

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplin

Oxid dusnatý a meiotická kompetence oocytů prasete

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

Autor práce: Bc. Jana Horáková

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Oxid dusnatý a meiotická kompetence oocytů prasete“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za vedení při psaní diplomové práce, za její trpělivost, obětavost a cenné rady, které mi usnadnily vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat všem ostatním z Katedry veterinárních disciplín za jejich vstřícnost a nápomoc nejen při laboratorní práci. Mé díky patří i Čendoslafovi, který mi velice pomohl, hlavně po psychické stránce.

Souhrn

Oocyty jsou důležité pro biotechnologie, které se v současné době prudce rozvíjejí. U prasete naráží uplatnění biotechnologií na řadu problémů, a proto je účinnost biotechnologií u tohoto druhu stále ještě extrémně nízká. Vzhledem k tomu, že je prase kromě hospodářského využití také modelovým organismem pro biomedicínu, je třeba účinnost biotechnologií zvýšit. Pro biotechnologie je třeba dostatek kvalitních embryí, pro jejich získání je potřeba dostatek zralých oocytů.

Dosud nejsou objasněny procesy, ke kterým dochází v oocytech během růstové periody, kterou oocyty musí projít a během níž získávají schopnost dokončit meiotické zránění. Významnou úlohu v nich může sehrávat signální molekula oxidu dusnatého produkovaná enzymem NO-syntázou.

Předložená práce si kladla za cíl ověřit hypotézu, podle které se na procesu získání meiotické kompetence prasečího oocyty podílí oxid dusnatý (NO) produkovaný syntézou oxidu dusnatého.

V našich experimentech jsme nejprve ověřovali stupeň meiotické kompetence oocytů prasete v závislosti na velikosti oocyty v našich laboratorních podmínkách. Zjistili jsme, že oocyty získávají meiotickou kompetenci kontinuálně během fáze růstu. Dále jsme se zaměřili na sledování účinku donorů NO, inhibitorů NOS a jejich kombinace na oocyty s částečnou a plnou meiotickou kompetencí. Zjistili jsme, že inhibitory NOS blokují jak částečně, tak plně meioticky kompetentní oocyty. Účinek donoru NO byl závislý na použité koncentraci donoru, NO v nízké koncentraci (0,1 a 0,3 mM SNAP) nepůsobil na oocyty inhibičně, zatímco NO ve vysokých dávkách na oocyty inhibiční účinek měl. Dále jsme zjistili, že inhibiční účinek NO vyvolaný některým z inhibitorů NOS lze zvrátit současnou kultivací oocytů s NO donorem.

Naše experimenty prokázaly, že oxid dusnatý a také jeho producent, syntéza oxidu dusnatého, jsou důležité pro růstovou periodu oocyty prasete a proces získání meiotické kompetence, k jejíž nabývání během růstové fáze oogeneze dochází.

Klíčová slova: oocyt, prase, meiotická kompetence, oxid dusnatý, inhibitory NOS

Summary

Oocytes are important for biotechnologies, which are currently being rapidly developed. The application of biotechnologies in pigs faces a number of problems, and thus the effectiveness of biotechnologies in is still extremely low in this species. Whereas the pig except the economic exploitation is a model organism for biomedical, is neceséry to increase efficiency of biotechnologies. Biotechnology should be just enough high-quality embryos for profit need to have enough mature oocytes.

The processes which occur in oocytes during the growth period ans during acquisition of meiotic competence are not yet clarified to date. The growing period, the oocytes must undergo, and during which they acquired the ability to complete meiotic maturation. Very important role could play nitric oxide and its producent nitric oxide synthase.

The aim of this work was to verify the hypothesis that nitric oxide and nitric oxide synthase play a role during porcine oocyte groth and acquisition of meiotic competence. According to which the acquisition of meiotic competence of porcine oocyte involved nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS).

In our experiments, we first tested the level of meiotic competence of pig oocytes, depending on the size of the oocyte in our laboratory. We verified that oocytes acquire meiotic competence continuously during the growth phase. We also focused on monitoring the effect of NO donors, NOS inhibitors and their combination on oocytes with partial and fully-developed meiotic competence. We found that NOS inhibitors block both partially and fully competent porcine oocytes. The effect of NO donors was dependent on the applied concentration of NO, NO in low concentrations (0.1 and 0.3 mM SNAP) did not have inhibitory effect on oocytes not act on inhibitory, whereas NO at high doses had on oocytes stimulatory effect. Furthermore, we found that the inhibitory effect of NO produced by some of the NOS inhibitors can be reversed by the cultivation of oocytes in culture medium with NO donor the current culture of oocytes in the NO donors.

Our experiments have shown that nitric oxide and its producer, the synthesis of nitric oxide, are important for the growth period and the process of pig oocyte meiotic competence gain, to which the acquisition during the growth phase of oogenesis occurs.

Key words: oocyte, pig, meiotic competence, nitric oxide, inhibitors NOS

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíl práce.....	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Vývoj oocyty.....	9
3.1.1 Struktura oocyty	9
3.1.2 Oogeneze.....	10
3.1.3 Folikulogeneze	11
3.2 Ovariální aktivita a růst folikulů.....	12
3.3 Meióza	13
3.3.1 První meiotický blok	13
3.3.2 Druhý meiotický blok.....	14
3.4 Meiotická kompetence.....	15
3.5 Faktory podílející se na regulaci oocyty	16
3.5.1 cAMP (Cyklický adenosinmonofosfát).....	16
3.5.2 cGMP (Cyklický guanosinmonofosfát).....	16
3.5.3 OMI (Oocyt maturation inhibitor).....	17
3.5.4 PKC (Protein kinaza C).....	17
3.5.5 MPF (M phase-Promoting Factor)	18
3.5.6 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)	18
3.5.7 CSF (Cytostatic Factor).....	19
3.5.8 Vápník	20
3.6 Oxid dusnatý (NO).....	21
3.6.1 Význam NO.....	21
3.6.2 Biosyntéza NO	22
3.6.3 Fyziologické působení NO	22
3.6.4 NOS a izoformy.....	23
3.6.5 Regulace NOS	25
3.6.6 Inhibitory NOS	26
3.6.7 Vliv NO na reprodukční orgány samic	27
3.6.8 Úloha NO na regulaci meiotického zrání	28
3.6.9 NO a aktivace prasečích oocytů	31
4. Materiál a metody	33
4.1 Získávání vaječníků a oocytů.....	33
4.1.1 Získ rostoucích oocytů	33
4.1.2 Získ oocytů s ukončeným růstem.....	33
4.2 Experimentální schéma	34
4.2.1 Ověření meiotické kompetence	34
4.2.2 Ověření účinku inhibitorů NOS.....	35
4.2.3 Ověření účinku NO donoru	35
4.2.4 Kombinovaný účinek inhibitorů NOS a donorů NO na oocyty	36
4.2.5 Statistická analýza	36
5. Výsledky	37
5.1 Ověření meiotické kompetence oocytů v našich laboratorních podmínkách.....	37
5.2 Ověření účinku inhibitorů NOS	37
5.3 Ověření účinku NO donoru	41
5.4 Kombinovaný účinek inhibitorů NOS a donorů NO na oocyty.....	42
6. Diskuse.....	43
7. Závěr	45
8. Seznam literatury	46
9. Přílohy.....	60

1. Úvod

V posledních letech došlo k prudkému rozvoji biotechnologií, jež se významně projevil také v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. U prasat se biotechnologické postupy prosazují jen pomalu a jejich účinnost je stále ještě extrémně nízká. Vzhledem k tomu, že prase je kromě hospodářského využití významným biomedicínským modelem je třeba účinnost používaných biotechnických metod u tohoto druhu zvýšit. Jedním z klíčových problémů je nedostatečná znalost mechanismů regulujících růst a meiotické zrání oocytů prasete.

Významnou úlohu může sehrávat oxid dusnatý produkovaný enzymem NO - syntázou.

Má práce si kladla za cíl poznat úlohu NO - syntázy a oxidu dusnatého během růstové fáze oocytu prasete v souvislosti s procesem získu meiotické kompetence.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, podle které se enzym NOS produkcí oxidu dusnatého aktivně zapojuje do regulace růstové fáze a zisku meiotické kompetence oocytů prasete.

3. Literární rešerše

3.1 Vývoj oocytu

V párových žlázách, vaječnicích, se produkují pohlavní hormony, estrogeny a progesteron a vyvíjí vajíčka (vajíčko = „oocyt“ z řečtiny, „ovocyt“ latinsky, převzaté z řečtiny). Základ pohlavních žláz se tvoří v bederní oblasti zárodku z pohlavních lišt. Tím vznikají gonády. V zárodečném epitelu se nachází kmenové buňky, gonocyty. Z těch pak vznikají primordiální zárodečné buňky (PGC), základ pro oocyty. Folikuly se vyvíjejí z buněčných provazců, které tvoří rozrůstající zárodečný epitel uvnitř mezenchymu vyječnicku (Reece 1998).

U prasnic mají vaječníky tvar hroznovitý, což je způsobeno početnými vyčnívajícemi folikuly a žlutými tělisky. Starší samice mají větší vaječník tvaru protáhlého hroznu o délce 4-5 cm a hmotnosti 10-15 g. Vaječníky jsou ukryty v prostorném vaječnickovém vaku díky dlouhému okruží zasahují až do dutiny břišní (Reece 1998, Marvan 1998). Místo, kde praskají vaječnickové folikuly se nazývá ovulační plocha, která je na většině povrchu vaječnicku. Tato ovulační plocha je u mladých zvířat kryta cylindrickým epitelem, později kubickým, a u starších zvířat dlaždicovým. Pod touto vrstvou se nachází bělavý obal z kolagenního vaziva, který slouží jako vazivové pouzdro. Skládá se z povrchové korové vrstvy a z cévní vrstvy. Folikuly jsou uloženy ve vazivovém stromatu kůry (Marvan, 1998).

3.1.1 Struktura oocytu

Tvar je pravidelně kulovitý, obsah tvoří ovoplazma (zrnitá cytoplasma) obsahující žloutkové inkluze. Jádro oocytu je oválné a obsahuje jadérko. *Zona pellucida* je sekundární obal přiložený na bláně oocytu a je tvořen produktem folikulárních buněk, které se podle rozmístění označují jako *corona radiata*. Tuto vrstvu vajíčko brzy po oplození ztrácí. Velikost oocytu u prasete je 120-150 μm (Marvan, 1998).

3.1.2 Oogeneze

Oogeneze začíná formováním primordiálních zárodečných buněk (PGC – Primordial Germ Cell) ze zárodečné linie v kůře vaječníků, z nichž během vývoje vzniknou zralé oplození schopné samičí pohlavní buňky - oocyty. Jejich vývoj začíná již v prenatálním období (Štípek, 2009). Oogeneze se uskutečňuje ve folikulech vaječniku, vývoj vajíčka zahrnuje fázi množení, růstu a zrání.

Fáze množení: PGC vznikají v oblasti extra-embryonálního mezodermu a během vývoje embrya migrují do místa vzniku pohlavní lišty, zde se PGC několikanásobně mitoticky dělí (Vanderhyden, 2002). Zárodečné buňky se mění v oogonie, když se na povrch gonád přesouvají primordiální buňky s podpůrnými epiteliárními buňkami, které se dělí do kůry gonád (Wassarman, 1988). Prekurzorovou buňkou v prenatálním období je oogonie. Ty se mohou mitoticky dělit a jejich přeměnou také vznikají diploidní primární oocyty. Okolo primárních oocytů se formuje jednovrstevný obal z folikulárních buněk. Tento útvar označujeme jako primordiální folikul. Ještě v prenatálním období vstupují primární oocyty do prvního meiotického dělení. To se nedokončí, neboť je zastaveno již v průběhu profáze, přesněji v diplotenním stádiu (diktyotenní stádium – prodloužené diplotenní stadium), kdy v prenatálním období je tato fáze množení přerušena a přetrvává různě dlouhou dobu, až do puberty, kdy teprve vývoj pokračuje (Štípek 2009, Marvan 1998). Fáze množení pokračuje i v dospělosti, kdy vznikají oocyty ze zárodečných buněk. Zdrojem těchto buněk může být i extragonadální tkáň (krevní buňky nebo kostní dřev) (Johnson, 2004).

Fáze růstu: zahrnuje dlouhé období a trvá až do konce pohlavní činnosti. Od začátku pohlavní dospělosti (puberta) v průběhu každého ovariálního cyklu vstupuje do fáze růstu vždy několik primárních oocytů. Pro toto období je charakteristické zvětšování jak primárních oocytů, tak okolní folikulární buňky, růst jádra, aktivní syntéza RNA a proteinů, hromadění žlutkových inkluzí, vznik a hromadění kortikálních zrn pod jadernou membránou, důležitý pro zajištění monospermatického typu oplození. Pro fázi růstu je důležitý celkový vývoj vaječnickových folikulů. Okolo primárního oocytu se objevuje vrstva glykoproteinové hmoty (*zona pellucida*). Vzniklý útvar se nazývá primární folikul (rostoucí folikul) (Marvan, 1998).

Fáze zrání: počátek proběhl již v prenatálním období, kdy byl přerušen v diplotenním stadiu prvního zracího dělení, dokončuje se před ovulací. V jádře oocytu mizí jaderná membrána a vytvoří se dělicí vřeténko. Následuje metafáze prvního zracího dělení, kdy jedna sada chromozomů se spolu s malým množstvím cytoplazmy oddělí od oocytu. Vzniklý útvar je označován jako primární polocyt (pólové tělísko). Brzy potom bez rekonstrukce interfázového jádra vstupuje oocyt do druhého zracího dělení, přerušeného v metafázi. Zralý oocyt (sekundární) je při ovulaci v metafázi druhého zracího dělení a obsahuje haploidní počet chromozomů. Druhé zrací dělení je dokončeno jedině v případě oplození. Dochází k oddělení jedné sady chromozomů s malou částí cytoplazmy do sekundárního polocyty. Oba polocyty nemají schopnost vývoje, i když první polocyt se ještě může dělit. V následujícím období degenerují. Nedojde-li k oplození, degeneruje a zaniká i oocyt. Vznikají tak 2-3 pólová tělíška a jeden zralý oocyt (Marvan, 1998).

3.1.3 Folikulogeneze

Folikuly uvnitř kůry jsou klasifikovány jako **primární** (primordiální), **sekundární** folikuly (rostoucí) a **Graafovy** folikuly neboli měchýřkovité (Marvan, 1998).

Primární folikuly obsahují jeden oocyt, který je obklopen jednou vrstvou granulóznic buněk. Oocyty vznikají mitózou z oogonií zárodečného epitelu, které pak migrují do ovaria (Reece, 1998).

Sekundární folikuly jsou ty, které začaly růst z klidového stádia primárních folikulů, ale ještě neutvořily vrstvy obalu folikulu a antrum (dutina naplněnou tekutinou). Diferenciace antra u prasat začíná při velikosti folikulů, který má v průměru 0,4-0,8 mm (Hirao *et al.*, 1994). Oocyty obklopují dvě nebo více vrstev granulóznic buněk. S pokračováním růstu vznikají další vrstvy. Dalším obalem oocyty je *zona pellucida*. Jejimi póry procházejí výběžky granulóznic buněk a tím dochází k interakci mezi granulózními buňkami a povrchem oocyty. Vytváří se gap junctions neboli mezibuněčné spoje mezi oocytem a granulózními buňkami (Sun, 2003). Folikul s vícevrstevným obalem folikulárních buněk a dutinkou (*antrum*) se potom nazývá sekundární folikul (Reece, 1998).

Vrcholem vývoje folikulu je Graafův folikul (měchýřkovitý) nebo terciální folikul, kdy se diferencují buňky okolo oocyty do *theca interna* a *externa*, který je opět větší, vyplněný velkou dutinou s tekutinou (*antrum folliculi*) (Fair, 2003). Tato dutina (*antrum folliculi*) je dobře viditelná. Vajíčko je na jedné straně spojeno s vrstvou folikulárních buněk, které tvoří obal folikulu (jako tzv. *membrana granulosa*). Nad vrstvou těchto buněk jsou

potom buňky thekální, vnější a vnitřní obal folikulu (*theca folliculi externa* a *theca folliculi interna*). Při ovulaci dojde k prasknutí Graafova folikulu a k uvolnění oocytu. Ten je zachycen (či "nasát") vejcovodem, kterým putuje směrem k děloze (Reece 1998, Štípek 2009).

