

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



**Vliv inhibice fosfatázy 2B na meiotické zrání oocyту
prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Markéta Urbášková
Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Vliv inhibice fosfatázy 2B na meiotické zrání oocyту prasete“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce s použitím pouze těch odborných pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne: Podpis autora práce:

Poděkování

Děkuji především mé vedoucí práce paní doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za přijetí a odborné vedení mé diplomové práce a dále patří velké díky mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Vliv inhibice fosfatázy 2B na meiotické zrání oocyту prasete

Souhrn

Meiotické zrání je řízeno celou řadou regulátorů, mezi které patří také fosfatáza 2B, kalcineurin. Kalcineurin prokazatelně reguluje meiotické zrání oocytů u některého hmyzu, jako je moucha *Drosophila*, či žab, například rodu drápatka, *Xenopus*.

Naše práce poprvé prokázala zapojení fosfatázy 2B do meiotického zrání oocyту prasete. Bylo zjištěno, že při inhibici kalcineurinu je ovlivněno meiotické zrání oocytů *in vitro*. Inhibice kalcineurinu byla studována pomocí pyretroidu deltametrinu a nepyretroidu cyklosporinu A u částečně a plně meioticky kompetentních oocytů. Pozorovaný efekt na meiotické zrání byl závislý na stupni meiotické kompetence oocytů. U plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí došlo k narušení meiotického zrání, zatímco u rostoucích oocytů s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí, bylo naopak meiotické zrání stimulováno. Kalcineurin může být tudíž významným regulátorem meiotického zrání a také zisku meiotické kompetence. Jeho přesný mechanismus účinku v oocytech není znám a je třeba ho detailně prostudovat.

Klíčová slova: prase, oogeneze, oocyt, meiotické zrání, fosfatáza 2B, kalcineurin

The influence of 2B phosphatase inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

Meiotic maturation is controlled by many regulators and phosphatase 2B, calcineurin, is one of them. Calcineurin regulates oocyte meiotic maturation of some species, such as a fly *Drosophila*, or of frogs, for example *Xenopus*.

The involvement of phosphatase 2B in meiotic maturation of a pig oocyte was proved in our study for the first time. It was discovered that whenever inhibition of calcineurin appears, oocyte meiotic maturation is influenced *in vitro*. Inhibition of calcineurin was studied with the aid of pyrethroid deltamethrin and non-pyrethroid cyclosporin A in oocytes that were either partially or fully meiotically competent. The observed effects depended on the stage of meiotic competence of the oocytes. In fully-grown pig oocytes with fully-developed meiotic competence, maturation was disturbed, whereas in growing pig oocytes with partial meiotic competence, meiotic maturation was stimulated. Therefore, calcineurin can be a significant regulator of meiotic maturation and also of the acquisition of meiotic competence in porcine oocyte. The exact mechanism of its function in oocyte is not known and it is necessary to examine it in detail.

Keywords: pig, oogenesis, oocyte meiotic maturation, phosphatase 2B, calcineurin

Obsah

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
3.1 OOGENEZE	9
3.1.1 Fáze množení	9
3.1.2 Fáze růstu.....	11
3.1.3 Meiotická kompetence oocyty.....	13
3.1.4 Fáze zrání.....	15
3.2 HORMONÁLNÍ ŘÍZENÍ FOLIKULOGENEZE A OOGENEZE	17
3.3 REGULÁTORY MEIOTICKÉHO ZRÁNÍ	18
3.3.1 MPF – Metaphase Promoting Factor.....	18
3.3.2 MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase.....	19
3.3.3 CSF – Cytostatic factor	20
3.3.4 Vápník.....	21
3.3.5 Oxid dusnatý.....	21
3.3.6 Sirovodík	23
3.3.7 Cyklické nukleotidy.....	23
3.3.8 PKC - Protein kináza C.....	24
3.3.9 Fosfátázy - calcineurin	24
4. MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 ZÍSKÁVÁNÍ A KULTIVACE OOCYTŮ	29
4.2 STANOVENÍ VLIVU INHIBICE FOSFÁTÁZY 2B	29
4.3 HODNOCENÍ FÁZE ZRÁNÍ OOCYTŮ.....	30
4.4 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	30
5. VÝSLEDKY	32
5.1 OVĚŘENÍ MEIOTICKÉ KOMPETENCE OOCYTŮ	32
5.2 VLIV INHIBITORŮ NA ROSTOUCÍ OOCYTY S ČÁSTEČNOU MEIOTICKOU KOMPETENCÍ.....	33
5.3 VLIV INHIBITORŮ NA OOCYTY S UKONČENOU RŮSTOVOU FÁZÍ A PLNOU MEIOTICKOU KOMPETENCÍ	34
6. DISKUZE	37
7. ZÁVĚR	40
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41

1. Úvod

Reprodukční biotechnologie jako je inseminace, *in vitro* oplození, transfer embryí, klonování a tvorba transgenních jedinců jsou v posledních letech v chovu hospodářských zvířat využívány ve větší míře. Tyto techniky však u prasete narážejí na řadu problémů. Například mražení prasečích inseminačních dávek a embryí je problematické a i klonování má pouze malou účinnost. Většina biotechnologií je ale omezena počtem zralých oocytů ve vaječniku. Cestou k získání vyššího počtu těchto zralých oocytů mohou být techniky zvyšující vývojovou schopnost rostoucích oocytů ve vaječniku nebo metody růstu oocytů *in vitro*.

