. E., Kito, S., Wandji, S. A., Srsen, V. 1998. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology*. 49. 441-449.

- Freeman, B. 2003. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction*. 125. 635-643.
- Freitas, A., Alves-Filho, J. C., Secco, D. D., Neto, A. F., Ferreira, S. H., Barja-Fidalgo, C., Cunha, F. Q. 2006. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 149 (4). 345-354.
- Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., Tang, C. 2004. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 9 (2). 362-368.
- Gilula, N. B., Epstein, M. L., Beers, W. H. 1978. A Study of the Cumulus-Oocyte Complex. *Journal of Cell Biology*. 78 (1). 58-75.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349 (6305). 132-138.
- Gómez-Fernández, P., Sánchez-Margalet, V., Ruiz, A., García-Molina, F., Medina, J., Almará, M. 2004. Vascular expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in essential hypertension. *Nefrologia*. 24 (5). 486-488.
- Gordo, A.C., He, C.L., Smith, S., Fissore, R.A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59. 106-14.
- Gowen, J. W. 1933. Meiosis as a genetic character in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*. 65 (1), 83-106.
- 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*. 15. 3168-3176.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925-933.
- Harada, T., Koi, H., Kubota, T., Aso, T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis in vitro. *Journal of Endocrinology*. 181. 191-205.
- Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100. 333-339.

- Horner, K., Litera, G., Hinckley, M., Trknu, K., Storm, D., Conti, M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 258. 385-396.
- Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 237. 527-531.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122-130.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Grepe, T. 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 447-454.
- Chen, H., Kui, C., Chan, H. C. 2013. Ca²⁺ mobilization in cumulus cells: Role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium*. 53. 68-75.
- Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. (1993) Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 34. 87-93.
- Chen, Q., Li, X. L., Liu, Q., Jiano, Q. C., Cao, W. G., Wan, H. 2005. Investigation the binding interaction of azur A with hyaluronic acid via spectrophotometry and its analytical application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382. 1513-1519.
- Chen, X., Jhee, K. H., Kruger, W. D. 2004. Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (50). 52082–52086.
- Chin, B. Y., Otterbein, L. E. 2009. Carbon monoxide is a poison to microbes! CO as a bactericidal molecule. *Current opinion in Pharmacology*. 9. 490-500.
- Chmelíková, E., Jeřeta, M., Sedmíková, M., Petr, J., Tůmová, L., Kott, T., Lipovová, P., Jílek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18. 235-244.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. 1987. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National academy of Science of the USA*. 84. 9265-9269.
- Ignarro, L. J., Bush, P. A., Buga, G. M., Wood, K. S., Fukuto, J. M., Rajfer, J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause

relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 170. 843-850.

- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265-271.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity and microtubule organisation are altered by protein synthesis inhibition in maturing porcine oocytes. *Zygote*. 4. 191-198.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 58. 130-136.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The Role of Nitric Oxide in Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation: Meiotic Abnormalities of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes. *Endocrinology*. 139 (6). 2944-2954.
- Jamnongjit, M., Gill, A., Hammes, S. R. 2005. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102. 16257-16262.
- Jin, S., Zhang, M., Lei, L., Wang, C., Fu, M., Ning, G., Xia, G. 2006. Meiosis activating sterol (MAS) regulate FSH-induced meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes via PKC pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 249. 64-70.
- 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*. 428 (6979). 145-150.
- Johnson, R. A., Johnson, F., K. 2000. The effects of carbon monoxide as a neurotransmitter. *Current Opinion in Neurology*. 13 (6). 709-713.
- Kakehi, K., Ueda, M., Suzuki, S., Honda, S. 1993. Determination of hyaluronic acid by high-performance liquid chromatography of the oligosaccharides derived therefrom as 1-(4-methoxy)phenyl-3-methyl-Spyrazolone derivatives. *Journal of Chromatography*. 630. 141-146.
- Karaïskou, A., Jesus, C., Brassac, T., Ozon, R. 1999. Phosphatase 2A and Polo kinase, two antagonistic regulators of Cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of Cell Science*. 112. 3747-3756.