3.2 Ovariální aktivita a růst folikulů

Ovariální aktivita začíná pubertou, což je začátek reprodukčního období života. Vznik Graafova folikulu z rostoucího folikulu je závislý na působení hormonů a začíná při dosažení puberty, kdy se tonická hladina LH a FSH začíná zvyšovat a klesat s průběhem každého estrálního cyklu. Intersticiální buňky začínají obklopotvat bazální membránu granulóznicích buněk, aby vytvořily obal, který se pak diferencuje na vnější a vnitřní vrstvu (*theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*) jakmile se kolem folikulu vytvoří thekální buňky, začnou se mezi nimi vyvíjet kapiláry. Thekální kapiláry se zvětšují a jsou soustředěny do *theka interna* těsně u bazální membrány, která odděluje buňky *theka interna* od granulóznicích buněk. Na buňkách *theka interna* se formují receptory pro LH a na buňkách granulóznicích se formují receptory pro FSH a estrogény.

V období hormonálního řízení jsou pod vlivem LH produkovány buňkami vrstvy *theka interna* androgeny. Ty difundují z *theka interna* do granulóznicích buněk. Pod vlivem FSH konvertují granulóznicí buňky androgeny na estrogény. Produkované estrogény vyvolávají růst a dělení granulóznicích buněk spolu s FSH stimulují granulóznicí buňky k produkci sekretů, které způsobí separaci granulóznicích buněk a vytvoří se dutina *antrum*, naplněná folikulární tekutinou. FSH rovněž stimuluje tvorbu receptorů pro LH na granulóznicích buňkách. Vzestup výdeje LH (předovulační vlna) se vyskytuje okolo 24 hod před ovulací. LH vlna hraje jednak rozhodující roli při ovulaci a utváření žlutého tělíska. Dále způsobuje redukci počtu FSH receptorů na granulóznicích buňkách, takže produkce estrogenů granulóznicími buňkami klesá (Reece, 1998).

3.3 Meióza

Meiotické zrání má dvě za sebou jdoucí fáze, první meiotické dělení a druhé meiotické dělení, mezi kterými není S-fáze (Kishimoto, 2003). Výsledkem dělení je redukce počtu chromozómů na haploidní. Součástí je i rekombinace jejich genetické výbavy, tak zvaný crossing over, pocházející z maternální i paternální strany. Náhodné rozdělení homologních chromozómů v heterotypickém dělení a ve spojení s oplozením, má význam pro evoluci tím, že se rozšiřuje genový základ potomka (Sládeček, 1986).

Přechod z prvního meiotického dělení do druhého je typický znak meiózy, probíhá však bez interfáze. Tudíž po ukončení MI fáze a vydělení pólového tělíska nedochází k replikaci DNA a nevytváří se jaderná membrána (Taieb *et al.*, 1997). Po prvním meiotickém dělení se však vytváří nové meiotické vřetenko a sesterské chomatydy zůstávají kondenzované. Během přechodu z prvního do druhého dělení metafáz hraje důležitou roli Mos (aktivní katalytická součást CSF) a MAPK (extracelulárně regulovaná kináza - Mitogen Activated Protein Kinase).

3.3.1 První meiotický blok

Blok meiózy je relativně velmi dlouhý, protože ke znovuzahájení meiózy dochází u vybrané populace oocytů až po pubertě, při prvních pohlavních cyklech samice. Značná část oocytů setrvává ve vaječniku i nadále v prvním meiotickém bloku a jejich meióza může být znovuzahájena třeba až těsně před vyhasnutím pohlavních funkcí samice.

U vybrané populace oocytů dochází během pohlavního cyklu v odezvě na hormonální změny v organismu (především pak v odezvě na krátkodobé, ale prudké zvýšení hladin luteinizačního hormonu v těle) ke znovuzahájení meiózy. Oocyt projde metafází prvního meiotického dělení a přes anafázi a telofázi vstoupí do metafáze druhého meiotického dělení. Tento proces tzv. zrání oocytu probíhá uvnitř zrajícího folikulu.

Zrání folikulu končí ovulací (tj. prasknutím folikulární stěny a uvolněním vajíčka z folikulu do vejcovodu) a následnou proměnou prasklého folikulu na žluté tělísko. Zrání oocytu je završeno dosažením metafáze druhého meiotického dělení, kdy oocyt vydělí polovinu své dědičné informace v prvním pólovém tělísku. V této fázi meiózy oocyt ovuluje a opět meiózu zastaví (Petr, 1998).

Výstupem z prvního meiotického bloku je rozpad zárodečného váčku (GVBD). Chromatin zárodečného váčku prasečích oocytů byl rozdělen do 5 tříd podle stupně kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány:

- GV0: je charakteristická jasně viditelným jádrem a membránou kolem něj.
- GV1: okolo jádra se začíná kondenzovat chromatin do kruhu či podkovy.
- GV2: formování několik skupinek chromatinu už nejen kolem jádra, ale i kolem jaderné membrány.
- GV3: chromatin kondenzován do skupin nebo vláken po celé jaderné plazmě.
- GV4: ztrácí se jaderná membrána a jádro, kondenzovaný chromatin zůstává (Sun *et al.*, 2004).

MPF a MAPK jsou zodpovědné za rozpad zárodečného váčku (Kubelka *et al.*, 2002).

3.3.2 Druhý meiotický blok

Další pokračování meiózy je možné jen po tzv. aktivačním stimulu. Ten za normálních okolností zajistí oocytu průnik spermie při oplození. Významnou složku aktivačního stimulu představuje zvýšení koncentrace volných iontů vápníku v cytoplasmě oocytu. Teprve průnikem (penetrací) spermie je meióza opět spuštěna. Oocyt projde anafází a telofází druhého meiotického dělení a vydělí opět polovinu své stávající dědičné informace v druhém pólovém tělísku. Zároveň se dramaticky změní kvalita cytoplasmy oocytu, která už nedovoluje kondenzaci chromatinu. Ve své podstatě jde o změnu v aktivitě kináz, jež se obecně podílejí na řízení buněčného cyklu. Dekondenzací mateřského chromatinu vzniká samičí prvojádru, dekonzenzací chromatinu z hlavičky spermie vzniká samčí prvojádru. Ty vzájemnou syngamií vytvoří dědičnou informaci zárodku spojující dědičnou informaci matky a otce (Petr, 1998).

3.4 Meiotická kompetence

Tímto pojmem označujeme schopnost oocytu dosáhnout druhé meiotické metafáze. Oocyt je schopen vydělit 1. pólóvé tělísko a dosáhnout metafáze II (Jelínková, 2009). Také může reagovat na působení hormonů a znovu zahájit meiózu. Tato schopnost podstoupit kompletní meiotické zrání se vyvíjí postupně během růstu oocytu se závislostí na jeho velikosti (Motlík, 1976). Během fáze růstu dochází v oocytu k intenzivní transkripci, translaci a syntéze nových organel, které tvoří zásobu pro následující meiotické zrání a preimplantační vývoj embrya a tyto změny souvisí se získáním meiotické kompetence. Oocyty na začátku svého růstu nejsou schopny zahájit zrání, jsou zcela meioticky nekompetentní. Oocyty částečně meioticky kompetentní jsou ty, které jsou schopny zahájit zrání, dojít do meiotické metafáze I, ale již neprolomí meiotický blok. Teprve oocyty s ukončeným růstem mají plně vyvinutou kompetenci a jsou oplození schopné. V posledním stádiu folikulogeneze je plně dorostlý („fully grown“ - FG) oocyt v Graafově folikulu. Může docházet ke stimulaci zvýšením hladiny luteinizačního hormonu („LH-peak“). To vede k ovulaci a znovuzahájení meiózy a v důsledku kondenzace chromatinu k ukončení transkripční aktivity. Podle Motlíka (1984) je známkou nabytí meiotické kompetence u velké části savců vytvoření antra ve folikulu a jeho velikostí. Po dosažení meiotické kompetence dokončuje oocyt svou diferenciaci dosažením schopnosti podporovat cytoplazmatické zrání a konečně také schopnost být úspěšně oplozen a vyvinout se v živé embryo (Marchal, 2002).

3.5 Faktory podílející se na regulaci oocytu

3.5.1 cAMP (Cyklický adenosinmonofosfát)

Cyklický adenosinmonofosfát patří mezi významné regulátory meiotického zrání, je rozpustný ve vodě, může přenášet signál z místa na membráně, kde je syntetizován, k proteinům v cytosolu, jádru nebo jiných částech membrány. Cyklický AMP vyvolává různé účinky hlavně aktivací enzymu cAMP-dependentní proteinkinázy (A-kinázy nebo PKA). PKA má dvě podjednotky, katalytickou (K) a regulační (R) (Wassarman, 1988). Kináza je vázaná v komplexu s jiným proteinem, ale navázáním cAMP způsobí konformační změnu, která uvolní aktivační enzym. Aktivní protein kináza pak katalyzuje fosforylaci určitých serinů či threoninů v jiných vnitrobuněčných proteinech, tak se mění jejich aktivita (Alberts, 1998).

Cyklický AMP má důležitou roli v udržení meiotického bloku v dityotenní fázi. Opětovný vstup oocytu do meiózy vyvolá úbytek intracelulárního cAMP. Za pokles množství cAMP v oocytech v in vitro i v in vivo může zánik jaderné membrány, ale i zvýšení jeho hydrolytické degradace fosfodiesterázou nebo zastavení přenosu cAMP přes gap junction z granulóznic buněk do oocytu (Sengoku *et al.*, 2001). Na meiotickém zrání se podílí prostřednictvím dependentní proteinkinázy. Pro udržení meiotického bloku je zapotřebí neustála fosforylace proteinů. cAMP reguluje tak meiotické zrání, které je určeno množstvím volných katalytických subjednotek. V nízkém prostředí těchto subjednotek jsou důležité fosfoproteiny oocytu defosforylovány a meiotické zrání je zahájeno (Wassarman, 1988).

3.5.2 cGMP (Cyklický guanosinmonofosfát)

Cyklický guanosinmonofosfát, další cyklický nukleotid patřící mezi významné regulátory meiotického zrání. Ve většině buněk se vyskytuje jako doplněk. Strukturou je podobný cAMP. Vnitrobuněčná signální molekula, která aktivuje krátkou signální dráhu a zajišťuje konečnou odpověď buňky (Alberts, 1998). cGMP je přeměněn v buňkách guanylát cyklázou z guanosintrifosfát (GTP). Cyklický guanosinmonofosfát snižuje vnitrobuněčnou koncentraci vápníkových iontů, což může být důležité v reprodukčních procesech. cGMP se také účastní zvyšování hladiny cAMP, který je důležitý v meiotickém zrání oocytů, a pravděpodobně zvyšuje aktivitu fosfodiesterázy (Sun a Nagai, 2003).

3.5.3 OMI (Oocyt maturation inhibitor)

Polypeptid, který je součástí folikulární tekutiny vaječníku. Inhibitor zrání oocytů (OMI), je to produkt granulózních buněk, tudíž se nachází ve folikulární tekutině. Jeho funkce je udržet oocyt v diktyotenní fázi profázi I. Velikost 1-2 kDa mu dovolí prostupovat prostřednictvím gap junction mezi kumulárními buňkami a oocytem. Inhibiční vliv OMI může být zesilován cAMP (Wassarman, 1988). Při zrání oocytů, kdy předovulační folikuly vytváří signály na LH vlnu, LH eliminuje OMI (inhibitor zrání oocytů) a to vede k aktivaci cyklinů, fosfatáz a kináz, které jsou potřeba k dosažení jaderného zrání (Hunter, 2000).

3.5.4 PKC (Protein kinaza C)

Spadá do skupiny serin/threonin protein kináz (Fan *et al.*, 2002). Izoformy PKC můžeme rozdělit do 3 skupin na základě jejich struktury a aktivátorů, a to na klasické, nové a atypické. Také jejich rozšíření a množství v buněčných tkáních je odlišné.

Klasické neboli konvenční (cPKC) mají vazbu pro diacylglycerol, vápníkové ionty a membránový fosfolipid (fosfatidylserin). Patří sem izotypy: α , β I, β II a γ .

Nové (nPKC) postrádají vazbu pro Ca^{2+} . Aktivují se diacylglycerolem, fosfatidylserinem a nenasycenými mastnými kyselinami. Patří sem izotypy: δ , ϵ , η , μ a θ .

Atypické (aPKC) nemají vazbu pro diacylglycerol ani pro vápník. Patří sem izotypy: ζ , λ a τ . (Mellor, 1998).

Jakmile je PKC aktivní, fosforyluje soubor intracelulárních proteinů (Alberts, 1998). Má důležitou roli při znovuzahájení meiózy. Podílí se na řízení přechodu z G1 fáze do S fáze a z G2 fáze do M fáze buněčného cyklu (Black, 2000). V oocytech prasete bylo zjištěno několik izoforem (α , β I, γ), které se nachází v zárodečných vajíčcích. Bohužel role v prasečích oocytech s kumuly není zcela ještě objasněna. Aktivace PKC kaskády v kumulárních buňkách je spojená se znovuzahájením meiózy. Inhibice PKC u prasečích oocytů vede k odblokování v metafázi II.

3.5.5 MPF (M phase-Promoting Factor)

Neboli M-fázi podporující faktor. Je univerzální regulátor buněčných cyklů mitózy a meiózy. Je to komplex cyklin-Cdk, který reguluje vstup do M-fáze. Rychle se zvyšuje těsně před vstupem do mitózy a rychle klesá až k nule na jejím konci. Obsahuje jedinou proteinkinázu, která je zodpovědná za jeho aktivitu. Fosforylací příslušných proteinů způsobuje tato kináza kondenzaci chromosomů, rozpad jaderného obalu a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě mitotického vřeténka. Například rozpad jaderné membrány je způsoben rozložením jaderné laminy – submembránové vrstvy laminových filamentů. MPF-kináza fosforyluje proteiny jaderné laminy a tím dochází k jejímu rozpadu. Podobně fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly, které pak mění vlastnosti mikrotubulů tak, že mohou vytvořit mitotické vřeténko. Nemůže však působit sama o sobě, protože potřebuje pro svoji funkci navázaný specifický cyklin, který pomáhá najít proteiny, které projdou fosforylací (Alberts, 1998). V průběhu buněčného cyklu se mění koncentrace cyklinů. Ubiquitin dependentní proteolýza kontroluje tyto koncentrační změny. Ke snížení koncentrace aktivního MPF dochází při narušení APC (anaphase promoting complex) komplexem Cdc2 a cyklinem B. Poté následuje výstup z M-fáze a přechod do anafáze. Molekuly cyklinů obsahují na N-konci sekvenci (destrukční box) na který se můžou v případě nutnosti navázat molekuly ubiquitinu. Ubiquitin ligáza neboli anaphase promoting complex (APC) hraje důležitou roli v rozeznávání cyklinu. Ubiquitin molekulu označí k následné degradaci v proteozómech (Šolc, 2003).