Oogeneze, zahrnující množení, růst a zrání oocytů, je ovlivněna celou řadou regulačních molekul. Jednou z nich může být i kalcineurin, protein s fosfatázovou aktivitou. Význam tohoto proteinu je možné studovat pomocí jeho inhibice. K inhibici se velmi často používají látky ze skupiny pyretroidů, jako je deltametrin, ale také látky inhibující kalcineurin nepyretroidového charakteru, jako je imunosupresivum, cyklosporin A.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které je protein fosfatáza 2B, kalcineurin, nezbytná pro správný průběh meiotického zrání oocyту prasete.

3. Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Proces vývoje samičích pohlavních buněk (oocytů) je souhrně nazýván oogeneze. Složitý proces oogeneze zahrnuje sérii mnoha morfogenetických změn (Coticchio et al., 2013). Oogeneze začíná již v embryonálním vývoji samice migrací primordiálních zárodečných buněk (oogonií) do zárodečného epitelu ovaria, kde dochází k dalšímu vývoji (Wartenberg, 1990). Během vývoje musí být genetický materiál buňky zredukován, což je uskutečněno v průběhu redukčního dělení – meiózy (Wassarman, 1988). Celý proces oogeneze je možné rozdělit na fázi množení, růstu a meiotického zrání (Wassarman, 1988; Nussbaum et al., 2004).

3.1.1 Fáze množení

Primordiální zárodečné buňky (PGC, Primordial Germ Cells) jsou založeny ve splanchopleure a přilehlém entodermu žloutkového váčku z nediferenciovaných buněk epiblastu. Tento proces probíhá již během gastrulace embrya (Freeman, 2003). Buňky následně migrují (Picton et al., 1998) do zadní části embrya, kde se nakonec usídlí v místě vznikající gonadální lišty (Freeman, 2003), kterou je tvořen základ pro vaječníky (Chawengsaksophak et al., 2011). Poté je zahájen proces rychlého mitotického množení již pohybu neschopných buněk. Tyto buňky jsou označovány jako oogonie (Wassarman, 1988; Gosden and Bownes, 1995). Mitotická aktivita oogonií prasete začíná kolem třináctého dne života embrya (Eppig et al., 2004; Hunter, 2000). Vzniká obrovský počet oogonií (Wartenberg, 1990), kdy z počtu pět tisíc v období dvaceti dnů po oplození je během následujících třiceti dnů jejich počet rapidně navýšen až na milion sto tisíc (Hunter, 2000).

Během embryonálního vývoje oocyty vstupují do meiózy a stávají se z nich oocyty primární (Neal and Baker, 1984; Lei et al., 2001). Meióza je zahájena na konci fáze množení (Rodrigues et al., 2008). U prasat dochází k zahájení meiózy zhruba ve čtyřicátém dni po oplození (Hunter, 2000). Již v profázi prvního meiotického zrání (Profáze I) je zárodečná buňka označována jako oocyt a prochází několika stádii, než je vývoj oocytu v této fázi zastaven (Rodrigues et al., 2008) k čemuž u prasat dochází okolo 35 dne po porodu (Hunter, 2000).

V profázi prvního meiotického dělení se mitochondrie přikládají těsně k jadernému obalu. Oocyt prochází prvním stádiem profáze I *leptotene*, kdy je kondenzací chromozómů a upnutím telomer k jaderné membráně v místě upínacích plotének tvořen charakteristický „leptotenní buket“ (Vacek, 2006; Scherthan, 2007). V následujícím stádiu *zygotene* je postupně vytvářena propojovací struktura žebříčkovité povahy neboli synaptický komplex. S jeho dvěma laterálními a jedním centrálním elementem jsou spojena chromatinová vlákna bivalentů vytvořených zkrácením a spárováním chromozómů (Heyting, 1996). Kondenzace a zkracování chromozómů pokračuje i v následujícím stádiu, *pachytene*. Každý chromozóm je zřetelně rozdělen na dvě sesterské chromatidy, přičemž bivalent obsahuje tyto chromatidy celkem čtyři a vzniká tetráda chromatid. Dále dojde k překřížení nesesterských chromatid (crossing-over) a tím výměně části genetického materiálu mezi homologními chromozómy v bivalentech (rekombinace). V průběhu další fáze *diplotene* dojde k uvolnění jednotlivých chromatid ze synaptického komplexu, avšak spojení v místech vzájemného překřížení, tzv. chiasmatech, přetrvává. Již zmíněné přerušení profáze I je uskutečněno v pozdním *diplotene*, také zvaném *diktyotene*. Jádro oocyty obklopené jadernou membránou v této fázi vývoje nazýváme zárodečným váčkem (Wassarman, 1988).