- Karja, N. W. K. 2008. Nuclear Maturation of Porcine Oocytes in vitro: Effect of the Cumulus-Oocyte Complexes Quality. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 13 (2). 1078-1084.
- Kidder, G. M., Mhawi, A. A. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 123 (5). 613-620.
- Kim, A. M., Vogt, S., O'Halloran, T. V., Woodruff, T. K. 2010. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nature Chemical Biology*. 6. 674-681.
- Kleckner, N. 1996. Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Academy of Science*. 93. 8167-8174.
- Knight, P.G., Glister, C., 2003. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*. 78. 165-183.
- Kong, B. Y., Bernhardt, M. L., Kim, A. M., O'Halloran, T. V., Woodruff, T. K. 2012. Zinc Maintains Prophase I Arrest in Mouse Oocytes Through Regulation of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction*. 87 (1). 1-12.
- Kongtawelert, P., Ghosh, P. 1990. A method for the quantification of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Analytical Biochemistry*. 185. 313-318.
- Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 82. 14-23.
- Lamar, C. A., Mahesh, V. B., Brann, D. W. 1996. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by heme molecules: A regulatory role for carbon monoxide? *Endocrinology*. 137. 790-793.
- Lamas, S., Michel, T., Collins, T., Brenner, B. M., Marsden, P. A. 1992. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. 90 (3). 879-887.
- Lastro, M., Collins, S., Curie, W. B. 2006. Adenylyl cyclases in oocyte maturation: a characterization of AC isoforms in bovine cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development*. 73. 1202-1210.
- Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Slang, M., Guo, J. Z. 2006. Localization of cystathionine β synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119 (22). 1877-1883.

- Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Slang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathionine synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24. 89-96.
- Lindner, H. R., Tsafiri, A., Lieberman, M. E., Zor, U., Koch, Y., Bauminger, S., Barnea, A. 1974. Gonadotropin action on cultured Graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. *Recent Progress in Hormone Research*. 30. 79-138.
- Lisle, R. S., Anthony, K., Randall, M. W., Diaz, F. Oocyte-cumulus cell interactions regulate free intracellular zinc in mouse oocytes. *Reproduction* [online]. February 2013. [cit. 2013-03-10]. Dostupné z <<http://www.reproductiononline.org/content/early/2013/02/12/REP-12-0338.long>>.
- Mattioli, M., Gioia, L., Barboni, B. 1998. Calcium elevation in Wheel cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Molecular Reproduction and Development*. 50. 361-369.
- 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.
- Masui Y., Markert C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 177. 129-146.
- McCann, S. M. 1982. Physiology and pharmacology of LHRH and somatostatin. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 22. 491-515.
- McCoubrey. W. K., Huang, T. J., Maines, M. D. 1997. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*. 247. 725-732.
- Merchant-Larios, H., Chimal-Monroy, J. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Progress in Clinical and Biological Research*. 296. 55-63.
- Meyer, K. 1958. Chemical structure of hyaluronic acid. *Federation Proceedings*. 17 (4). 1075-1077.
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Inagaki. K., Otani, H., Takeda, M., Suzuki, J., Goto, J., Ogura, T., Makino, H. 2007. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production. *Endocrinology*. 148. 337-345.

- 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). 371-377.
- Moccia, F., Bertoni, G., Pla, A. F., Dragoni, S., Pupo, E., Merlino, A., Mancardi, D., Munaron, L., Tanzi, F. 2011. Hydrogen sulfide regulates intracellular Ca²⁺ concentration in endothelial cells from excised rat aorta. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 12 (9). 1416-1426.
- Morita, T., Perrella, M. A., Lee, M. E., Kourembanas, S. 1995. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (5). 1475-1479.
- Motlík J, Procházka R, Nagyová E, Schellander K, Brem G: Paracrine and autocrine regulation of cumulus expansion in porcine follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, 33, 1998: 181-185.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2. 323-328.
- Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.
- Muramatsu, K., Sheldon, R. A., Black, S. M., Täuber, M., Ferriero, D. M. 2000. Nitric oxide synthase activity and inhibition after neonatal hypoxia ischemia in the mouse brain. *Developmental Brain Research*. 123(2). 119-27.
- 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 Signaling*. 2. 72.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Snyder, S. H. Signaling by Gasotransmitters. *Science signaling* [online]. April 2009. 2 (68). [cit. 2013-01-20]. Dostupné z <<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;2/68/re2?view=abstract> >.
- Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., Barodka, V.M., Gazi, F. K., Barrow, R. K., Wang, R., Amzel, L. M., Berkowitz, D. E., Snyder, S. H. 2011. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circulation research*. 109 (11). 1259-1268.
- Nagyová, E., Procházka, R., Vanderhyden, B. C. 1999. Oocyectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic

acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biology of Reproduction*. 61. 569-574.