3.5.6 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

MAP kinázu tvoří 5 podrodin – ERK 1/2, jež jsou také označovány podle své molekulové hmotnosti p42 a p44 MAPK, ERK 3/4 a ERK 5, jež je označovány také jako BMK1, c - jun N - terminální kináza/stresem aktivovaná protein kináza (JNK/SAPK) a p38 MAPK MAP kináza neboli extracelulárně regulovaná kináza má svůj podíl na zrání oocytů. MAPK patří do skupiny serin/threonin protein kináz. Během zrání oocytů je vysoce aktivní (Stojkovic *et al.*, 1999). Tato kináza se aktivuje fosforylací tyrosinu v době rozpadu zárodečného váčku (GVBD) (Thibier *et al.*, 1997), ale až po aktivaci MPF. Aktivní však zůstává po celou dobu zrání oocytů, zatímco MPF klesá mezi jednotlivými metafázemi meiózy (Verlhac *et al.*, 1994). U vajíček savců je MAPK aktivována kinázovou kaskádou, ke které patří MAPK a její aktivátor MAPKK

(MAPK kináza) a produkt proto-onkogenu c-mos. U nezralých prasečích oocytů v G2 fázi, kde jsou blokovány, se v cytoplazmě nachází inaktivní MAPK (Inoue *et al.*, 1998). Při přechodu z G2 fáze do M fáze se do zárodečného váčku přesouvá část MAPK ještě před jeho rozpadem (GVBD). MAP kináza nejspíš zprostředkovává signály indukující zránění z cytoplasmy do jádra a tím navozuje pokračování meiózy. Neboť v práci, kterou napsal Inoue (1998) zkoušel dát aktivní MAPK do cytoplasmy a tím došlo k inaktivaci MAP kinázy. Nedošlo však k urychlení GVBD. Pokud MAPK dal do zárodečného váčku došlo k urychlení a při vzniku prvojader došlo k poklesu aktivity MAP kinázy.

3.5.7 CSF (Cytostatic Factor)

Je obsažen v cytoplazmě ovulovaných vajíček. Podporuje meiotický blok v průběhu druhého meiotického zránění, kde u savčích oocytů zůstává aktivita vysoká a udržuje aktivitu MPF na vysoké úrovni (Haccard 1993, Kubiak 1993). Oocyty v druhé meiotické metafázi mají vytvořené dělicí vřeténko a chromozomy narovnané v ekvatoriální rovině (Masui, 1971). Calmodulin-dependentní protein kinázou II je zajištěno potlačení aktivity. Tato kináza je spouštěna uvolňováním vápníkových iontů při oplození (Lorca, 1993).

CSF obsahuje aktivní katalytickou součást Mos, serin/threonin protein kináza, vznikající jako produkt c-mos proto-onkogenu. Tato složka je nezbytná pro aktivaci MPF, v obou fázích meiózy i v druhém meiotickém bloku oocytů v metafázi II. (Yew 1992, Hunt 1992, Sagata 1997). Však tato aktivace MPF je nepřímá, dochází nejprve k fosforylaci, kdy Mos stimuluje dráhu MAPK fosforylací MEK1 kinázy (Sagata, 1997). Má dvě funkce, a to vytváření charakteristik druhého meiotického buněčného cyklu s potlačenou S-fází a tvořit druhý meiotický blok v metafázi II se spoluprací cdc2, kdy oocyt může takto vyčkat až do oplození. Mos/MAPK má také důležitou roli v degradaci prvního pólového tělíska a v aktivaci oocytu (Stojkovic *et al.*, 1999).

3.5.8 Vápník

Intracelulární signální molekula. Bývá uskladněný v intracytoplazmatických zásobárnách jako je endoplazmatické retikulum, v mitochondriích i v dalších organelách. Je navázaný na proteiny (kalmmodulin, kalsekvestrin a kalretikulin) (Clapham, 1995). Hlavní zdroje vápníku u prasečích oocytů jsou v karyoplazmě, vakuolách, mitochondriích, na povrchu lipidových granul i cytoplazmě a jádře kumulárních buněk (Petr *et al.*, 2001). Přechod do cytosolu je zajištěn dvěma signálními kaskádami. Dráhou, která využívá IP₃ (inositol 1,4,5 – trifosfát) receptory - IP₃R. druhou dráhou je využití receptorů ryanodinu (RyR) (Clapham 1995, Petr *et al.* 2001). Pomocí ATPázovými SERCA pump jsou transportovány vápníkové ionty z cytoplazmy do lumenu zásobních organel (Pozzan *et al.*, 1994).

V době oplození je u většiny druhů významný přechod ve zvýšení hladiny Ca (Macháty *et al.*, 1997). V oocytech prasete se potvrdil význam Ca k znovuzahájení meiotického zrání. K podpoření meiotického zrání vedlo uvolňování vápníku z intracelulárních zdrojů, v metafázi I. Naopak při inhibici vápníku došlo k zastavení zrání v metafázi I. (Rozinek *et al.*, 2003).

Kalmodulin patří mezi vazebné proteiny pro Ca²⁺, jeho vlastností je aktivovat fosfatázy a dependentní kinázy (CaMK) (Matifat *et al.*, 2001). Nejvýznamnější pro vývoj oocytů je CaMK II, její vlastností je především degradace cyklinu B a tvorby meiotického vřeténka (Lorca *et al.* 1993, Fan *et al.* 2003).

Proteáza kalpain je další molekula závislá na Ca. Modifikuje proteiny buněčného cyklu, jádra, ale ovlivňuje také výstavbu a rozpad mikrotubulů (Williams, 2002). Vápené ionty také regulují spolu s kalmmodulinem a kalcineurinem, serin/treonin fosfatázu (Stewart *et al.*, 1982).

3.6 Oxid dusnatý (NO)

Biochemická tvorba oxidu dusnatého byla objasněna v roce 1991 (Moncada *et al.*, 1991). Oxid dusnatý je významný intraovariální mediátor s krátkou životností. NO patří k nejmenším a nejjednodušším biosyntetickým produktům. Enzym, který katalyzuje vznik oxidu dusnatého v buňkách je NOS (Yamauchi *et al.* 1997, Jablonka-Shariff a Olson 1997, Olson *et al.* 1996, Van Voorhis *et al.* 1995). In vivo NO vzniká oxidací guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu působením NOS za vzniku L-citrulinu (Billiar, 1995). K jeho vlastnostem patří relativní stabilita jako volného radikálu s velmi krátkým biologickým poločasem, asi 5 až 10 s (Garthwaite, 1991), snadno pronikání přes biomembrány a je hydrofobní (Kupková a Beneš, 2004).

3.6.1 Význam NO

Oxid dusnatý je důležitá signální molekula v těle savců, která má řadu funkcí (Wilkinson, 1999). Rozšiřuje cévy, podílí se na nervovém přenosu, na pozitivním ovlivnění paměti (Lukáš, 2006), urychluje regeneraci zraněných či poškozených tkání, zlepšuje průtok krve svalovou hmotou, zlepšuje transport živin do buněk a odvod metabolických zplodin (Kodíček, 2007), také se ale podílí na regulaci růstu folikulů, ovulace, spermatogeneze a implantaci embrya v děloze (Sengoku *et al.*, 2001).

Zdrojem produkcí NO je arginin, enzymem je NOS (NO-syntáza, existují 3 typy enzymu – nervová, endoteliální a indukovatelná) (Lamas *et al.*, 1992). Působení NO je lokální kvůli krátkému biologickému rozpadu (5 – 10 s). Snadno difunduje do okolí, kde vzniká a šíří se do sousedících buněk. V prostoru mimo buňku v reakci s vodou a kyslíkem se přeměňuje v dusičnany a dusitany. Působení oxidu dusnatého na buňku je velmi různorodé, závisí především na jeho koncentraci, redoxním stavu, množství iontů, thiolů apod. Za nízké koncentrace jsou signály přenášeny jako působení druhého posla při regulaci meiózy. Za vysoké koncentrace NO značně poškozuje oocyty svými deriváty. Přebytky NO mohou reagovat v buňce s dostupnými volnými radikály ($O_2^{\cdot-}$) a produkovat tak toxičtější radikály (peroxynitrity – ONOO-) (Bu *et al.*, 2003).

3.6.2 Biosyntéza NO

V buňkách savců se NO tvoří pětielektronovou oxidací L-argininu a molekulárního kyslíku (Moncada *et al.*, 1991). Kofaktory jsou: nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH), flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), tetrahydrobiopterin (H4B) a skupina hem obsahující železo (protoporfyrin IX) (Davis *et al.*, 2001). Oxidace probíhá postupně, z L-argininu (L-arg) se syntetizuje N-hydroxy-L-arginin (NHA), tento první krok potřebuje dva elektrony, které potřebuje pro NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát). Poté následuje oxidace z N-hydroxy-L-argininu, kde se syntetizuje L-citrulin a NO, zde jsou potřeba tři elektrony, které dodá molekula NADPH (Stuehr *et al.*, 1991).

3.6.3 Fyziologické působení NO

V hypotalamo-hypofyzární ose ovlivňuje oxid dusnatý syntézu hormonů. NO může tlumit sekreci oxytocinu, luteinizačního hormonu, kortikotropin releasing hormonů, adrenokortikotropního hormonu a růstového hormonu (Garthwaite a Boulton, 1995). V in vitro podmínkách ovlivňuje syntézu kortikotropin-releasing hormonu a releasing faktoru luteinizačního hormonu. Ovlivňuje též GnRH (gonadotropin-releasing hormonu) (Okere a Higuchi, 1996).

Oxid dusnatý má svoji roli i v dilataci krevních cév. Krevní cévy jsou vystlány endoteliálními buňkami, které uvolňují oxid dusnatý jako odpověď na stimulaci nervových zakončení (Alberts *et al.*, 1998). Má i funkci druhého posla v reakci vyvolané makrofágy. Aktivita NOS v makrofágách je za normálních podmínek nízká, ale po stimulaci lipopolysacharidy a γ -interferonem dojde k radikálnímu zvýšení syntézy oxidu dusnatého (Nathan a Hibbs, 1991). Působí i při vedení nervových vzruchů v tkáních nervů (Garthwaite, 1991). Má také svoji úlohu jako neurotransmitter v tkáních mozku, a to po přidání inhibitorů NOS (N-metyl-arginin/NMA nebo N^o-nitro-arginin/NNA) blokuje zvýšení aktivity NOS a hladinu cGMP. NO je zdrojem in vivo, kdy po vstupu do buňky se ze SNAP uvolňuje NO pomocí endogenních enzymů po vstupu do buňky (Bredt a Snyder 1992, Garthwaite 1991). Hraje také úlohu i ve střevech, kde jsou vyvolány elektrické stimulace nervových pletení a tím dochází k vyloučení látek, které ovlivňují peristaltiku (Dawson *et al.*, 1991), erekci penisu (Burnett *et al.*, 1992) a diferenciaci buněk (Hattori *et al.*, 1996).

3.6.4 NOS a izoformy

NO syntáza je enzym katalizující syntézu NO z L-argininu v tkáních savců. Je to homodimer, který vznikl ze spojení dvou enzymů, cytochrom reduktázy a cytochromu, ty vyžadují kofaktory a 3 kosubstráty (L-arginin, NADPH a O₂) (Nathan a Xie, 1995). Každý monomer obsahuje oxidační doménu na amino-konci a redukční doménu na karboxy-konci (Groves a Wang, 2000).

NOS se vyskytuje ve třech izoformách, které byly izolovány v roce 1991 až 1994. Poprvé byly objeveny v cévním endotelu, mozku a makrofázích (Dixit a Parvizi, 2001).

První je nervová NO-syntáza (známá jako nNOS, typ I, NOS-I a NOS-1), druhá je indukovatelná NO-syntáza (známá jako iNOS, typ II, NOS-II, NOS-2) a poslední je endoteliální NO-syntáza (známá jako eNOS, typ III, NOS-III, NOS-3) (Lamas *et al.*, 1992, Xie *et al.*, 1992). Izoformy se vyskytují v širokém spektru buněčných a tkáňových typů. Odlišují se subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace, funkcí, potřebou různých kofaktorů (Xie *et al.*, 1992), různou citlivostí k inhibitorům, regulací a katalytickými účinky (Alderton *et al.*, 2001).

Nervová NO-syntáza

Isoenzym, který byl jako první izolovaný z nervové tkáně (Bredt *et al.*, 1991). Ve vysoké koncentraci se vyskytuje v neuronech CNS, ale i v periferní nervové soustavě, kosterní svalovině, v samičích pohlavních orgánech, dřeni nadledvin, ledvinových nefronech, hypofýze a dalších tkáních (Weiner *et al.* 1994, Burnett *et al.* 1992, Dixit a Parvizi, 2001). Je to konstitutivní izoforma, která pro svou aktivitu potřebuje vápník a kalmodulin a produkuje pouze malé množství NO s krátkou dobou působnosti (Lamas *et al.* 1992, Nathan 1992).

Indukovatelná NO-syntáza

iNOS byla poprvé izolována z makrofágů. Je převážně ve formě rozpustné a regulace je na úrovni transkripce řadou cytokininů a hormonů (Xie *et al.*, 1992). Vyskytuje se např. v hepatocytech, v hladké svalovině, v buňkách respiračního epitelu, v buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, ve fibroblastech a neutrofilních granulocytů (Nathan a Xie 1995, Davis *et al.* 2001). Tato izoforma má pevně vázaný kalmodulin, který je spíše podjednotkou, tudíž není závislá na vápníku. V imunitních buňkách vyžaduje výrobu proteinů a tím syntetizuje velké množství NO s delším účinkem (Nathan 1992, Moncada *et al.* 1991).

Endoteliální NO-syntáza

Izolována z endotelových buněk cév (Alderton *et al.*, 2001). Přítomna například také v hippocampu, neuronech, krevních destičkách, nadledvinách, ledvinách, plicích, v buňkách ostrůvků pankreasu, v placentě a děloze (Jablonka-Shariff a Olson., 1997). Také byla nalezena v Leydigových, Sertoliho, endoteliálních buňkách, ve spermatidách (Ambrosino *et al.*, 2003), v granulózniích buňkách, buňkách *theca*, stroma a na povrchu oocyty ve vyvíjejícím se folikulu (Jablonka-Shariff a Olson., 1997). Podobně jako nNOS se jedná o konstitutivní typ a tudíž je závislá na vápníku a kalmodulinu (Lamas *et al.* 1992, Nathan 1992).

Inducibilní izoformy vytváří jako odpověď na stimul velké množství NO s dlouhodobou produkcí (Olson *et al.* 1999, Lamas *et al.* 1992, Moncada *et al.* 1991). Nepotřebují vápník ani kalmodulin, ty jsou pevně vázány v izoformě jako podjednotka (Lowenstein *et al.*, 1992).

Každý monomer obsahuje oxidační doménu na amino-konci a redukční doménu na karboxy-konci (Groves a Wang, 2000). Oxidační doména (N-doména) váže pevně tetrahydrobiopterin a thiolátově vázanou hem skupinu (reakční centrum pro oxidační reakce), kyslík a L-arginin. Redukční doména (C-doména) obsahuje vazebná místa pro redukční kofaktory NADPH, FMN, FAD. Obě tyto domény spojuje kalmodulin (McMillan *et al.*, 1992). NOS je katalyticky aktivní pouze ve formě dimeru. Na udržení dimeru se zúčastňuje BH₄ (tetrahydrobiopterin) a hemová skupina (Marletta, 2001). Na NOS se připojuje hemová skupina prostřednictvím cysteinu a thiolové skupiny (Groves a Wang, 2000).

Regulace aktivity NOS není dostatečně prostudována, ale je známo, že na jeho regulaci se podílí celá řada faktorů. iNOS a nNOS mohou být mimo jiné regulovány alternativním sestřihem jejich mRNA. Na regulaci se mohou podílet i další faktory a to třeba protein kinázy. Ke snížení produkce NO v mozkových buňkách způsobuje fosforylace nNOS CaM-dependentní kinázou (Hayashi *et al.*, 1999). Místo pro cAMP-dependentní fosforylaci mají všechny izoformy stejné. Protein kináza C výrazně snižuje aktivitu izoformem (Bredt a Snyder, 1992).

Huo *et al.* (2004) uvádějí, že do regulace NOS jsou zapojeny tři hlavní mechanismy. Dráha zahrnující proteázu kalpain, systém ubikvitin-proteazóm a regulace Hsp90 chaperony. Na enzym určený k degradaci se kovalentně váže proteáza kalpain a ubikvitin a rozpoznávání je proteazónem (jen u eNOS a iNOS). nNOS izoformu degradují Hsp90 chaperony.