Zhruba třicet pět dnů před narozením jsou u prasete všechny oogonie v profázi I (Hunter, 2000) a dochází k obkolpení první vrstvou granulóznic buněk (Black and Erickson, 1968), čímž je vytvořen primární folikul (Hunter, 2000), také zvaný primordiální. Primordiální folikuly obsahují jeden primární oocyt, který je obklopen pouze jednou vrstvou granulóznic buněk (Wartenberg, 1990) plnících hlavně vyživovací funkci během následující fáze růstu (Buccione et al., 1990; Shimada, 2009). Populace primordiálních folikulů prasnic je odhadována na pětset tisíc při narození (Black and Erickson, 1968). Z ohromného množství namnožených folikulů však velká část podléhá atrezii a pouze menšina dojde do stádia ovulace (Tilly, 2001). Vývoj primárních oocytů pokračuje až s nástupem období pohlavní zralosti a následně v době ovulace (Wartenberg, 1990) vlivem luteinizačního hormonu (LH) (Neal and Baker, 1984; Lei et al., 2001).

Schopnost vzniku nových oocytů obklopených somatickými buňkami (folikulů) je ukončena těsně před nebo v okamžiku narození (Zuckerman, 1951; Zuckerman and Baker, 1977). Hunter (2000) ale uvádí ukončení mitotické aktivity u prasat až sedm dní po porodu. Tento fakt byl částečně vyvrácen modernější studií, kterou byla prokázána přetrvávající produkce oocytů u juvenilních i dospělých myší (Johnson et al., 2004). Novější tvrzení bylo prokázáno i další studií, kde byla u neplodných myší po transplantaci neonatální zárodečné

lišty pozorována tvorba nových oocytů (Zou et al., 2009). Johnson et al. (2005) poukazují na potenciální možný zdroj nových zárodečných buněk v kostní dřeni či krevních buňkách. Tato teorie byla v zápětí vyvrácena (Eggan, 2006). Jiné pokusy prokazují jako možný zdroj zárodečných buněk kůži prasete (Dyce et al., 2006; Dyce and Li., 2006) i pankreatické buňky potkana (Danner et al., 2007).

3. 1. 2 Fáze růstu

Působením gonadotropinů (luteinizační hormon LH a folikul stimulační hormon FSH), které jsou secernovány předním lalokem hypofýzy, je zahájena a následně udržována růstová fáze folikulů (Motlík a Fulka, 1976). Skupiny oocytů vstupují do fáze růstu postupně (Wassarman, 1988). V průběhu růstové fáze je u savčích oocytů pozorováno zvětšení sedm až desetkrát (Motlík a Fulka, 1976). Dochází k významným strukturálním změnám týkajících se uspořádání a velikosti buněčného jádra, jádérka, organel, inkluzí, tělísek, granul v cytoplazmě i obalu oocytu. Objem oocytu se zvětší až třista násobně (Wassarman, 1988) – u prasečího opocytu dojde ke změně velikosti z 30 na 120 μm (Motlík a Fulka, 1976).

Již v počátku růstové fáze se tvoří druhá vrstva granulózničních buněk kolem oocytu (Wassarman, 1988; Hunter, 2000) a folikul je tedy nazýván sekundárním (Driancourt, 1991). Utvoření sekundárního folikulu je charakterizováno počátkem vzniku silného, elastického a porézního extracelulárního obalu, obklopujícího plasmatickou membránu oocytu, *zona pellucida* (Wassarman and Mortillo, 1991; Fair et al., 1997; Wassarman, 2008), přes který mohou k oocytu penetrací proniknout tělu vlastní protilátky, enzymy i malé viry (Wassarman, 2008). Funguje jako glykoproteinový obal, chrání oocyt a sehrává důležitou roli při oplození (Yurewicz et al., 1987; Wassarman, 1988). U prasečích oocytů nabývá tento obal síly 8,6 μm (Norberg, 1972). Savčí *zona pellucida* je složena ze tří až čtyř vrstev glykoproteinů (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4), které mohou polymerovat za vzniku dlouhých vláken propojených společnou konstrukční jednotkou, tzv. doménou ZP (Wassarman, 1988; Wassarman and Mortillo, 1991; Rath et al., 2006; Louros et al., 2013). *Zona pellucida* setrvává až do stádia blastocysty, kdy dojde k jejímu rozpadu při uhníždění v děloze (Wassarman, 2008).

V růstové fázi rovněž dochází k rozpadu struktur Golgiho komplexu se separací na jednotky putující k *zona pellucida* ve formě vakuol s glykoproteiny a ve formě budoucích kortikálních granul (Gosden et al., 1997). Kortikální granula mají význam především při procesu oplození a to v zamezení polyspermie, kdy dojde k vylití jejich obsahu granul do perivitelinního prostoru (Wassarman, 1988).