- Nagyová, E., Vanderhyden, B. C., Procházka, R. 2000. Secretion of paracrine factors enabling expansion of cumulus cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 1149-1156.
- Naito, K., Fukuda, Y., Toyoda, Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Research*. 21(3). 289-95.
- Nakagawa, H., Kimura, H. 1968. Purification and properties of cystathionine synthetase from rat liver: separation of cystathionine synthetase from serine dehydratase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 32. 209-214.
- Nakayama, T., Inoue, M., Sato, E. 1996. Effect of oocytectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 55. 1299-1304.
- Nebreda, A. R., Gannon, J. V., Hunt, T. 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*. 14 (22). 5597-5607.
- Němcová, L., Nagyová, E., Petlach, M., Tománek, M., Procházka, R. 2007. Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes. *Biology of reproduction*. 76. 1016-1024.
- Nilsson, E., Parrott, J. A., Skinner, M. K., 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 175. 123-130.
- Nilsson, E., Skinner, M. K. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 8. 17-20.
- Nishida, E., Gotoh, Y. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochemical Science*, 18. 128-131.
- Njie-Mbye, Y. F., Kulkarni, M., Opere, C. A., Ohia, S. E. 2012. Mechanism of action of hydrogen sulfide on cyclic AMP formation in rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 98. 16-22.

- Norbury, C., Nurse, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*. 61. 441-470.
- Oh, G. S., Pae, H. O., Lee, B. S., Kim, B. N., Kim, J. M., Kim, H. R., Jeon, S. B., Jeon, W. K., Chae, H. J., Chung, H. T. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine Journal*. 41. 106-119.
- Pae, H. O., Lee, Y. C., Jo, E. K., Chung, H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research*. 32 (8). 1155-1162.
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*. 327. 524-526.
- Patel, P., Vatish, M., Heptinstall, J., Wang, R., Carson, R. 2009. The endogenous production of hydrogen sulfide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7. 1-9.
- Paul, B. D., Snyder, S. H. 2012. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13. 499-507.
- Peng, X. R., Hsueh, A. J., Lapilly, P. S., Bjersing, L., Ny, T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 129. 3200-3207.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27-37.
- Pirino, G., Wescott, M. P., Donova, P. J. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*. 8 (4). 665-70.
- Predmore, B. L., Lefer, D. J., Gojon, G. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine. *Antioxidant and Redox Signaling* [online]. July 1. 17 (1). [cit. 2013-02-10]. Dostupné z <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ars.2012.4612>>.
- Procházka, R., Bláha, M., Němcová, L. 2012. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction*. 144 (5). 535-546.

- Qian, Y., Shi, W. Q., Ding, J. T., Sha, J. H., Fan, B. Q. 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 49(2). 167-74.
- Regassa, A., Rings, F., Hoelker, M., Cinar, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye, D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics* [online]. January 2011. 12 (57). [cit. 2013-02-03]. Dostupné z < <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/57>>.
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C., Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 32. 109-134.
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., Sharma, S. C. 2002. Novel signalling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormon Research*. 57. 195-220.
- Roux, P. P.; Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (2). 320-344.
- Russell, D. L., Salustri, A. 2006. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Seminars in Reproductive Medicine*. 24 (4). 217-227.
- Salustri, A. 2000. Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *International Journal of Developmental Biology*. 44. 591-597.
- Searcy, D. G., Lee, S. H. 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 282 (3). 310-322.
- Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. 2005. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146. 1236-1244.
- 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*. 147. 2280-2286.
- Sen, N., Snyder, S. H. 2010. Protein modifications involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling. *Trends in Neurosciences*. 33. 493-502.
- Senbon, S., Hirao, Y., Miyano, T. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *Journal of Reproduction and Development*. 49. 259-269.