3.6.4.1 Výskyt izoform NOS v reprodukční soustavě samic a oocytech

Ve vaječnicku superovulovaných potkanů a myší byly prokázány iNOS a eNOS ne však nNOS (Jablonka-Shariff a Olson 1997, 1999). V krevních cévách vaječnicku, v buňkách *theca*, granulózních buňkách a na povrchu oocytů ve folikulech byla objevena eNOS. V *theca folliculi* antrálních folikulů a v buňkách žlutého tělíska byla objevena iNOS. Obě izoformy byly pak nalezeny v ovoplazmě oocytů a v *theca folliculi*. U velkých folikulů obklopených kumulárními buňkami byla objevena přítomnost iNOS, která byla přítomna i cytoplazmě granulózních luteinizovaných buněk žlutého tělíska (Tao *et al.*, 2004).

Hattori (2000) a jeho tým se ve své práci zaměřili na sledování exprese NOS v prasečích oocytech, prokázali že u folikulů 1 – 3 mm je exprese eNOS, ale v kumulárních buňkách ji neprokázali. Také sledovali vliv FSH na projev eNOS v souborech oocytů a kumulárních buněk. Pomocí měření metabolitu NO se jim podařilo zjistit, že FSH vyvolává v souboru pokles produkce NO. Takesue (2003) se svým týmem vysledovali expresi eNOS v průběhu vývoje prasečích folikulů, zkoumali folikuly o velikosti ≤ 2 mm a ≥ 7 mm tedy časné a pozdní antrální stádium. Podařilo se jim prokázat eNOS v obou typech oocytů. Folikuly v časném stádiu (≤ 2 mm) obsahovaly eNOS na periférii oocyty, vrchní vrstvě granulózních a kumulárních buněk. Na zoně pellucida a lipidových granulech eNOS obsažena nebyla. Folikuly v pozdním stádiu (≥ 7 mm) obsahovaly eNOS ve větších koncentracích. Grasselli *et al.* (2001) se zaměřili na sledování folikulů o velikosti < 3 mm. Zjistili přítomnost eNOS pouze v granulózních buňkách a to u 48 hod kultivovaných oocytů v in vitro podmínkách.

3.6.5 Regulace NOS

Regulace NOS aktivity, která je potřebná pro oxid dusnatý je velmi složitá. Transkripční regulací jsou regulovány izoformy NOS z tkání a buněk. Regulace všech tří izoform probíhá interakcemi mezi proteiny.

iNOS regulace: vápník a kalmodulin (CaM), kalirin

eNOS regulace: vápník, kalmodulin (CaM), proteiny kalveolinu 1 a 3, Hsp90 (Heat-shock proteinem 90)

nNOS regulace: vápník, kalmodulin (CaM), PIN (proteinový inhibitor NOS), calveolin-1, Hsp90 (Heat-shock proteinem 90)

Kalirin brání vzniku dimeru. U všech tří izoform má kalmodulin funkci enzymatické aktivity. Navázáním kalmodulinu se zrychluje elektronový transfer (z NADPH do redukční domény a poté do hemového centra). Caveolin tlumí syntézu NOS, oproti tomu Hsp 90 (Heat-shock proteinem 90) zvyšuje aktivitu NOS. Regulace u eNOS a nNOS probíhá přes kovalentní modifikace, jen fosforylací je regulováno nNOS. Myristoylací, palmitoylací a fosforylací je regulováno eNOS (Alderton *et al.*, 2001).

3.6.6 Inhibitory NOS

Inhibitory interagují s NOS jakkoli a kdekoli, vždy však v závislosti na mechanismu inhibice, substrátu a čase. Jsou buď kompetitivní a akometitivní.

Kompetitivní inhibitory NOS jsou modifikované analogy L-argininu, kdy nahrazují jeho substrát a váže se na vazebné místo argininu (Rees *et al.* 1989, Rees *et al.* 1990). Patří sem L-NAME (N^o-nitro-L-arginin methyl ester) jako nejčastěji používaný inhibitor, ale také L-NMMA (NG-monomethyl-L-arginin) a L-NA (N^o-nitro-L-arginin). Deriváty obsahují alkoholové, karboxylové nebo aminové skupiny, mohou působit na řadu intracelulárních systémů, které obsahují železo, jejich výhodou je že obsahují neúčinný D-konformer. Slouží jako negativní kontrola pro působení vlastních inhibitorů (Peterson *et al.*, 1992). L-NAME, L-NNA mají vliv na oocyty při meiotickém dělení a to takový, že zpožďují část vajíček ve stádiu první meiotické metafáze a dosažení druhé meiotické metafáze je výrazně nižší (Voznesenskaya a Blashkiv, 2006).

Akompetitivní inhibitory NOS. Sem patří specifický inhibitor AG (aminoguanidin) a acetamidové inhibitory L-NIO, L-NIL, GW273629. Tyto inhibitory vyžadují jako substrát NADPH a aktivní enzym. Aminoguanidin, po vzniku komplexu NOS a inhibitor, změni své chemické vlastnosti a dojde ke kovalentní změně enzymu (Bryk a Wolf 1998, Corbett *et al.* 1992). Aminoguanidin potřebuje pro inaktivaci NOS vápník, kalmodulin, NADPH, tetrahydrobiopterin a kyslík. Kvůli této vlastnosti je používán jako inaktivátor základního mechanismu NOS s upřednostňováním k iNOS (Wolff a Lubeskie, 1995). S použitím NO donoru lze účinek aminoguanidinu zvrátit (Yamauchi *et al.*, 1997).

Inhibitory NOS mají nepříznivý vliv na embryonální vývoj především pak na pozdější stádia, potlačují formaci prvního pólového tělíska a inhibují růst blastocysty (Sengoku *et al.*, 2001).

3.6.7 Vliv NO na reprodukční orgány samic

NO má vliv na řízení reprodukce a to na uvolňování gonadotropinů, růst folikulů, apoptotický zánik folikulárních buněk, ovulaci, implantaci embrya v děloze, vznik steroidních hormonů, vznik žlutého tělíska, meiotické zrání oocytů, aktivaci oocytů (Jablonka-Shariff *et al.* 1999, Gregg 2003, Biswas *et al.* 1998) a ovlivňuje ochotu k páření a fetální vývoj (Gregg, 2003). Má i svou roli v aktivaci guanylát cyklázy, která vede ke zvýšení cGMP, má i důležitou roli v preovulační vlně (Shukovski a Tsafiriri 1994, Olson *et al.* 1996, Moncada *et al.* 1991, Nathan 1992). Byla také prokázána závislost oxidu dusnatého na aktivaci prasečích oocytů. Není primárním podnětem k aktivaci oocytů, neboť hladina oxidu dusnatého se zvyšuje až následně po zvýšení hladiny intracelulárních iontů volného vápníku (Petr *et al.*, 2005). Oxid dusnatý může být klíčovým faktorem při signálních kaskádách, které kontrolují přechod mezi metafázemi prvního a druhého meiotického dělení, stejně jako při přerušování meiózy (Jablonka-Shariff a Olson, 1998). Aktivaci prasečích oocytů je schopná stimulovat NO-dependentní signální kaskáda (Petr *et al.*, 2005). U myši je oxid dusnatý schopen blokace i stimulace zrání oocytů. Negativní vliv má oxid dusnatý při vysoké koncentraci, neboť inhibuje vývoj embrya v in vitro podmínkách a implantaci v in vivo u myši (Sengoku *et al.*, 2001). Pro zrání oocytů působením NO jsou potřeba cGMP a cAMP kaskády, které závisí na určitých podmínkách (Bu *et al.*, 2003).

NO je také významný regulátor sekrece GnRH. Neuronů produkujících NO jsou těsně vedle neuronů produkujících GnRH (gonadotropin-releasing hormon) v hypotalamu, kde dochází ke stimulaci sekrece GnRH a aktivaci guanylát cyklázy (Dixit a Parvizi, 2001). Rettori *et al.* (1993) ve své práci uvedl, že v podmínkách in vitro lze po přidání NO donoru (nitroprusid sodný – SNP) navodit uvolňování GnRH z hypotalamu potkana a tudíž v nervových buňkách inhibitor cGMP-dependentní kinázy blokuje GnRH. U hemoglobinu, který může vyvázat NO, zjistili, že je schopen potlačit uvolňování GnRH z buněk hypotalamu. Podle Pinilla *et al.* (1998) nejspíš dochází v hypofýze prostřednictvím NO ke stimulaci sekrece GnRH pomocí specifického kalcium-dependentního a cGMP independentního mechanismu. Jablonka-Shariff a Olson (1997) zjišťovali přítomnost eNOS a iNOS ve vaječniku potkana. Pomocí vyblokování (genového knockoutu) dvou izoform NOS (iNOS a eNOS) zjistili, že se tyto formy vyskytují ve vaječniku potkana v aktivní formě a produkují oxid dusnatý. V průběhu celého pohlavního cyklu se mění koncentrace a aktivita těchto izoform. V proestru, tedy v počátcích pohlavního cyklu roste množství mRNA pro iNOS, v pozdějším proestru se zvyšuje koncentrace iNOS v závislosti na zvyšující se hladině LH a

estradiolu. Později exprese iNOS proteinů klesá (Srivastava *et al.*, 1997). V předovulační fázi byla nalezena eNOS ve vaječniku (Zackrisson *et al.*, 1996). K vyvolání exprese eNOS v buňkách *theca folliculi* a granulózních buňkách potkana působí gonadotropin, tuto expresi však v oocytech nezvyšuje, protože exprese eNOS není závislá na gonadotropínu (Hattori *et al.*, 2001). Inhibiční účinek může mít oxid dusnatý produkovaný iNOS, na funkci granulózních a kumulárních buněk, na receptory hormonů, růstových faktorů (Olson *et al.*, 1996).

Oxid dusnatý má i svojí roli v procesu ovulace (Jablonka-Shariff a Olson, 1998). Systém NO/NOS ovlivňuje ve vaječniku dilataci cév, zvýšení produkce prostaglandinů při procesu ovulace (Dixit a Parvizi, 2001). Oxid dusnatý kontroluje ovulaci přes působení prostaglandinů. NO působí na produkci prostaglandinů přímou aktivací cyklooxygenáz (Faletti *et al.*, 1999). Délka estrálního cyklu je také nejspíš regulována NO. Jablonka – Shariff a Olson (1998) na toto téma vypracovali práci s použitím knockoutovaných samic myší. Zjistili, že po knockoutaci genu pro eNOS se zkrátila délka cyklu. Zatímco po knockoutace genu pro iNOS délku estrálního cyklu neovlivňuje. Regrese žlutého tělíska podle Dixit a Parvizi (2001) je zapříčiněná pozitivní zpětnou vazbou mezi oxidem dusnatým a prostaglandinem F_{2α}.

3.6.8 Úloha NO na regulaci meiotického zrání

Výsledky poukazují na zastavení meiózy a její znovuzahájení ve způsobech změny množství cyklických nukleotidů (cAMP) v oocytech (Törnell *et al.*, 1991). Snížení hladiny cAMP může dojít pomocí enzymu fosfodiesterázy. NO aktivuje guanylát cyklázu a ten štěpí GTP na cGMP (Schmidt *et al.*, 1993). Zvyšováním koncentrace cGMP dochází k růstu volných vápníkových iontů v cytoplazmě (Whalley *et al.*, 1992). Tím se otevřou intracelulární zásobárny vápníkových iontů a dochází k reakci s kalmodulinem a vytváří se komplex vápník-kalmodulin (Ca/CaM). Mění se vazba molekuly vápník-kalmodulin, která se stává aktivní a podporuje interakci s vápennými ionty a dependentní kinázou (Lorca *et al.*, 1993). Ca²⁺-dependentní kináza zabraňuje působení MPF a tím umožní další vývoj oocytů. Komplex Ca/CaM (vápník-kalmodulin) podporuje NOS izoformy a tak dochází k produkci oxidu dusnatého v oocytu (Masui, 1991).

Regulace meiózy probíhá za nízké koncentrace oxidu dusnatého přes extracelulární signály do buněk. Za vysoké koncentrace svými deriváty však značně poškozuje oocyt. Přebytky oxidu dusnatého buňka reguluje pomocí volných radikálů, tím se ale produkuje více

toxických radikálů jako jsou peroxynitrity (ONOO-) (Espey *et al.*, 2000). Degeneraci oocytů s kumulárními buňkami i bez nich může způsobit L-arginin. Kultivační medium bez L-argininu snižuje životaschopnost folikulů a růst (Bu *et al.*, 2003). Pomocí regulace syntázy cyklických nukleotidů se NO podílí na zrání oocytů, NO reguluje syntázu cGMP v kumulárních buňkách. Přechod z metafáze prvního meiotického dělení do metafáze druhého meiotického dělení tedy umožňuje, že cGMP snižuje množství cAMP aktivací cAMP-fosfodiesterázy (Jablonka-Shariff a Olson, 2000). Opak tvrdí Törnell *et al.* (1991), ten uvádí NO jako regulátora meiózy prostřednictvím cGMP, jenž má za úkol udržet meiotický blok preovulačních folikulů a to 2 způsoby:

- udržováním koncentrace cAMP inhibicí cAMP- fosfodiesterázy
- aktivací cGMP-dependentní protein kinázy (PKG)

PKG se účastní kaskády podílející se na uvolňování volných vápníkových iontů intracelulárních zásob. Regulace oxidem dusnatým v oocytu může probíhat nezávisle na cGMP. Aktivace molekul pomocí oxidu dusnatého probíhá nitrosilací. Oxid dusnatý je velmi důležitá signální molekula pro oocyt i pro komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami (Lander *et al.*, 1995).

NO má velmi důležitou roli v ovulaci a meiotickém zrání oocytů, jak v *in vitro* tak *in vivo*. Rozdílný projev eNOS a iNOS v buňkách folikulu značí různé funkce eNOS-NO a iNOS-NO. eNOS-NO má důležitou roli při ovulaci, iNOS zastavuje růst folikulů až ke stimulaci gonadotropinů, který tuto inhibici ruší (Olson *et al.* 2000, Van Voohris *et al.* 1995). Z práce Jablonka-Shariff a Olson (2000) vyplývá, že NO je nezbytný pro organizaci mikrotubulů a vznik dělicího vřeténka. Bylo zjištěno, že myši s knockoutovaným genem pro izoformu NOS (eNOS-KO) nemohly syntetizovat NO, což vedlo k narušení zrání oocytů, protože měli výskyt oocytů s neobvykle velkým pólovým tělískem, což může vést k abnormálnímu buněčnému dělení. Vyskytovaly se i oocyty s dvěma pólovými tělísky, které mohly vzniknout dělením nebo předčasným vyloučením. S tímto narušeným zráním měly v *in vitro* i v *in vivo* snížený počet oocytů v druhé meiotické metafázi a zvýšený počet oocytů v první meiotické metafázi nebo atypické oocyty. Práce, které využívají eNOS-KO myši má jistou nevýhodu v knockoutu, ten narušuje meiózu již při růstu oocytů nebo folikulů ve vaječniku. Tudíž Jablonka-Shariff a Olson (2000) vydali výsledky pokusů s inhibitory u myši a ty vedly k vlivům inhibice NOS na meiotické zrání. Z jejich výsledků vyplynulo, že NO ovlivňuje meiotické zrání nezávisle na vývoji v ováriích. Všechny skupiny, jak kontrolní tak s inhibitory NOS (L-NAME) nakonec došly do stádia GVBD, ale potřebovaly mnohem delší