S pokračováním fáze růstu vznikají další vrstvy granulóznic buněk a tím dochází i k růstu folikulu. Následujícím stádiem růstu folikulu je antrální nebo také terciální folikul s již utvořenou dutinou (*antrum folliculi*) (Lüllmann-Rauch, 2012). Ve změnách v terciální folikul je zahrnut vývoj vnitřního obalu *theca folliculi interna*, vnějšího obalu *theca folliculi externa* (Fair, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012), bazální laminy, kumulárních buněk a formace tekutiny antrální dutiny (Norberg, 1972; Driancourt, 1991). Buňky antrálního folikulu mohou být rozděleny do dvou skupin. Buňky *corona radiata*, také zvané kumulární buňky, jsou nezbytné pro přenos zdrojů energie k oocytu v době poklesu glykolytické aktivity (Shimada, 2009). Kumulární buňky lemují oocyt a vytvářejí mezibuněčné komunikační spoje typu gap junction (Eppig, 2001). Gap junctions jsou shluky intercelulárních kanálů umožňujících přímou difúzi iontů a malých molekul mezi sousedícími buňkami (Goodenough and Paul, 2009). Buňky murální pokrývají stěnu folikulu. Intenzivním růstem folikulu je zapříčiněn posun vajíčka z centrální pozice směrem ke straně folikulu - vzniká tzv. vejconosný hrbolek, *cumulus oophorus* (Eppig, 2001). Posledním vývojovým stádiem folikulu je pre-ovulační antrální folikul (Graafův folikul) s plně vyvynutým a vývojově kompetentním oocytem (Rodrigues et al., 2008). Velké množství folikulární tekutiny ve velkém Graafově folikulu umožňuje jeho snadnou viditelnost na povrchu vaječníku (Wassarman, 1988). Plně dorostlý folikul prasete nabývá velikosti i více jak 5 mm (Marchal et al., 2002).

Oocyty Graafových folikulů ovulují a jsou oplození schopná (Mitra and Schulz, 1996). Fáze meiotického dělení oocytu je dokončena pouze u těch oocytů, které byly při ovulaci úspěšně uvolněny z Graafových folikulů a byly oplozeny (Nussbaum et al., 2004).

Specifické uspořádání cytoplazmy oocytu ve fázi růstu je vytvořeno důsledkem tvorby nových organel a genových produktů, přičemž správná replikace organel v ooplazmě, především mitochondrií a jejich DNA, sehrává důležitou úlohu v cytoplasmatické dědičnosti budoucí zygoty (Schatten, 1994). Somatické buňky zachovávají stálost mRNA a iontů ve zvětšujících se oocytech a jsou zdrojem nukleotidů, aminokyselin a fosfolipidů. Počet granulóznic buněk obklopujících oocyt je přímo závislý na rychlosti růstu oocytů (Herlands and Schultz, 1984). Stejně jako se zvětšuje povrch oocytu, vzrůstá i prostup malých molekul klíčových pro další růst oocytu pomocí tzv. gap junction (Cecconi et al., 1996).

Primární oocyt dává během svého dělení v období puberty vzniku sekundárnímu oocytu a zároveň i pólóvému tělísku, které nemá dostatek cytoplasmatického materiálu pro udržení životaschopnosti. Další pólóvé tělísko je vytvořeno při dělení sekundárního oocytu v

době ovulace. Tento přežívající oocyt s haploidním (n) počtem chromozómů je označován jako ootida neboli zralé vajíčko (Wartenberg, 1990).

S velikostí oocytu se zvětšuje i jeho jádro (Hyttel et al., 1999). Stejně jako počet jaderných tělísek je rovněž mnohonásobně navýšen i objem nukleoplazmy. Původní rozptýlená fibrilogramulární struktura jádérka (Wassarman, 1988), díky které je oocyt primárního folikulu neschopen syntézy ribozomů (Hyttel et al., 1999), je ve fázi sekundárního oocytu nahrazena hustou, výhradně fibrilární hmotou (Wassarman, 1988; Hyttel et al., 1999) a dochází k nárůstu transkripční aktivity (Hyttel et al., 1999). Vysoký význam má v této fázi právě intenzivní exprese RNA a proteinů. Dochází k dramatickému nárůstu mitochondrií (Norberg, 1972), struktur Golgiho komplexu i polyribosómů, k čemuž došlo důsledkem zvýšené potřeby proteosyntézy. Vlivem vysoké transkripční aktivity jsou dále chromozómy rozptýleny ve formě euchromatinu (Wassarman, 1988). Endoplazmatickým retikulem (ER) jsou v počáteční růstové fázi kolem jaderného obalu tvořeny cisterny, jejichž počet se vzhledem k rostoucím nárokům na látkovou syntézu v průběhu zvyšuje. Množství cisteren ER se začíná snižovat až se vznikem úzkého perivitelinního prostoru (Fair et al., 1997) mezi plazmatickou membránou a *zona pellucida* pravděpodobně vlivem zrtáty vody po oplození (Vacek, 2006). Některé cisterny mohou být pozorovány v periférii cytoplasmy ve formě pohárkovitých struktur a jiné komunikují s mitochondriemi (Osuchowska, 2006).

Mnohé mitochondrie prodělávají ke konci růstové fáze vakuolizaci, čímž je snížena jejich aktivita a jsou uchovány pro budoucí využití. Zároveň se jedná o ochranu organismu před účinky volných kyslíkových radikálů vznikajících během jejich energetického metabolismu (Norberg, 1972). V závěru fáze růstu také dochází ke shromažďování rozptýlených chromozómů v okolí jádérka, kde dojde k jejich kondenzaci a přeměně na heterochromatin, kterým není umožněno navázání transkripční jednotky. Tím je ukončeno období intenzivní transkripce (Wassarman, 1988).