- Shibuya , N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11. 703-714.
- Shoji, S., Yoshida, N., Amanti, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., Perry, A. C. F. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo Journal*. 25. 834-845.
- Schlossmann, K., Brueggemann, J., Lynen, F. 1962. Biosynthesis of cysteine. I. Detection and isolation of serine sulfhydrase from baker's yeast. *Biochemische Zeitschrift*. 336. 258-273.
- Sidhu, R., Singh, M., Samir, G., Carson, R. J. 2001. L-cysteine and sodium hydrosulphide inhibit spontaneous contractility in isolated pregnant rat uterine strips in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 88, 2001: 198–203.
- Simon, A. M., Chen, H., Jackson, C. L. 2006. Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles. *Cell Communication and Adhesion*. 13. 61-77.
- Soares , M. P., Usheva, A., Brouard, S., Berbera, P. O., Gunther, L., Tobiasch, E., Bach, F. H. 2002. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxidants and Redox Signaling*. 4. 321-329.
- Solursh, M. 1976. Glycosaminoglycan synthesis in the chick gastrula. *Developmental Biology*. 50. 525-530.
- Sorensen, R. A., Cyert, M. S., Pedersen, R. A. 1985. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*. 100 (5). 1637-1640.
- Sorensen, R. A., Wassarman. P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50. 531-536.
- Soyol, S. M., Amleh, A., Dean, J., 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127. 4645-4654.
- Srilatha, B., Adakain, P. G., Moore, K. 2006. Possible role in the novel neurotransmitter hydrogen sulphide in erectile dysfunction – a pilot study. *European Journal of Pharmacology*. 535 (1-3). 280- 282.
- Srilatha, B., Hu, L., Adaikan, G. P., Moore, P. K. 2009. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. *Journal of Sexual Medicine*. 6 (7). 1875-1884.
- Stárka, L. 2009. Sulfan – další plynný hormon? *Chemické Listy*. 103. 28-31.

- Stipanuk, M.H., Beck, P.W. 1982. Characterization of the enzymatic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochemical Journal*. 206. 267-277.
- Sugiura, K., Naito, K., Endo, T., Tojo, H. 2006. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/Mphase-promoting factor activity during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 74. 593-600.
- Sugiura, Y., Kashiba, M., Maruyama, K., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Goda, N., Suematsu, M. 2005. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 7. 781-787.
- Sun Q.Y., Lai L., Park K.W., Kuhholzer B., Prather R.S., Schatten H., 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogenactivated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 64. 871-889.
- Šmelcová, M., Tichovská, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: A Review. *Scientia agriculturae bohémica*, 42 (4). 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. 415-425.
- Taieb, R., Thibier, C., Jesus, C. 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 48. 397-411.
- Taniguchi, S., Kang, L., Komára, T., Niki, I. 2011. Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic beta-cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress. *British Journal of Pharmacology*. 162. 1171-1178.
- Tao, Y., Xie, H., Hong, H., Chen, X., Jang, J., Xia, G. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13. 1-9.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 244. 6388-6394.
- Thibault, C., Szölösi, D., Féraud, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Development*. 27. 865-895.
- Tiong, C. X., Lu, M., Bian, J. S. 2010. Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *British Journal of Pharmacology*. 161 (2). 467-480.

- Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*. 121. 51-75.
- van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63. 1717-1751.
- Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbos, P. J. L., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C.P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 96. 2719-2726.
- Vanderhyden, B. C., Armstrong, D. T. 1989. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 40 (4). 720-728.
- Viana, K. S., Caldas-Bussiere, M. C., Matta, S. G. C., Faes, M. R., Paes de Carvalho, C. S., Quirino, C. R. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 102. 217-227.
- Volpi, N. 2000. Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by High-Performance Liquid Chromatography and fluorometric detection with dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*. 277. 19-24.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*. 16. 1792-1798.
- Wang, X. N., Greenwald, G. S. 1993. Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biology of reproduction*. 48. 585-594.
- Wassarman, P. M. 1988. The Mammalian ovum. 69-102. In: Knobil, E., Neil, J., editors. 1988. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. p. 2413.
- Wassarman, P., Albertini, D.F. 1994. *The Mammalian Ovum, Second Edition*. The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York. p.79-122.
- Wehrend, A., Meinecke, B. 1998. The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 33. 289-297.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. 1988, 135-185. In: Knobil, E.; Neil, J. et al. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. 2413 pp.
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., Wang, R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant:

hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 322. 587-590.

- Yang, M. Y., Fortune, J. E. 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of Reproduction*. 78. 1153-1161.
- Zakhary , R., Gaine, S. P., Dinerman, J. L., Ruat, M., Flavahan, N. A., Snyder, S. H. 1996. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 93. 795-798.
- Zhang, Y., Tang, Z. H., Ren, Z., Qu, S. L., Liu, M. H., Liu, L. S., Jiang, Z. S. Hydrogen sulfide: next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases. *Molecular and Cellular Biology* [online]. January 2013. 1215 (12). [cit. 2013-02-10]. Dostupné z <<http://mcb.asm.org/content/early/2013/01/03/MCB.01215-12.full.pdf>>.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO Journal*. 20. 6008-601.