čas k znovuzahájení meiózy. To však může ovlivnit jak kvalitu tak životaschopnost oocytů v dalších fázích zrání. Naproti tomu Sengoku *et al.* (2001) zjistil, že po přidání inhibitorů NOS, potlačí vývoj zrání oocytů s kumulárními buňkami, ale nezaznamenal degradované oocyty. Myši s eNOS-KO měly narušený vývoj vaječníku, měly nižší hmotnost, méně kumulus-oocytových komplexů, vyšší hladinu estradiolu, progesteronu v plazmě, abnormality v produkci steroidních hormonů a prodloužený estrální cyklus s porovnáním kontrolní skupiny. V dospělosti potom měli vaječníky s méně ovulačními folikuly v proestru a nižší počet ovulovaných oocytů. Práce Jablonka-Shariff a Olson (1998, 2000) tvrdí, že právě iNOS-NO může být regulátor meiotického zrání oocytů v průběhu ovulace. iNOS inhibitor, aminoguanidin, a hCG navozují meiotické zrání oocytu oproti tomu NO donor, SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamin), zrání brání. Po aplikaci hCG značně poklesla koncentrace nitritů a nitrátů v preovulačních folikulech, tyto změny vedou ke změnám iNOS a to hraje důležitou roli v poklesu koncentrace NO ve folikulech. Tento pokles je důležitý pro zrání oocytů. iNOS-NO vede k inhibici meiotického zrání oocytů bez kumulárních buněk tak, že udržuje koncentraci cGMP na vysoké úrovni (Nakamura *et al.*, 2002). Huo *et al.* (2005) naopak zjistili, že ošetření oocytů myši AG (aminoguanidin) vede k zastavení meiotického zrání ve fázi anafáze I. – telofáze I. iNOS-NO je tedy nezbytný pro meiotické zrání myších oocytů právě pro GVBD a přechod z meiotických fází (anafáze I. – telofáze I.). To vede k závěrům, že GVBD, vydělení I.pólového tělíska a fosforylace MAPK byly utlumeny AG i iNOS. V zárodečném váčku po GVBD byla přítomna iNOS-NO v okolí kondenzovaných chromozómů a v první i druhé meiotické metafázi byla přítomna v místě dělicího vřeténka okolo napojených chromozómů. V první i druhé meiotické fázi anafáze nebyla iNOS přítomna, naopak tomu v meiotické fázi telofáze I. i II. byla objevena v místě rozcházejících se chromozómů či chromatid, což vede k myšlence, že iNOS-NO může pomáhat při vyštěpení pólového tělíska (Huo *et al.*, 2005). Podle Bu *et al.* (2003), kteří uvedli, že oxid dusnatý v závislosti na své koncentraci může mít dvojí funkci na meiotické zrání, a to stimulační nebo inhibiční. Při použití inhibitorů NOS (L-NAME, L-NNA) inhibovaly vznik I.pólového tělíska, ale vliv na GVBD nebyl prokázán. Za to účinek AG (aminoguanidin) neměl žádný vliv na zrání oocytů. Z toho plyne, že eNOS-NO je produkcí kumulárních buněk a je zde jejich aktivní místo, toto potvrdil i Jablonka-Shariff a Olson (2000). Nízká hladina koncentrace NO donoru vedla ke stimulaci zrání oocytů s kumulárními buňkami, bez nich ke stimulaci nedošlo (Sengoku *et al.*, 2001, Bu *et al.* 2003). Naproti tomu vysoká hladina koncentrace NO donoru inhibovala vyštěpení I.pólového tělíska a to vedlo k příčině velkého množství atypických či mrtvých oocytů nezávisle na kumulárních buňkách. Závislost NO donoru na cGMP při zrání

oocytů není kompletní a tak jsou jiné cesty jak může oxid dusnatý působit. K podobným výsledkům došli i Tao *et al.* (2005), kdy po přidání NO donoru se zvyšoval počet oocytů s kumulárními buňkami, které zůstaly ve fázi GV. Vysoké koncentrace NO donoru vedou k degradaci oocytů a k úhynu nezávisle na kumulárních buňkách. Citlivější jsou ty oocyty, které jsou bez kumulárních buněk. Naproti tomu nízká koncentrace NO donoru vede k potlačení expanzi kumulu a fragmentaci DNA kumulárních buněk. U prasečích oocytů je velká produkce eNOS-NO. Pokles NO je důležitý pro růst kumulárních buněk, jinak dochází k jejich inhibici. K poklesu dochází na základě působení FSH, který stimuluje proliferaci kumulárních buněk, ale eNOS se v oocytech nemění. Tento pokles NO může být signálem pro diferenciaci kumulárních a granulózních buněk (Hattori *et al.*, 2000).

3.6.9 NO a aktivace prasečích oocytů

V meiotické fázi metafáze II. dozrálá vajíčka zastavují svůj vývoj, a pro další vývoj potřebují aktivační stimul, kterým je spermie (Yanagimachi, 1988). Ta vyvolá ve vajíčku oscilaci intracelulárních hladin Ca, a tak se aktivace oocytů označuje jako kalcium-dependentní proces (Homa *et al.* 1993, Swann a Ozil 1994). Proto se při aktivaci oocytů *in vitro* používá právě této signální soustavy (kalcium-dependentní). Používá se elektrický impuls ke zvýšení intracelulární hladiny vápníku (Procházka *et al.* 1992, 1993) ionofory (Jílek *et al.* 2000, 2001), alkohol (Yi a Park, 2005).

NO-dependentní signální soustava je ovlivněna Ca a celou řadou mechanismů. Aktiva NO v buňkách vyžaduje aktivaci NOS kalmodulinem (Lamas *et al.*, 1992). Oxid dusnatý ovlivňuje hladinu intracelulárního Ca příjmem Ca z extracelulárního prostředí pomocí vápníkových iontových pump a kanálů (Berridge *et al.*, 2000).

Partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů zkoumal Petr *et al.* (2005) pomocí NO donoru. Zjistili, že vzniklá embrya se málo dělí a za stádia 8 blastomer se přestanou vyvíjet. Použili donory SNP a SNAP, které *in vitro* aktivovaly dozrálé prasečí oocyty v závislosti na své koncentraci. Při donoru SNP bylo aktivováno malé množství oocytů a při koncentraci větší jak 1 mM dokonce ničil oocyty. Při donoru SNAP se ukázalo, že je pro aktivaci oocytů vhodnější přes NO-dependentní signální kaskády. K aktivaci oocytů došlo po 10 hod. Tento pomalý projev NO je nejspíš ovlivněn penetrací NO-donoru do oocytu, nebo také dlouhodobé působení NO-donoru, které vede k znemožnění signalizace v buňce. Pro NO-dependentní aktivaci oocytů prasat je potřeba aktivní NOS. Inhibitor NOS L-NMMA a L-NAME mohou inhibovat aktivaci oocytů pomocí NO-donoru SNAP. Oxid dusnatý nepůsobí jako prvotní

impuls k aktivaci oocytů, není totiž schopný navodit exocytózu kortikálních granul. Dokáže ovlivnit počet volných vápníkových iontů v oplozeném oocytu a to díky regulaci vápníkových pump a kanálů sloužících k příjmu a výdaji Ca buňkou (Petr *et al.* 2005, Berridge *et al.* 2000). K tomuto se přidává i Hyslop *et al.* (2001), kteří zjistili, že ke zvýšení NO nedochází při oplození oocytů myší spermii, které spouští oscilaci vápenných iontů. Došli k závěru, že oxid dusnatý není nezbytný pro oplození a nevyvolává oscilaci vápenných iontů. Při aktivaci oocytů prasete NO-donorem SNAP je závislost vápníku patrná. K inhibici po chelaci intracelulárních vápníkových iontů chelátorem BAPTA-AM dochází při partenogenetické aktivaci oocytů donorem SNAP. Ke snížení počtu aktivovaných oocytů dochází při zablokování vápníkových kanálů verapamilem a to vede k tomu, že aktivace NO-donorem je závislá na vápenných iontech z extracelulárního prostředí. L-typ kanál blokuje verapamil a tento typ kanálu je důležitý při aktivaci oocytů NO-donory. Aktivace oocytů prasat pomocí NO-donorů z části probíhá pomocí aktivace sGC (solubilní guanylát cykláza). Oxid dusnatý není potřebný pro aktivaci oocytů pomocí ionoforu. V oocytu je propojení mezi Ca a NO dependentními signálními kaskádami (Petr *et al.*, 2005). Svojí roli má i signální kaskáda cGMP-dependentní, která je specifická pro partenogenetickou aktivaci oocytů NO-donory. Partenogenetickou aktivaci oocytů NO-donory inhibuje zablokování ryanodinových receptorů. Z toho plyne závislost NO-dependentní aktivace prasečích oocytů na mobilizaci intracelulárních vápníkových zásob pomocí ryanodinových receptorů (RyR). Na inositoltrifosfátových receptorech (IP₃R) nezávisí. IP₃R jsou důležité pro správnou aktivaci savčích oocytů (Petr *et al.*, 2005).

Dosud nejsou objasněny procesy, ke kterým dochází v oocytech během růstové periody, kterou oocyty musí projít a během níž získávají schopnost dokončit meiotické zrání. Významnou úlohu v nich může sehrávat signální molekula oxidu dusnatého produkovaná NO-syntázou. Je vysoce pravděpodobné, že syntéza NO je zapojena kromě mitotického zrání také do růstové fáze oocytu. Naše práce si kladla za cíl ověřit hypotézu, podle které se enzym NOS produkcí oxidu dusnatého aktivně zapojuje do regulace růstové fáze s získáním meiotické kompetence.

4.Materiál a metody

4.1 Získávání vaječníků a oocytů

Prasečí vaječníky byly získávány z poražených prasnic na jatkách z Příbrami v neurčité fázi pohlavního cyklu. Vaječníky byly transportovány do laboratoře katedry veterinárních disciplín ve vytemperovaných termoskách, které byly naplněny fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39°C. Vaječníky byly zpracovány do 2hodin. Aspirací z folikulů pomocí injekční jehly, byla získána folikulární tekutina. Poté pod stereomikroskopem byly vybírány skleněnou pipetou oocyty, které se přemísťovaly do kapek media. Vybírány byly jen takové oocyty, které měly nenarušenou cytoplasmu s kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

4.1.1 Zisk rostoucích oocytů

Rostoucí oocyty byly získávány z kůry vaječniku v podobě tenkých pruhů z folikulů menších jak 2 mm. Tyto pruhy byly umístěny do Petriho misek 3,5 cm s modifikovaným kultivačním médiem M199 (Girco BRL, Life, Technologies, Paisley, Skotsko) obsahující 7 % roztok hydrogenuhličitanu sodného (0,039 ml), laktát vápenatý v koncentraci 0,6 mg/l, pyruvát sodný 0,25 mg/ml, gentamicin-sulfát (gentamicin sulphate) 0,025 mg/ml, HEPES 1,5 mg/ml, 13,5 IU eCG : 6,6 IU hCG/ml (P.G. 600, Intervet Boxmeer, Holandsko) a 10% fetální telecí sérum (GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, Německo). Uvolnění oocytu se provádělo jehlou 25G přes stěnu folikulu. Vybrané oocyty byly pomocí mikroskopu s okulárovým mikrometrem vybírány podle velikosti vnitřního průměru, to je bez vrstvy *zona pellucida*: 80-89 μm, 90-99 μm a 100-110 μm.

4.1.2 Zisk oocytů s ukončeným růstem

Byly získány aspirací velkých folikulů (2-5 mm) za pomoci jehly 20G.

Pro další experimenty byly použity oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a celistvou vrstvou granulózniích nebo kumulárních buněk. Před zahájením kultivace byly vybrané oocyty třikrát propláchnuty v kultivačním mediu M199. Kultivace probíhala za teploty 39 °C a v 5 % CO₂ v Petriho miskách. Misky byly naplněny 3 ml média M199.

Z vaječnicků prasnic byly získány čtyři velikostní skupiny oocytů s různou meiotickou kompetencí. Do modifikovaného kultivačního média byl přidán buď některý z inhibitorů nebo donorů NOS, nebo byly oocyty kultivovány v čistém mediu jako kontrola. Po uplynutí doby kultivace bylo hodnoceno stádium jejich zrání a vliv NO donorů a inhibitorů NOS na meiotickou kompetenci oocytů.

Pro hodnocení meiotické kompetence zrání oocytů po kultivaci byly oocyty zbaveny od okolních buněk a to opakovaným nasáváním do tenké skleněné pipetky. Pak byly umístěny na podložní sklíčka a fixovány octovou kyselinou a lihem (1 : 3) po dobu 24hodin. Poté se nabarvily 1 % orceinem. Stádium meiotického zrání oocytů bylo vyhodnoceno podle publikace Motlíka a Fulky (1986). Hodnocení probíhalo za pomoci mikroskopu s fázovým kontrastem. Hodnoceny byly oocyty s viditelným vyděleným pólovým tělískem a ve stádiu pronukleárním.

4.2 Experimentální schéma

4.2.1 Ověření meiotické kompetence

Cílem bylo ověřit meiotickou kompetenci v podmínkách laboratoře katedry veterinárních disciplín.

Rostoucí oocyty byly rozděleny do tří skupin podle vnitřního průměru a to na oocyty s průměrem od 80 do 89 μm, od 90 do 99 μm a od 100 do 110 μm. Poslední skupina oocytů byla s ukončeným růstem o velikosti 120 μm.

Po kultivaci, která trvala 48 hodin, v mediu M119 byly oocyty zbaveny okolních buněk, byly fixovány a bylo zhodnoceno stádium meiotického zrání.

4.2.2 Ověření účinku inhibitorů NOS

Tímto experimentem jsme chtěli ověřit účinek inhibitorů NOS na růstovou periodu a meiotickou kompetenci oocytů prasete, po aplikaci inhibitorů NOS a tím zapříčiním nedostatek oxidu dusnatého.

Kultivace rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí (100 – 110 μm) a oocytů s ukončeným růstem (120 μm) probíhala 48 hodin v mediu M119 s přidavkem iNOS specifického inhibitoru aminoguanidinu (AG) nebo s nespecifickým NOS inhibitorem L-NAME (N^{O} -nitro-L-arginin methyl ester), který tlumí NOS izoformy, nejvíce specifický je k eNOS. Tyto inhibitory byly používány s koncentrací 10 mM, 7,5 mM; 5mM a 2,5 mM. Pro kontrolu toxicity byl použit D – neúčinný konformer (N^{O} -nitro-D-arginine methyl ester) z L-NAME. Aminoguanin nemá D – neúčinný konformer, a proto byla provedena reverze pro vyloučení toxického působení inhibitorů. Kultivace probíhala 48 hodin s nejvyšší koncentrací inhibitoru a pak 24 hodin v čistém mediu.

Dále bylo sledováno, zda nedostatek oxidu dusnatého způsobený NOS inhibitorem, ovlivňuje přechod mezi první a druhou meiotickou M-fází u oocytů s ukončeným růstem. Kultivace oocytů s ukončenou růstovou periodou (120 μm) probíhala 24 hodin v čistém mediu M199 a pak dalších 24 hodin v mediu, který obsahoval přidavek 10 mM aminoguanidinu. Pro vyloučení vlivu mechanického poškození byla kultivace kontrolního vzorku po 24 hodinách v čistém mediu přenesena do nové Petriho misky s čistým mediem.

Po skončení kultivace byly z oocytů odstraněny okolní buňky, byly fixovány a bylo vyhodnoceno stádium meiotického zrání.

Inhibitor byl rozpuštěn v mediu 30 minut před samotnou kultivací oocytů.

4.2.3 Ověření účinku NO donoru

Cílem třetího experimentu bylo ověřit, jak ovlivňuje NO dodaný do kultivace externě, ve formě donoru, na meiotickou kompetenci a růst oocytů.

Kultivace rostoucích oocytů (80 – 89 μm , 90 – 99 μm , 100 – 110 μm) a oocytů s ukončeným růstem (120 μm), probíhala 48 hodin v mediu M199 s donorem NO SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) v koncentraci 2, 0,1 a 0,03 mM.

Třicet minut před začátkem kultivace se nechal rozpustit donor NO.

Po dokončení kultivace byly z oocytů odstraněny okolní buňky, byly fixovány a bylo vyhodnoceno stádium meiotického zrání.

4.2.4 Kombinovaný účinek inhibitorů NOS a donorů NO na oocyty

V tomto experimentu bylo cílem ověřit zda lze nedostatek NO způsobený inhibitory NOS zvrátit dodáním NO donoru do kultivace.