3. 1. 3 Meiotická kompetence oocytu

Schopnost oocytu znovuzahájit a také dokončit meiotické zrání se nazývá meiotická kompetence (Schramm and Bavister, 1999). Meiotická kompetence oocytu je závislá na mnoha procesech v průběhu celé oogeneze (Marteil et al., 2009), ale i velikosti oocytu a folikulu (Motlík et al., 1984).

Na začátku svého růstu nejsou oocyty schopny zahájit zrání. Takové oocyty, u kterých ještě nedošlo, nebo nejsou schopny podstoupit rozpad zárodečného váčku (GV) a nejsou

schopny zahájit zrání, se označují jako zcela meioticky nekompetentní. V pozdějších fázích růstu by mělo u oocyty dojít k rozpadu buněčné membrány GV s následným vstupem do metafáze I. V tomto kroku ještě není plně zajištěna schopnost oocyty ve vývoji pokračovat a dokončit meiotické zrání. Proto jsou tyto oocyty pouze částečně meioticky kompetentní (Motlík et al, 1984; Schramm and Bavister, 1999). Teprve oocyty schopné zahájit a následně dokončit meiotické zrání jsou plně meioticky kompetentní. Meioticky zcela kompetentních oocytů je ve srovnání s částečně meioticky kompetentními oocyty jen velmi málo (Motlík et al, 1984).

Prasečí oocyty s vnitřím průměrem menším než 90 μm jsou zcela meioticky nekompetentní a nedochází k jejich zrání *in vitro* (Tichovská et al., 2011). Oocyty prasat o velikosti méně než 100 μm z folikulů o velikosti 0,4 – 0,8 mm mají omezenou nebo žádnou meiotickou kompetenci. Oocyty o velikosti 110 μm z folikulů o průměru 1 – 1,5 mm mají částečnou meiotickou kompetenci, jelikož dochází k pozastavení jejich vývoje v metafázi I. Meiotickou kompetenci nabývají prasečí oocyty okolo 14 dní po vytvoření antra ve folikulech větších než 3 mm (Motlík et al. 1984, Morbeck et al. 1992, Hunter, 2000). Zcela meioticky kompetentní jsou prasečí oocyty dosahující velikosti 120 μm (Motlík et al., 1984, Petr et al., 1994; Tichovská et al., 2011).

Za jeden ze znaků meiotické kompetence lze považovat chromatin z kondenzovaný do hustého prstence okolo jádra (Wickramasinghe et al., 1991). Známkou nabytí meiotické kompetence oocyty je u mnoha savců také vytvoření antra ve folikulu (Motlík et al. 1984, Morbeck et al. 1992, Hunter, 2000). Rovněž podle fosforylace centrozomu a délky mikrotubulů je možné předpokládat schopnost dokončení meiozy, kdy krátké mikrotubuly a fosforylovaný centrozom poukazují na meiotickou kompetenci oocyty (Albertini, 1992).

Na biochemické úrovni je dosažení plné meiotické kompetence charakterizováno hromaděním neaktivního komplexu p34cdc2/cyklin B označovaného jako pre-MPF. Po vytvoření folikulárního antra již k hromaděni pre-MPF nedochází a vyvíjí se schopnost tento komplex aktivovat (Kanayama et al., 2002).

Oocyty získané od prepubertálních prasnic vykazují nižší meiotickou kompetenci, než bylo pozorováno u oocytů od cyklujících prasnic. Množství, morfologická kvalita i meiotická kompetence se u prasečích oocytů mění v závislosti na stádiu folikulárního vývoje. Období pozdní luteální a časně folikulární fáze ve srovnání s ostatními stádii estrálního cyklu lze pro získávání normálních a meioticky kompetentních oocytů považovat za nejvhodnější (Machatková et al., 2008).

3. 1. 4 Fáze zrání

Meiotickým zráním je označena konečná fáze vývoje oocyty a jeho transformace v neoplozené vajíčko s haploidním počtem chromozómů (n) neboli přechod ze stádia *diplojene* profáze I do metafáze II (Motlík a Fulka, 1976; Wassarman, 1988). Procesy cytoplazmatického a jaderného zrání jsou koordinovány tak, aby došlo k jejich dokončení současně (Hunter, 2000). Při jaderném zráním dochází především ke změnám chromatinu, na čemž je úspěšnost zrání oocyty závislá (Ferreira et al., 2009; Marteil et al., 2009).