Kultivace rostoucích oocytů (80 – 89 μm , 90 – 99 μm , 100 – 110 μm) a oocytů s ukončeným růstem (120 μm) probíhala 48 hodin v mediu M199 s přidavkem nejnižší účinné dávky aminoguanidinu (5 mM) spolu s různou koncentrací NO donoru SNAP (2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,03 mM a 0,1 mM). Takto zvoleno pro hledání účinné koncentrace donoru pro zvrácení účinku inhibitoru.

Třicet minut před začátkem kultivace se nechaly rozpustit inhibitor i donor.

Po dokončení kultivace byly z oocytů odstraněny okolní buňky, byly fixovány a yblo vyhodnoceno stádium meiotického zrání.

4.2.5 Statistická analýza

Každá pokusná skupina obsahovala 120 oocytů. Experimenty byly čtyřikrát opakovány. Získaná data byla vyhodnocena pomocí analýzy rozptylu za využití programu Statistica verze 6.0.

Pomocí Tukeyho HSD testu se stanovily podrobnější rozdíly mezi skupinami oocytů. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $P < 0,05$.

5. Výsledky

5.1 Ověření meiotické kompetence oocytů v našich laboratorních podmínkách

Cílem bylo ověřit meiotickou kompetenci v podmínkách laboratoře katedry veterinárních disciplín (KVD).

Naše výsledky ukázaly (podrobněji viz tabulka 1), že oocyty zařazené do skupiny s vnitřním průměrem 80 – 89 μm a 90 – 99 μm jsou zcela meioticky nekompetentní. Zatímco skupina 100 – 110 μm obsahovala oocyty s částečnou meiotickou kompetencí. Skupina s oocyty s průměrem 120 μm byly zcela meioticky kompetentní a po 48 hodinách kultivace dosahují stádia druhé meiotické metafáze.

Tento experiment potvrdil schopnost oocytů získávat kompetenci kontinuálně během růstové periody a je tedy patrný vztah mezi meiotickou kompetencí a velikostí oocytu.

Tabulka 1: Ověření meiotické kompetence

Velikost oocytů	Stádium meiotického zrání (%)		
	GV	MI	MII
80 - 89 μm	97,8 \pm 2,2 ^A	1,5 \pm 1,0 ^A	0,7 \pm 0,7 ^A
90 - 99 μm	88,5 \pm 6,0 ^A	9,9 \pm 4,7 ^A	1,6 \pm 1,2 ^A
100 - 110 μm	12,8 \pm 5,4 ^B	87,2 \pm 5,4 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
120 μm	6,2 \pm 6,1 ^B	6,9 \pm 4,8 ^A	86,9 \pm 5,7 ^B

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

5.2 Ověření účinku inhibitorů NOS

V tomto experimentu se zjišťovalo jak působí nedostatek NO vyvolaný pomocí inhibitorů NOS (aminoguanin, L-NAME) na oocyty s částečnou a plnou meiotickou kompetencí.

Inhibitory s koncentrací 10, 7,5 a 5 mM narušovaly meiotické zrání rostoucích oocytů (100 – 110 μm) i s ukončeným růstem (120 μm). Po 48 hod kultivace velká část oocytů zůstala ve fázi zárodečného vajíčku. Na meiotické zrání obou typů oocytů (s částečnou i plně vyvinutou meiotickou kompetencí) neměla vliv koncentrace 2,5 mM, ale částečně kompetentní oocyty dosahovaly první meiotické metafáze a plně vyvinuté druhé meiotické

metafáze (Tabulka 2, 3, 4, 5). Bez jakéhokoli účinku byly oocyty bez meiotické kompetence (80 – 89 μm a 90 - 99 μm) při působení koncentrací 10, 7,5, 5 a 2,5 mM.

Bylo zjišťováno, zda aminoguanidin není toxický pro oocyty, jelikož nemá neúčinný konformer jako L-NAME. Po reverzi aminoguanidinu měly obnovenou schopnost pokračovat po prvním meiotickém bloku oocyty s částečnou meiotickou kompetencí (Tabulka 6), ale u oocytů s plně vyvinutou meiotickou kompetencí měla reverze za následek nárůst partenogeneticky aktivovaných embryí (26%) oproti kontrolní skupině (3%) (Tabulka 7).

Dále bylo zjišťováno zda inhibitor působí na přechod mezi první a druhou meiotickou metafází. Po přidání aminoguanidinu došlo u oocytů k zastavení v první meiotické metafázi. U plně kompetentních mělo přidání aminoguanidinu za následek, že oocyty nebyly schopny prolomit meiotický blok a dosáhnout tak druhé meiotické metafáze (Tabulka 8).

Tabulka 2: Účinek aminoguanidinu na meiotické zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí 100 – 110 μm

Množství aminoguanidinu	Stádium meiotického zrání (%)		
	GV	MI	MII
kontrola 0 mM AG	11,0 \pm 1,0 ^A	87,7 \pm 5,1 ^A	1,3 \pm 1,1 ^A
2,5 mM AG	7,2 \pm 2,0 ^A	91,5 \pm 4,7 ^A	1,3 \pm 0,3 ^A
5 mM AG	89,8 \pm 2,9 ^B	9,2 \pm 3,9 ^B	1,0 \pm 0,8 ^A
7,5 mM AG	90,0 \pm 2,7 ^B	9,4 \pm 3,2 ^B	0,6 \pm 0,1 ^A
10 mM AG	92,3 \pm 5,1 ^B	7,4 \pm 1,2 ^B	0,3 \pm 0,1 ^A

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 3: Účinek aminoguanidinu na meiotické zrání oocytů s plně vyvinutou meiotickou kompetencí 120 μm

Množství aminoguanidinu	Stádium meiotického zrání (%)		
	GV	MI	MII
kontrola 0 mM AG	2,8 \pm 2,0 ^A	7,8 \pm 2,1 ^A	89,4 \pm 5,1 ^A
2,5 mM AG	2,3 \pm 2,9 ^A	5,8 \pm 2,4 ^A	91,9 \pm 4,1 ^A
5 mM AG	90,2 \pm 4,9 ^B	5,9 \pm 2,6 ^A	3,9 \pm 3,3 ^B
7,5 mM AG	95,1 \pm 4,1 ^B	3,3 \pm 2,7 ^A	1,6 \pm 2,1 ^B
10 mM AG	92,6 \pm 5,1 ^B	3,0 \pm 3,1 ^A	4,4 \pm 3,5 ^B

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 4: Účinek L-NAME a D-NAME na meiotické zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí 100 – 110 μm

L-NAME	Množství	Stádium meiotického zrání (%)		
		GV	MI	MII
	kontrola 0 mM	8,01 ± 7,1 ^A	90,4 ± 1,0 ^A	1,6 ± 0,2 ^A
2,5 mM	6,1 ± 3,0 ^A	93,4 ± 3,1 ^A	0,6 ± 0,4 ^A	
5 mM	91,6 ± 2,6 ^B	8,4 ± 2,6 ^B	0,0 ± 0,0 ^A	
7,5 mM	91,5 ± 2,0 ^B	8,5 ± 2,0 ^B	0,0 ± 0,0 ^A	
10 mM	94,7 ± 3,5 ^B	5,3 ± 0,5 ^B	0,0 ± 0,0 ^A	

D-NAME	Množství	Stádium meiotického zrání (%)		
		GV	MI	MII
	kontrola 0 mM	8,01 ± 0,7 ^A	90,4 ± 1,0 ^A	1,6 ± 2,0 ^A
2,5 mM	7,7 ± 1,7 ^A	92,3 ± 0,7 ^A	0,0 ± 0,0 ^A	
5 mM	8,4 ± 1,8 ^A	91,6 ± 1,8 ^A	0,0 ± 0,0 ^A	
7,5 mM	8,2 ± 1,7 ^A	90,9 ± 2,6 ^A	0,9 ± 0,1 ^A	
10 mM	6,5 ± 2,8 ^A	93,5 ± 2,8 ^A	0,0 ± 0,0 ^A	

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 5: Účinek L-NAME a D-NAME na meiotické zrání oocytů s plně vyvinutou meiotickou kompetencí 100 – 110 μm

L-NAME	Množství	Stádium meiotického zrání (%)		
		GV	MI	MII
	kontrola 0 mM	3,0 ± 0,3 ^A	4,8 ± 1,5 ^A	92,2 ± 6,1 ^A
2,5 mM	4,5 ± 0,3 ^A	5,4 ± 2,5 ^A	90,2 ± 2,1 ^A	
5 mM	91,0 ± 2,2 ^B	6,7 ± 1,2 ^A	2,4 ± 0,2 ^B	
7,5 mM	90,8 ± 2,5 ^B	4,7 ± 0,2 ^A	4,7 ± 0,2 ^B	
10 mM	92,7 ± 4,9 ^B	4,4 ± 1,8 ^A	2,9 ± 0,9 ^B	

D-NAME	Množství	Stádium meiotického zrání (%)		
		GV	MI	MII
	kontrola 0 mM	3,0 ± 0,3 ^A	4,8 ± 0,5 ^A	92,2 ± 6,1 ^A
2,5 mM	3,0 ± 0,3 ^A	4,6 ± 0,3 ^A	93,7 ± 2,8 ^A	
5 mM	3,9 ± 0,1 ^A	4,3 ± 0,4 ^A	91,8 ± 1,7 ^A	
7,5 mM	2,3 ± 0,3 ^A	4,9 ± 2,4 ^A	92,9 ± 3,1 ^A	
10 mM	4,8 ± 1,0 ^A	2,9 ± 0,8 ^A	92,5 ± 1,6 ^A	

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 6: 24-hodinová reverze oocytů s částečnou meiotickou kompetencí po kultivaci s aminoguanidinem (10 mM)

%	Stádium meiotického zrání		
	GV	MI	MII
kontrola 72 hod	4,0 ± 0,2 ^A	96,0 ± 5,1 ^A	0,0 ± 0,0 ^A
10 mM AG + 24 hod reverze	23,3 ± 5,0 ^A	71,7 ± 15,1 ^A	0,0 ± 0,0 ^A

Statisticky významný rozdíl P < 0,05 v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 7: 24-hodinová reverze oocytů s plnou meiotickou kompetencí po kultivaci s aminoguanidinem (10 mM)

%	Stádium meiotického zrání			
	GV	MI	MII	aktivovaných
kontrola 72 hod	6,1 ± 1,0 ^A	6,1 ± 5,0 ^A	84,7 ± 7,2 ^A	3,1 ± 2,1 ^A
10 mM AG	92,6 ± 2,1 ^B	2,9 ± 0,5 ^A	4,5 ± 4,0 ^B	0,0 ± 0,0 ^A
10 mM AG 48hod + reverze 24 hod	18,9 ± 3,5 ^A	42,0 ± 6,2 ^B	13,1 ± 2,1 ^B	26,0 ± 6,2 ^B

Statisticky významný rozdíl P < 0,05 v řádcích mezi skupinou 10 mM AG a kontrolní skupinou jsou vyjádřeny odlišnými písmeny (A,B)

Tabulka 8: Účinek aminoguanidinu na přechod oocytů z první do druhé meiotické metafáze

%	Stádium meiotického zrání			
	GV	MI	MII	atypických
kontrola	0,0 ± 0,0 ^A	14,3 ± 2,1 ^A	85,7 ± 6,1 ^A	0,0 ± 0,0 ^A
24 hod médium + 24 hod 10 mM AG	0,5 ± 0,1 ^A	46,9 ± 11,9 ^B	43,4 ± 6,8 ^B	9,2 ± 1,5 ^A

Statisticky významný rozdíl P < 0,05 v řádcích (mezi stádiem GV, MI a MII) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

5.3 Ověření účinku NO donoru

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jak růstovou fází a meiotickou kompetenci oocytů ovlivňuje oxid dusnatý, který je dodán do in vitro systému z externího zdroje formou NO donoru.

Ve stádiu první a druhé meiotické metafáze, během 48 hod kultivace s NO donorem, došlo ke snížení počtu oocytů s částečnou a plnou meiotickou kompetencí (Tabulka 9, 10). Oocyty po 24hodinové reverzi v čistém mediu již nepokračovaly v procesu zrání. Koncentrace NO, kterou se použila narušila životaschopnost oocytů. Za aktivaci v druhé meiotické metafázi (68%) může koncentrace 2 mM a 1mM SNAP, proto byla koncentrace snížena na 0,1 a 0,3 mM SNAP, která již neměla inhibiční účinek na oocyty. V této koncentraci oocyty s ukončeným růstem zrály do druhé meiotické metafáze po 48 hodinové kultivaci v médiu s NO donorem.

Tabulka 9: Vliv donoru NO SNAP na meiotické zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí 100 – 110 μ m

%	SNAP				
	GV	GVBD	LD	MI	MII
Kontrola	8,1 \pm 8,34 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	91,9 \pm 8,3 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A
0,03 mM	10,7 \pm 2,8 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	36,1 \pm 2,6 ^C	46,7 \pm 8,7 ^C	4,9 \pm 0,5 ^A
0,1 mM	8,2 \pm 1,9 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	63,6 \pm 8,6 ^B	23,3 \pm 3,2 ^B	4,9 \pm 3,6 ^A
2 mM	8,3 \pm 14,4 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	79,2 \pm 36,0 ^B	12,5 \pm 1,7 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO SNAP) a sloupcích (dané stádium meiotického zrání) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B,C)

Tabulka 10: Vliv donoru NO SNAP na meiotické zrání oocytů s plnou meiotickou kompetencí 120 μ m

%	SNAP				
	GV	LD	MI	MII	Atyp
Kontrola	2,3 \pm 1,5 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	4,7 \pm 4,0 ^A	92,96 \pm 6,3 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A
0,03 mM	1,3 \pm 0,5 ^A	67,9 \pm 10,6 ^B	11,5 \pm 2,6 ^A	14,1 \pm 1,5 ^B	5,1 \pm 4,0 ^A
0,1 mM	25,0 \pm 2,3 ^B	75,0 \pm 9,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
2 mM	25,0 \pm 2,3 ^B	75,0 \pm 20,2 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO SNAP) a sloupcích (dané stádium meiotického zrání) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B)

5.4 Kombinovaný účinek inhibitorů NOS a donorů NO na oocyty

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat zvrácení účinku inhibitorů NOS dodáním NO donorem do in vitro kultivačního prostředí a vliv koncentrace donorů a inhibitorů na meiotickou kompetenci oocytů.

U oocytů s plnou i s částečnou meiotickou kompetencí bylo zjištěno, že přidání NO donoru dokáže zvrátit účinek inhibitorů NOS. Ale oba typy oocytů (100 – 110 μm a 120 μm) dokáží dosáhnout pouze první meiotické metafáze. Plně meioticky kompetentní oocyty nebyly schopny dosáhnout dozrání do druhé meiotické metafáze (Tabulka 11, 12).