Počátek fáze zrání navazuje na ukončené stádium *diktyotene*, kdy je pozorován rozpad zárodečného váčku (Germinal vesicle break down, GVBD), což je první jasně viditelnou známkou znovuzahájení meiózy (Brunet and Maro, 2005). GVBD je možné rozdělit do pěti stádií (Sun et al., 2001) seřazených podle intenzity kondenzace chromatinu a stupně rozpadu jaderného obalu (Tan et al., 2009). Viditelné jádro i jaderná membrána (Tan et al., 2009) jsou spolu s rozptýleným chromatinem po celé jaderné oblasti typické pro počáteční stupeň GV0 (Guthrie and Garrett, 2000; Sun et al., 2001; Tan et al., 2009). V GV0 rovněž dochází k nepatrnému vlnění membrány, které postupně nabývá na intenzitě (Lucas et al., 2002). V následujícím GV1 stádiu dochází k formaci kondenzovaného chromatinu do tvaru podkovy, nebo prstence (Guthrie and Garrett, 2000; Sun et al., 2001; Tan et al., 2009). Výskyt několika menších shluků chromatinu v blízkosti jaderné membrány je příznačný pro GV2, přičemž v GV3 nárůst shluků chromatinu a vláken pokračuje (Lucas et al., 2002). Ty jsou následně rozptýleny po celé nukleoplazmě a je tvořen základ filamentární sítě (Tan et al., 2009). V posledním stadiu GVBD přestává být jádro i jaderná membrána patrné (Lucas et al., 2002; Tan et al., 2009) a nachází se pouze v podobě dubletů spojených s endoplazmatickým retikulem, které jsou následně využívány k opětovnému vytvoření prvojaderné a jaderné membrány (Wassarman, 1988). U prasat je tento celý děj pozorován po dobu šestnácti až osmnácti hodin (Motlík et al., 1984).

Po GVBD je vytvořeno dělicí vřetenko metafáze I (Brunet and Maro, 2005). S formací dělicího vřetenka dojde ke kmitání chromozómů kolem metafázní roviny, dokud nenastane nástup anafáze I (Schuh and Ellenberg, 2007; Brunet et al., 1999). K tomu je také zapotřebí, aby byly mikrotubuly korektně připojeny na chromozomy (Brunet and Maro, 2005). Metafáze I je u oocytů prasat kultivovaných *in vivo* ukončena po dvaceti hodinách a *in vitro* přibližně po šesti až osmi hodinách (Motlík et al., 1984). V anafázi I dochází k rozdělení a rozchodu chromozómů, které pokračuje i v telofázi I vydělením prvního pólového tělíska. Oocyt tím nabývá haploidního počtu chromozómů (Eppig, 1991). Po dokončení prvního cyklu

meiózy vstupují oocyty přímo do druhého meiotického dělení (meiózy II) a opětovně je zastaven jejich vývoj, tentokrát v metafázi II (Brunet and Maro, 2005), kdy by měl být oocyt připravený k oplození a tím zdárnému ukončení meiotického dělení (Marteil et al., 2009). Metafáze II *in vitro* nastává u prasat po čtyřiceti až čtyřiceti osmi hodinách (Motlík a Fulka, 1976). K dalšímu zahájení meiózy dochází až po penetraci spermie, nebo po partenogenetické aktivaci (Wassarman, 1988).

Výraznými změnami prochází Golgiho aparát, ribozomy, mitochondrie i endoplazmatické retikulum (ER), které jsou podmíněny dynamikou složek cytoskeletu umožňujících jejich řízený pohyb v cytoplazmě (Fereira et al., 2009). Pohyb mitochondrií je spjat s potřebou energie ve formě ATP, důsledkem čehož se na počátku zrání fáze shlukují okolo zárodečného váčku v prstencové formě. S koncem metafáze I jsou mitochondrie dočasně rozptýleny a až v metafázi II je opět pozorováno soustředění mitochondrií kolem chromatinu (Fereira et al., 2009). Tvorba mitochondriální ATP však po vydělení prvního pólového tělíska ztrácí na své původní intenzitě. Tento pokles je přisuzován vzniku volných radikálů při mitochondriální syntéze ATP, jejichž zvýšené množství by mohlo být v počátku embryonálního stádia plodu letální (Marteil et al., 2009).

Při vývoji oocyty jsou základní zásobárnou energie inkluze glykogenu či lipidů ve formě tukových kapének (Osuchowska, 2006; Marteil et al., 2009). Tyto velké tukové kapénky (až 4 μm) jsou u prasat označovány jako žlutkové inkluze a byly zaznamenány v blízkosti mitochondriálních skupinek (Osuchowska, 2006). Změna v jejich rozdělení v okolí meiotického vřeténka byla u prasat pozorována v metafázi II (Marteil et al., 2009).

ER je situováno poblíž centrální oblasti cytoplazmy (Jaffe and Terasaki, 1994) a v průběhu procesu zrání se přemísťuje v podobě kortikálních granul na periferii oocyty. Slouží jako úložiště kationtů vápníku uvolněných při penetraci oocyty spermii, čímž je spuštěna kortikální reakce, díky které dojde k zabránění polyspermie (FitzHarris et al., 2003).

Cisterny Golgiho komplexu jsou taktéž soustředěny spíše v okolí jádra a zde dochází v průběhu zrání k distribuci do blízkosti plazmatické membrány v podobě kortikálních granul (Payne and Schatten, 2003). Kortikální granula jsou v průběhu zrání přemístěna do korové oblasti oocyty, jelikož sehrávají klíčovou roli v kortikální reakci. Ve zralém oocyty prasete jsou tato granula uložena v podobě souvislé vrstvy těsně sousedící se *zona pellucida* (Marteil et al., 2009). Nárůst tvorby kortikálních granul je pozorován v metafázi I, zatímco v průběhu metafáze II již ke zvýšení počtu nedochází (Wang et al., 1997).