Tabulka 11: Vliv kombinace inhibitoru NOS a donoru NO na oocyty s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí 100 - 110 μm

5 mM AG + SNAP	SNAP (%)				
	GV	GVBD	PD	MI	MII
Kontrola	6,86 \pm 5,1 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	4,04 \pm 5,1 ^A	80,77 \pm 11,0 ^A	7,88 \pm 9,8 ^A
0 mM	89,0 \pm 2,1 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A	8,2 \pm 2,6 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
0,1 mM	13,8 \pm 1,2 ^A	19,0 \pm 5,0 ^B	15,7 \pm 6,6 ^A	47,2 \pm 17,5 ^C	4,3 \pm 1,0 ^A
0,03 mM	26,7 \pm 3,0 ^C	0,0 \pm 0,0 ^A	43,3 \pm 13,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
0,5 mM	7,1 \pm 10,1 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	79,5 \pm 11,3 ^C	13,4 \pm 1,3 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
1 mM	28,6 \pm 15,4 ^C	0,0 \pm 0,0 ^A	59,3 \pm 35,9 ^B	9,1 \pm 15,7 ^B	3,0 \pm 0,0 ^A
2 mM	55,8 \pm 1,8 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A	39,6 \pm 4,6 ^B	4,5 \pm 0,4 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO a inhibitoru NOS) a sloupcích (dané stádium meiotického zrání) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B,C)

Tabulka 12: Vliv kombinace inhibitoru NOS a donoru NO na oocyty s plně vyvinutou meiotickou kompetencí 120 μm

5 mM AG + SNAP	SNAP (%)				
	GV	PD	MI	MII	Atyp
Kontrola	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	6,3 \pm 0,3 ^A	93,7 \pm 4,5 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A
0 mM	90,15 \pm 5,7 ^C	0,0 \pm 0,0 ^A	5,88 \pm 1,3 ^A	3,98 \pm 0,5 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
0,03 mM	0,0 \pm 0,0 ^A	21,1 \pm 6,3 ^C	36,8 \pm 8,7 ^C	10,5 \pm 1,7 ^B	31,6 \pm 12,8 ^B
0,5 mM	4,3 \pm 0,5 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	26,1 \pm 6,2 ^C	34,8 \pm 7,8 ^C	34,8 \pm 12,5 ^B
0,1 mM	13,8 \pm 1,2 ^A	3,6 \pm 0,3 ^A	57,4 \pm 6,2 ^B	11,4 \pm 2,3 ^B	13,8 \pm 2,9 ^A
2 mM	26,7 \pm 2,1 ^B	73,3 \pm 13,5 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A

Statisticky významný rozdíl $P < 0,05$ v řádcích (mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO a inhibitoru NOS) a sloupcích (dané stádium meiotického zrání) je vyjádřen odlišnými písmeny (A,B,C)

6. Diskuse

V této práci jsme zjišťovali roli oxidu dusnatého během růstové periody a procesu nabývání meiotické kompetence u oocyty prasete pomocí inhibitorů NOS a donorů NO. Inhibitory, aminoguanidin a L-NAME blokovaly meiotické zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí, oocyty plně meioticky kompetentní i s ukončeným růstem. Účinek inhibitorů byl závislý na koncentraci a byl vratný. Po přidání inhibitorů bylo narušeno GVDB oocytů. To může vést k myšlence, že NO je nezbytný pro samotný počátek meiotického zrání. Pro meiotické zrání oocytů prasete je důležitá regulace přes iNOS izoformy, protože po jejím vyblokování je narušen proces zrání, stejně jako po přidání inhibitorů (L-NAME), blokujících všechny NOS současně. U plně kompetentních oocytů, inhibice NOS zabraňuje oocytům dosáhnout druhé meiotické metafáze, stejně tak u oocytů s plnou meiotickou kompetencí, kdy tento vliv inhibitorů NOS je patrný pokud dojde k zastavení až ve stádiu metafáze I. Inhibice aminoguanidinem byla pro zrání oocytů účinnější a to po přidání k oocytům již ve stádiu zárodečného vajíčku. V době přechodu mezi metafázemi, prasečí oocyty již nepotřebují tolik množství NO jako oocyty ve stádiu zárodečného vajíčku, nebo přestávají být vnímavé na jeho účinek, či jsou regulovány jiným NO než indukovatelné izoformy NOS. U oocytů myši byl pozorován blok meiotického zrání po inhibici NOS, a to meioticky kompetentní oocyty procházely rozpadem zárodečného vajíčku a jejich meiotické zrání bylo zablokováno až mezi první a druhou metafází (Bu et al., 2003). Změny, které jsme pozorovali v meiotickém zrání oocytů po aplikaci inhibitorů NOS, ke kterým podle literatury dochází při kultivaci oocytů získaných od zvířat s vyblokováním genu pro některou z izoform NOS (Jablonka-Shariff a Olson, 1997). Zjistili jsme, že použitá koncentrace inhibitorů NOS není pro oocyty toxická. Jelikož po kultivaci a reverzi s neúčinným kofaktorem jsou oocyty schopny pokračovat ve svém zrání. Po zvrácení účinku (24 hod) oocyty s ukončeným růstem v čistém médiu došly k vysokému nárůstu podílu partenogeneticky aktivovaných embryí.

Dále jsme sledovali účinek NO donoru na oocyty s různým stupněm meiotické kompetence. Z experimentů, který provedli Petr *et al.* (2008) na pracovišti KVD byla známá koncentrace SNAP, a to pokud se přidá 2 mM SNAP k oocytům v metafázi II, dochází ze 71 % během 10 hod k jejich partenogenetické aktivaci. Proto jsme použili tuto koncentraci donoru jako výchozí pro kultivaci oocytů s částečnou meiotickou kompetencí, tak i plnou meiotickou kompetencí a dokončenou růstovou periodou. SNAP patří mezi stabilní analogy endogenních S-nitrosothiolů. Po vstupu do buňky se ze SNAP uvolňuje NO pomocí

endogenních enzymů a NO je tak zdrojem *in vivo* (Bredt a Snyder 1992, Garthwaite 1991). Kvůli těmto vlastnostem jsme ho zvolili. Koncentrace NO donoru SNAP, kterou jsme použili (2 – 0,05 mM) narušovala životnost oocytů, po 24 hod reverzi v čistém mediu oocyty nepokračovaly ve svém zrání. Je jisté, že vysoké koncentrace NO vedou v somatických buňkách ke vzniku toxických reakčních produktů (Bu *et al.*, 2003), a k tomu dochází nejspíš i u prasečích oocytů. Na zrání oocytů myši, v nízké koncentraci dodané SNP donorem, působí stimulačně, ale naproti tomu vysoké koncentrace NO donoru vedou k inhibici zrání. My jsme zjistili, že u prasečích oocytů NO donor v nízké koncentraci nedokáže ovlivnit meiotickou kompetenci oocytů, oocyty s částečnou meiotickou kompetencí nebyly v přítomnosti donoru NO schopny prolomit blok metafáze I. Experimenty vypracované Petrem *et al.* (2008) ukázaly, že SNAP v 1 mM koncentraci aktivuje oocyty prasete po jejich ošetření ve druhé meiotické metafázi ze 68%. Na oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a plnou meiotickou kompetencí tato koncentrace donoru působí toxicky. Což může vést k myšlence, že oocyty jsou zřejmě na počátku své oogeneze k působení NO mnohem více citlivé nežli oocyty na konci svého meiotického zrání, ve stádiu metafáze II. Ale také to může vést i k vysvětlení, že oocyty na počátku svého růstu obsahují už dostatek množství NOS produkující NO a tudíž NO dodaný z externího zdroje je pro oocyty nadbytečný a škodlivý.

Dále jsme prokázali u oocytu prasete, že lze použitím NO donoru zvrátit účinek, a to když inhibiční působení látek vyvolává v oocytech nedostatek NO. Je zapotřebí zvolit donor o velmi malé koncentraci. Donor však nedokázal posunout většinu oocytů za stádium metafáze I. Do stádia metafáze II dospělo maximálně 34.8% oocytů (0.05 mM SNAP). Koncentrace NO 0.1 mM dodaná z externího zdroje stačila pro oocyty s plnou i částečnou meiotickou kompetencí, na posun zablokovaných oocytů do stádia metafáze I.

V buňkách se NO váže na hemovou skupinu rozpustné guanylát cyklázy (sGC) a tím zvyšuje produkci cyklického cGMP (Groves a Wang, 2000). Je možné, že cGMP snižuje hladinu cAMP a ovlivňuje meiotické zrání aktivací cAMP-fosfodiesterázy. Oproti tomu jsou i důkazy, že NO může vyvolávat řadu biologických efektů mimo cGMP signální kaskádu, například vazbou na hemovou skupinu jiných proteinů než cGMP nebo nitrosylací řady proteinů typu Ras, který je součástí MAPK dráhy v oocytu, či tyrosinu (Moretto *et al.*, 1993; Retlori *et al.*, 1993).

V našich experimentech jsme prokázali zapojení NO do regulace růstové periody a procesu získání meiotické kompetence. Otázka je, jakým způsobem NO v oocytech působí a jaký mechanismus účinku je u oocytů rostoucích či s ukončeným růstem.

7. Závěr

Naše experimenty prokázaly, že oxid dusnatý a také jeho producent, syntáza oxidu dusnatého, jsou důležité pro růstovou periodu oocyту prasete a proces zisku meiotické kompetence, k jejíž nabývání během růstové fáze oogeneze kontinuálně dochází.

8. Seznam literatury

- Anger M. (2001): Identifikace Polo kinázy a její exprese v průběhu buněčného cyklu, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Liběchov
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): Základy buněčné biologie, Espero Publishing Ústí nad Labem
- Alderton K.W., Cooper Ch. E., Knowles G. R. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem*, 357, 593 – 615
- Ambrosino A., Russo D., Lamanna C., Assisi L., Rizzo M., Vittoria A., Cecio A. (2003): Isoforms of nitric oxide in the pig testis. *Acta. Vet. Brno.* 72, 493 – 498.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootmen M.D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 11-21
- Billiar T. R. (1995): Nitric Oxide, *Ann. Surg.* 221, 339.
- Biswas S., Kabir S.N., Pal A.K. (1998): The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fertil* 114, 157-161
- Black J. D. (2000): Proteinkinase C - mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, 5172 – 5176.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resemble cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714-718
- Bredt D.S. a Snyder S.H. (1992): Nitric Oxide, a novel biologic messenger. *Neuron* 8, 3-11

- Bryk R., Wolff D.J. (1998): Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N-6-(1-inoethyl) lysine. *Biochemistry* 37 (14): 4844-4852
- 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
- Burnett A.L., Lowenstein C.J., Brecht D.S., Chang T.S., Snyder S.H. (1992): Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science*. 257, 401 – 403.
- Clapham D.E. (1995): Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268
- Corbett J.A., Tilton R.G., Chang K., Hasan K.S., Ido Y., Wang J.L., Sweetland M.A., Lancaster J.R. Jr., Williamson J.R., McDaniel M.L. (1992): Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41, 552–556
- Davis K.L., Martin E., Turko I.V., Murad F. (2001): Novel effects of nitric oxide. *Ann. Rev. Pharm. Tox.* 41, 203 – 236.
- Dixit D. V., Parvizi N. (2001): Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science* 65, 1 –16
- Espey M.G., Miranda K.M., Feelish M. (2000): Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann. New York Acad. Sci.* 899, 209-221
- Fan H. Y., Li M. Y., Tong C., Chen D. Y., Xia G. L., Song X. F., Schatten H., Sun Q. Y. (2002): Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 480 – 487
- Fan H.Y., Tong C., Chen D.Y., Sun Q.Y. (2003): Roles of protein kinase C in oocyte meiotic maturation and fertilization . *Progress in Natural Science* 13, 401-406

- Fair T. (2003): Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 203 – 216
- Garthwaite J. (1991): Gletamate, nitric oxide and cell signalling in the nervous system. *Trends Neurol.Sci.* 14, 60 –67
- Garthwaite J., Boulton C. L. (1995): Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 683-706.
- Gregg A.R. (2003): Mouse models and the role of nitric oxide in reproduction. *Current Pharmaceutical Design* 9, 391-398
- Greif D. M., Sacks D. B., Michel T. (2004): Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 5, 1165 – 1170
- Groves J.T. a Wang C.C.-Y. (2000): Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 687-695
- Haccard O., Sarcevic B., Lewellyn A.L., Hartley R., Roy L.M., Izumi T., Erickson E., Maller J.L. (1993): Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science.* 262, 1262 – 1265.
- Hattori M.-A., Nishida T., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. (2000): FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 65 – 73.
- Hattori M.A., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. (2001): Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function. *Mol. Cell. Biochem.* 219, 121 – 126.
- Hayashi Y., Nishio M., Naito Y., Yokokura H., Nimura Y., Hidaka H., Watanabe Y. (1999): Regulation of neuronal - nitric oxide synthase by calmodulin kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 20597 – 20602

- Hirao Y., Nagai T., Kubo M., Miyano T., Miyake M., kato S. (1994): In vitro growth and maturation of porcine oocytes. *J Reprod. Fertil.* 100, 333-339
- Homa S.T., Carroll J., Swann K. (1993): The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Hum. Reprod.*, 8, 1274 - 1281
- Hunt T. (1992): Cell cycle arrest and c-mos. *Nature.* 355, 587 – 588
- Hunter M. G. (2000): Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*, vol. 5, no. 2, s. 122-130
- Huo L.J., Fan H.Y., Liang C.G., Yu L.Z., Zhong Z.S., Chen D.Y., Sun Q.Y. (2004): Regulation of ubiquitin – proteasome pathway on pig oocyte meiotic maturation and fertilization. *Biol. Reprod.* 71, 853 – 862
- Huo L-J., Liang Ch-G., Yu L-Z., Zhong Z-S., Yang Z-M., Fan H-Y, Chen D-Y., Sun Q-Y. (2005): Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte, *Society for Reproduction and Fertility* 129, 403 – 409
- Hyslop L.A., Carroll M., Nixon V.L., McDougall A., Jones K.T., (2001): simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. *Dev. Biol.* 234, 216-230
- Ignarro L., Murad F. (1995): *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications.* Advances in Pharmacology, vol.34, Academic Press, San Diego CA
- Ignarro L., Cirino G., Casini A., Napoli C. (1999): Nitric oxide is a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 879 – 876

- 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. *Biol. Reprod.* 58, 130 – 136
- Jablonka-Shariff A., Olson M. L. (1997): Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 138, 460 – 468
- Jablonka-Shariff A., Olson M. L. (1998): The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*, 139, 2944 – 2954
- Jablonka-Shariff A., Basuray R., Olson L. M. (1999): Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 6, 95-101
- Jablonka-Shariff A., Olson L.M. (2000): Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 55, 412-421
- Jílek .F, Hüttelová R., Petr J., Holubová M., Rozinek J. (2000): Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Anim. Reprod. Sci.* 63, 101-111
- Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J. K., Tilly J. L. (2004): Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.* 6979, 145-150
- Jones K. T. (2004): Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular human Reproduction* Vol.10, No.1, 1 – 5
- Kishimoto T. (2003): Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 654-663
- Kodíček M. (2007): *Biochemické pojmy*, Praha: VŠCHT Praha

- Kubelka M., Anger M., Kalous J. (2002): Chromosome condensation in pig oocytes: Lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Molecular reproduction and development*, vol. 63, no. 1, s. 110-118.
- Kubiak J.Z., Weber M., de Pennart H., Winston N.J., Maro B. (1993): The Metaphase II arrest in mouse is controlled through microtubule dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *EMBO* 12, 3773-3778
- Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem listy* 98, 116 – 122
- Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T. (1992): Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 6348 – 6352.
- Lander H.M., Ogiste J.S., Pearce S.F., Levi R., Novogrodsky A. (1995): Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270, 7017-7020
- Lorca T., Cruzalegui F.H., Fesquet D., Cavadore J.C., Mery J., Means A., Doree M. (1993): Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366, 270-273
- Macháty Z., Funahashi H., Day B.N., Prather R.S. (1997): Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 56, 921-930
- Marchal R., Vigneron C., Perrreau C., Bali-Papp A., Mermillod P. (2002): Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 57, 1523-1532
- Marletta M.A. (1993): Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (17), 12231-12234

- Marletta M.A. (2001): Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? *Trends. Biochem. Sci.* 26, 519 – 521.
- Marvan F., Hampl A., Hlozankova E., Kresan J., Massanyi L. a Vernerova E. (1998): Morfologie hospodářských zvířat. ZN Brázda
- Masui Y., Markert C. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of experimental zoology*, vol. 177, no. 2, s. 129-145
- Masui Y. (1991): The role of cytotstatic factor (CSF) in the control of oocyte cell cycle – a summary of 20 years study. *Dev. Growth. Differ.* 33, 543-551
- Matifat F., Hague F., Brule G., Collin T (2001): Regulation of InsP₃-mediated Ca²⁺ release by CaMK II xenopus oocytes. *Pflugers. Arch.* 441, 796-801
- McMillan K., Brecht D.S., Hirsch D.J., Snyder S.H., Clark J.E., Masters B.S.S. (1992): Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 11141 - 11145.
- Mellor H., Parker P. J. (1998): The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281 – 292.
- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991): Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43, 109-142
- Motlík J., Fulka J. (1976): Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 198, 155 – 162
- Motlík J., Fulka J. (1986): Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25, 87 - 96
- Motlík J., Crozet N., Fulka J. (1984): Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fert.* 72, 323 – 328