Do procesu zrání jsou zapojeny i prvky cytoskeletu - mikrotubuly a mikrofilamenta. Mikrotubuly jsou významná především při rozdělení větších organel a chromozomů meiotického vřetenka, zatímco mikrofilamenta s jemnější strukturou slouží k upřesnění polohy chromozomů a přerozdělení menších organel (např. kortikálních granul a cisteren endoplazmatického retikula) (Marteil et al., 2009). K jejich rozmístění v periferní oblasti oocyty dochází v době mezi GVBD a anafází I (Ferreira et al., 2009). Mikrotubuly meiotického vřetenka prasete jsou patrné až při GVBD. V místě napojení na centromeru příslušného chromozomu jsou mikrotubuly zakončeny třívrstevnými proteinovými strukturami neboli kinetochory (Marteil et al., 2009). V tomto stádiu je vytvořeno vřetenko soudkovitého tvaru, které je v metafázi I díky diploidnímu ($2n$) počtu chromozomů větší než vřetenko v metafázi II, kdy je již počet chromozomů haploidní. Oddělení chromozomů a prodlužování vřetenka je uskutečněno v anafázi I. V telofázi I je činností mikrotubulů následně jedna sada chromozomů vytlačena mimo obsah buňky, dojde ke vzniku prvního pólového tělíska a nastává interkinéze. Interkinéze je doba přechodu mezi prvním a druhým meiotickým dělením neboli meiózou I a meiózou II. Dělicí vřetenko meiózy I je degradováno a opět dochází ke kondenzaci chromatinu. Interfáze je vynechána (Ferreira et al., 2009). U prasat vycházejí mikrotubuly přímo z kůry oocyty, ne z centromer, a jejich rozložení je uskutečněno až na konci fáze zrání (Marteil et al., 2009). Pokud ve fázi meiózy II nedojde k aktivaci oplození, oocyt zaniká (Sun and Nagai, 2003). V průběhu jednoho ovariačního cyklu je připraveno k oplození vždy několik folikulů (Cortvrindt et al., 1997).

Již zmíněné kumulární buňky hrají klíčovou roli i v procesu uvolnění oocyty z Graafova folikulu a následném oplození. Jsou rovněž zodpovědné za zahájení imunitních pochodů zabraňujících případné bakteriální infekci oocyty (Shimada, 2009).

3. 2 Hormonální řízení folikulogeneze a oogeneze

Přerušenu meiózu *in vivo* znovu zahajuje vlna LH, která je uvolněna po odstranění jednoho či více faktorů (například inhibitoru zrání oocytů) (Stojkovic et al., 1999, Fan et al., 2002). K dalšímu vývoji folikulu i oocyty je nezbytná dostupnost regulačních gonadotropinů a dalších endokrinních faktorů. Dochází tudíž k vývoji krevních kapilár prorůstajících mezi vnějším a vnitřním obalem folikulu (Van den Hurk et al., 2000). Na buňkách *theca folliculi interna* jsou formovány receptory pro LH a na buňkách *theca folliculi externa* jsou formovány receptory pro FSH a estrogény. Pod vlivem LH jsou pak buňkami *theca folliculi interna* produkovány androgeny, které jsou vlivem FSH konvertovány granulózními buňkami na

estrogeny. U sekundárního folikulu nedochází k produkci estrogenů, jelikož není schopen exprese enzymu aromatázy potřebného k přeměně androgenů na estrogenu. Dochází k přípravě na vznik folikulu zcela závislého na hormonálním působení. Pod vlivem estrogenů dochází k růstu a dělení granulózniých buněk, které jsou za spolupůsobení FSH a estrogenů stimulovány k tvorbě sekretů způsobujících tvorbu dutiny folikulu a podněcujících tvorbu antrální tekutiny (Wassarman, 1988). FSH je rovněž stimulována tvorba receptorů pro LH na granulózniých buňkách. Vzestup výdeje LH je pozorován okolo dvacetičtyř hodin před ovulací a je rozhodující pro ovulaci i následné utváření žlutého tělíska z Graafova folikulu a redukci počtu FSH receptorů na granulózniých buňkách, čímž je snížena produkce estrogenů (Reece, 1998).

3. 3 Regulátory meiotického zrání

Přechod z jedné fáze buněčného cyklu do fáze další musí být uskutečněn teprve po úplném dokončení všech procesů fáze předchozí (Alberts et al., 2008). Za tuto regulaci buněčného cyklu oogeneze odpovídá mnoho regulačních látek (Alberts et al., 2008; Tůmová et al., 2013) enzymové i neenzymové povahy. Obecně je možné faktory rozdělit na takové, které dělení buňky urychlují, a faktory, které dělení buňky zpomalují, či zcela zastavují (Alberts et al., 2008). Zde je popsáno několik nejvýznamnějších faktorů zapojujících se do regulace meiotického zrání:

3. 3. 1 MPF – Metaphase Promoting Factor

Metaphase promoting factor (MPF), řazen mezi protein kinázy (Nurse, 1990), patří k univerzálním buněčným regulátorům (Stojkovic et al., 1999) umožňujícím vstup do metafáze (Clarke, 1995). Je klíčovým faktorem při procesu formování funkčního dělicího vřeténka ve fázi zrání (Hunter, 2000) a je velmi důležitý při iniciaci segregace chromozomů (King et al., 1996). Rovněž je během kondenzace chromozomů zapojen do procesu reorganizace intermediálních filament a přeskupení mikrofilament (Stojkovic et al., 1999).