- Nakamura Y., Yamagata Y., Sugino N., Takayama H., Kato H. (2002): Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of reproduction* 67, 1588 – 1592
- Nathan C. (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051 - 3064
- Nathan C., Hibbs J.B.Jr. (1991): Role of nitric-oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Op. Immun.* 3, 65-70
- Nathan C., Xie Q. (1995): Nitric oxide synthases: Roles, tolles and controls. *Cell*: 78, 915-918
- Nebreda A. R., Ferby I. (2000): Regulation of meiotic cell cycle in oocytes. *Current opinion in cell biology*, vol. 12, no. 6, 666-675
- Okere C.O. , Higuchi T. (1996): Down-regulation of endogenous nitric oxide synthase in late-pregnancy and parturition in the rat hypothalamic magnocellular neurons and neurohypophysis. *Neurosci. Lett.* Dec 220(2), 133 – 136
- Olson L.M., Jones-Burton C.M. a Jablonka-Shariff A. (1996): Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide *in* functional luteal regression. *Endocrinology* 137, 3531-9
- Olson L.M., Jablonka-Shariff A., Beltsos A.N. (1999): Ovarian nitric oxide: a modulator of ovulation and oocyte maturation. In: Adashi F.Y. (Ed.), *Ovulation: Evolving Scientific and clinical concepts*. Springer. New York
- Olson L.M., Jablonka-Shariff A., Beltsos A.N. (2000): Ovarian nitric oxide: A modulator of ovulation and oocyte maturation. Reprinted from *Ovulation-Evolving scientific and clinical concepts*, ed Adashi E.Y. Springer-Verlag, New York

- Petr J., Rozinek J., Jílek F. (1997): Cyclopiazonic acid induces accelerated progress of meiosis in pig oocytes. *Zygote*. 5
- Petr J. (1998): Využití biotechnologií obratlovců. In: Šifner a kolektiv Vybrané kapitoly z biotechnologií pro studující učitelství biologie a ekologické výchovy. Karolinum, Praha
- Petr J., Rozinek J., Hruban V., Jílek F., Sedmíková M., Vaňourková Z., Němeček Z. (2001): Ultrastructural localization of calcium deposits during *in vitro* culture of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 196 – 204
- Petr J., Sedmíková M., Rajmon R. (2004): Zrod, život a smrt savčího vajíčka. *Vesmír* 83, květen 2004
- Petr J., Rajmon R., Rozinek J., Sedmíková M., Ješeta M., Chmelíková E., Švestková D., Jílek F. (2005): Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 1, 115-122
- Petr J., Chmelíková E., Krejčová T, Reháček D, Novotná B, Jílek F. (2008): Parthenogenetic Activation of Pig Oocytes Using Pulsatile Treatment with a Nitric Oxide Donor, *Reprod Domest Anim.*
- Peterson D. A., Peterson D. C., Archer S., Weir E. K. (1992) The non specificity of specific nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 187, 797-801
- Pinilla L., Gonzales D., Sempere M.J., Aguilar E. (1998): Nitric oxide stimulates gonadotropin secretion *in vitro* through a calcium dependent and cGMP – independent mechanism. *Neuroendocrinol.* 68, 180 - 186
- Pozzan T., Rizzuto R., Vespignani P., Meldolesi J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74, 595 – 636
- Procházka R., Kaňka J., Sutovský P., Fulka J., Motlík J. (1992): Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J. Reprod. Fertil.* 96, 725-734

- Procházka R., Durnford R., Fiser P.S., Marcus G.J. (1993): Parthenogenetic development of activated in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 39, 1025-1032
- Reece W. O. (1998): *Fyziologie domácích zvířat*. William a Wilkins
- Rees D.D., Palmer R.M.J., Hodson H.F., Moncada S. (1989): A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96, 418-424
- Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F., Moncada S. (1990): Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101, 746-752
- Rettori V., Belova N., Dees W., Nyberg C., Gimeno M., McCann S.M. (1993): Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 10130 – 10134
- Rozinek J., Vaňourková Z., Sedmíková M., Lánská V., Petr J., Rajmon R., Jílek F. (2003): Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig oocytes maturing in vitro: effects of verapamil. *Zygote*. 11, 253 – 260
- Sagata N. (1997): What does Mos do in oocytes and somatic cells? *BioEssays*. 19, 13 –21
- Sengoku K., Takuma N., Horikawa M., Tschuiya K., Komori H., Sharifa D., Tamate K., Ishikawa M. (2001): Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 58, 262-268
- Schmidt K., Klatt P., Mayer B. (1993): Characterization of endothelial cell amino acid transport systems involved in the actions of nitric oxide synthase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 44, 615 – 621

- Schmidt A., Nadine R., Nigg E. A., Mayer T. U. (2006): Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of cell science*, vol. 119, no. 7, 1213-1218
- Schmitt A., Nebreda A.R. (2002): Signalling pathways in oocyte meiotic maturation, *Journal of Cell Science* 115, 2457-2459
- Shukovski L., Tsafiriri A. (1994): Involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology*. 2287 – 2290
- Sládeček F. (1986): *Rozmnožování a vývoj živočichů*. Academia, Praha
- Srivastava V., Jones B.J., Dookah H., Hiney J.K., Dees L.W. (1997): Ovarian nitric oxide synthase (NOS) gene expression during peripubertal development. *Life Sci.* 61, 1507 – 1516.
- Stewart A.A., Ingebritsen T.S., Manalan A., Klee V.B., Cohen P. (1982): Discovery of a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett.* 137, 80-84
- Stojkovic M., Motlík J., Kölle S., Zakhartchenko V., Alberio R., Sinowatz F., Wolf E. (1999): Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 335 – 342
- Stuehr D. J., Kwon N. S., Nathan C. F., Griffith O. W., Feldman P. L., Wiseman J. (1991): N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* Apr 266, 6259 - 6263
- Sun, Xing-Shen; Liu, Yong; Yue, Kui-Zhong; Suo-Feng Ma; Tan, Jing-He (2004): Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*, vol. 69, no. 2, 228-234
- Sun Q. Y., Nagai T. (2003): Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *J. Reprod. Dev.* 49, 347-359

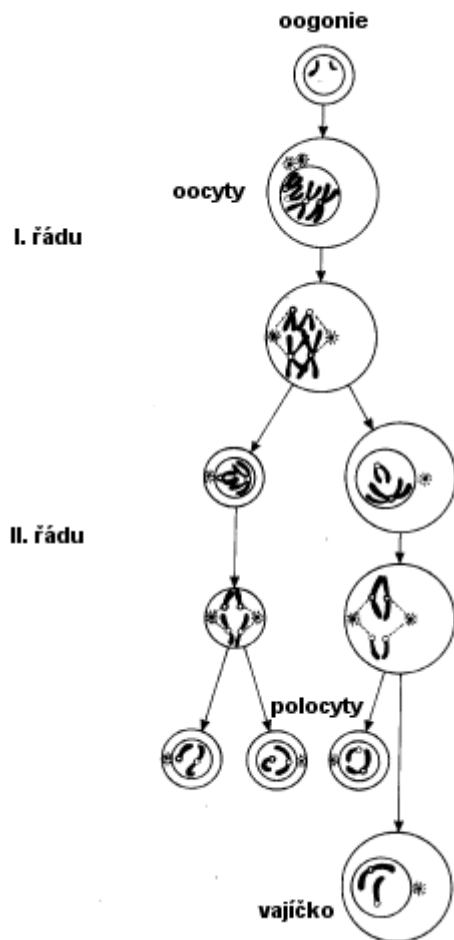
- Swann K., Ozil J. P. (1994): Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int. Rev. Cytol.* 152, 183-222
- Štípek S., Vejražka M. (2009): [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, datum poslední revize 11. 2. 2010, 01:22 UTC, [citováno 27. 2. 2010] www.wikiskripta.eu
- Taieb R., Thibier C., Jesus C. (1997): On cyclins, oocytes and eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 397 – 411
- Takesue K., Tбата S., Sato F., Hattori M.A. (2003): Expression of nitric oxide synthase – 3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *J. Reprod. Dev.* 49, 2
- Tao Y., Zhuo F., Zhang M., Xia G., Yang J., Xie H. (2004): Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 30, 222, 1-2, 93-103
- Thibier C., De-Smedt V., Poulhe R., Huchon D., Jesus C., Ozon R. (1997): In vivo regulation of cytosolic activity in *Xenopus* metaphase II – arrested oocytes. *Dev. Biol.* 185, 55 – 66
- Tombes R.M., Simerly C., Borisy G.G., Schatten G. (1992): Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J. Cell. Biol.* 117, 799-811
- Törnell J., Billig H., Hillensjö T. (1991): Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum Reprod* 6, 411-422
- Van Voorhis B.J. , Moore K., Strijbos P.J., Nelson S., Baylis S.A., Grzybicki D. a Weiner C.P. (1995): Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vitro. *J Clin Invest* 96, 2719-26

- Verlhac M., Kubiak J.Z., Clarke H.J., Maro B. (1994): Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120, 1017 – 1025
- Wassarman P. M. (1988): The mammalian ovum; In: Knobil E, Neillj, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 69 – 102
- Wilkinson G., Murillo C.A., Bochmann M. (1999): *Pokročilá anorganická chemie*, 6. ed. Wiley-Interscience, New York
- Weiner C.P., Lizasoain I., Baylis S.A., Knowles R.G., Charles I.G., Moncada S. (1994): Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5212 – 5216
- Whalley T., McDougall A., Crossley I., Swann K., Whitaker M. (1992): Internal calcium release and activation of sea urchin eggs by cGMP are independent of the phosphoinositide signaling pathway. *Mol. Biol. Cell*. 3, 373-383
- Wolff D.J., Lubeskie A. (1995): Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 316, 290-301
- Xie Q., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R. A., Swiderek K. M., Lee T. D., Ding A., Troso T., Nathan C. (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256, 225 – 228
- Yamauchi J., Miyazaki T., Iwasaki S., Kishi I., Kuroshima M., Tei C., Yoshimura Y. (1997): Effect of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology* 138, 3630-3637
- Yanagimachi R. (1988): Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*, edited by Knobil E. and Neill J. D. New York: Raven Press. 135-185
- Vanderhyden B. C. (2002): Molecular basis of ovarian development and function. *Front. Biosci.* 7, 2006 – 2022.

- Yew N., Mellini M.L., Vande Woude G.F. (1992): Meiotic initiation by the Mos protein in *Xenopus*. *Nature*. 355, 649 – 652
- Yi Y. J., Park C. S. (2005): Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cyclohexamide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Animal Repr. Sci.* 86, 297-304

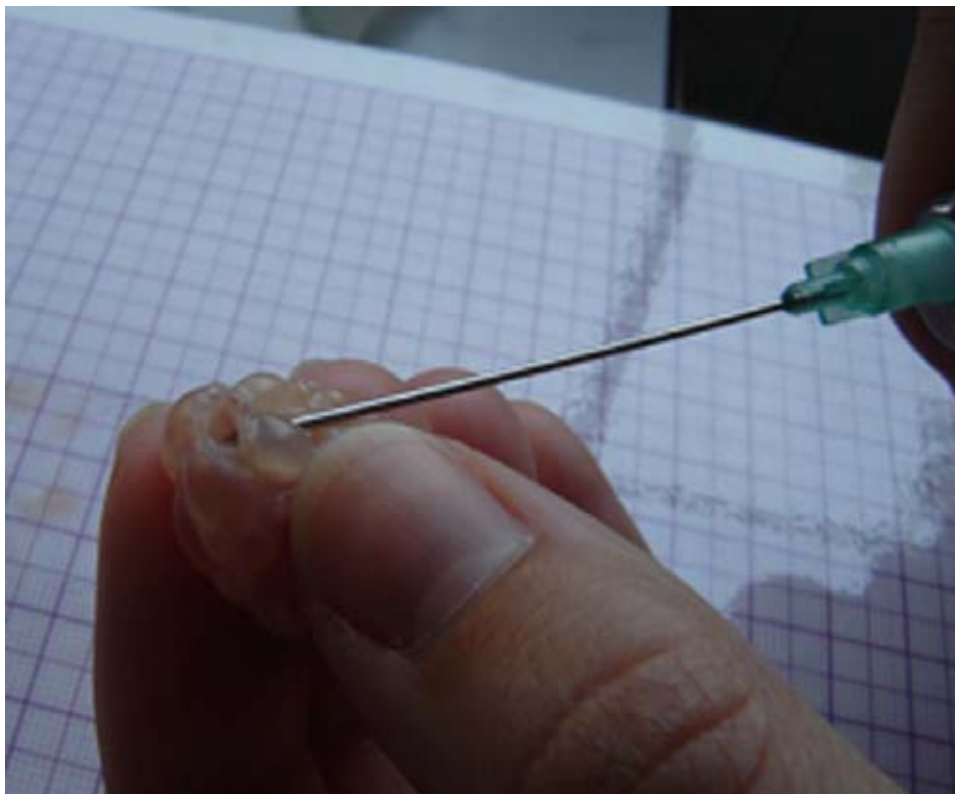
9. Přílohy

Obrázek 1. Meióza v průběhu zrání vajíček



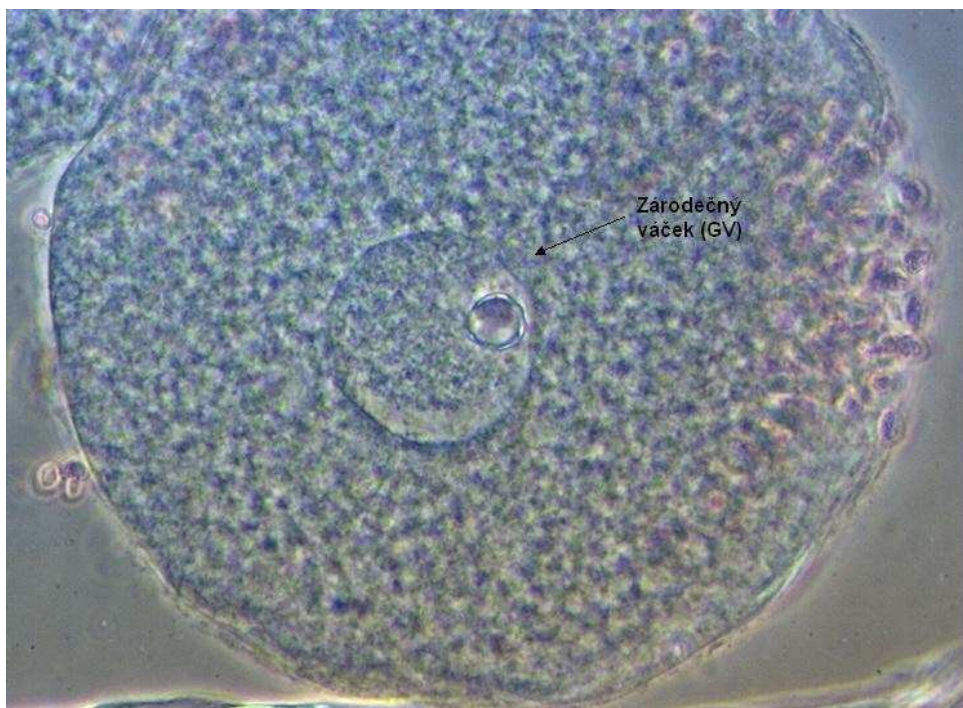
Zdroj: O. Nečas: Biologie, učebnice pro lékařské fakulty

Obrázek 2. Prasečí oocyty izolovány z vaječníků z jatek – aspirací 2-5 mm velkých folikulů



Zdroj: Lucie Jelínková, Laboratoř biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk

Obrázek 3. Oocyt ve stádiu GVBD



Obrázek 4. Profáze I



Obrázek 5. Metafáze I



Obrázek 6. Metafáze II