MPF je složen z regulační a katalytické podjednotky (Nurse, 1990). Katalytická podjednotka je tvořena serin/threonin protein kinázou p34^{cdc2} (Fulka et al., 1991) také zvanou CDK 1 (Cyclin Dependent Kinase 1) (Gautier et al., 1989). Regulační podjednotka je tvořena cyklinem B (Dunphy et al., 1988, Gautier and Maller 1988). Nedostatek exprimovaného cyklinu B byl pozorován u oocytů zcela postrádajících meiotickou kompetenci (Blanco and Montoya, 2011). V průběhu meiózy je koncentrace katalytických podjednotek stále stejná,

avšak koncentrace regulačních podjednotek je ubiquitin-dependentním systémem výrazně snížena a to v období mezi metafází I a metafází II (Alberts et al., 1998). Součástí komplexu MPF je i GWL - kináza Greatwall (Hara et al., 2012; Dupre et al., 2013) vyvolávající procesy vedoucí k fosforylaci a aktivaci cdc25, čímž je nezbytná pro vstup a udržení M fáze (Zhao et al., 2008).

Spojením obou podjednotek je vytvořen pouze neaktivní komplex pre-MPF (Gautier et al., 1991, de Vantéry et al., 1997), jenž je přítomen v růstové fázi oocytů (Murray and Kirschner, 1989). Aktivita MPF je ovlivněna hladinou fosforylace a aktivní syntézy proteinů v buňce (Procházka et al., 1989, Chen et al., 2000). Fosforylací cdc2 na tyrosinu 15 a threoninu 14 (Gautier et al., 1991; Clarke, 1995; Touny and Banerjee, 2006) je pre-MPF držen v neaktivní formě (Clarke, 1995; Fulka et al., 1991; Marlovits et al., 1998). K aktivaci MPF je nutná nejen defosforylace dvou zmíněných center CDC25 fosfátázou, ale i fosforylace threoninu 161 kinázou CDK (CAK, cdc-aktivační kináza), což je inhibováno protein fosfátázou typ-2A a zároveň stimulováno MPF jakožto součástí pozitivní zpětné vazby procesu (Clarke, 1995). Po konečné aktivaci komplexu MPF (Brunet and Maro, 2005) dochází v oocytu ke znovuzahájení meiózy (Motlík and Kubelka, 1990).

V metafázi prvního meiotického dělení, při rozpadu zárodečného váčku, je vlivem působení cytostatického faktoru (CSF) pozorována vzrůstající aktivita MPF (Murray and Kirschner, 1989). Vrcholu aktivity MPF je dosaženo v metafázi I (Kikuchi et al., 1995). Ta však při přechodu z metafáze do anafáze klesá (Kishimoto and Kariatani, 1976; Motlík and Kubelka 1990; Mattiloli et al., 1991), jelikož je vlivem APC (Anaphase Promoting Complex) (King et al., 1996) umožněno připojení ubiquitinu na cyklin B. Ten je následně rozpoznán a degradován proteazomem (Glotzer et al., 1991; Alberts et al., 1998). K opětovnému navýšení aktivity MPF dochází v období metafáze II (Kikuchi et al., 1995).

3. 3. 2 MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase

MAP kináza, řazena k serin/threonin proteinům (Ferrell et al., 1991; Haccard et al., 1993), zastává důležitou úlohu při přenosu extracelulárního signálu ve vnitřním prostředí buňky. Jsou proto označovány také jako extracelulárně regulované kinázy (ERK) (Haccard et al., 1993). MAPK je součástí regulace zrací fáze oocytů (Fan and Sun, 2004), kdy se podílí na přenosu signálu indikujícího začátek zrání z cytoplazmy do jádra (Inoue et al., 1998). V cytoplazmě prasečích oocytů v G2 fázi je MAPK přítomna pouze v neaktivní formě. Při přechodu z G2 do M fáze je před GVBD část MAPK soustředěna do zárodečného váčku.

Přenos signálu do jádra má významný vliv na chování jaderné membrány, jelikož injekční aplikací MAPK do zárodečného váčku byl rozpad urychlen, zatímco po aplikaci do cytoplazmy nebyla pozorována žádná změna (Stojkovic et al., 1999).

Aktivace MAP kinázy je druhově specifická a dochází k ní podobně jako u MPF na treoninových a serinových zbytcích (Verlhac et al., 1994). U prasete k aktivaci dochází ještě před GVBD (Josefsberg et al., 2003). Někteří autoři uvádějí, že aktivace MAP kinázy je spojená s prvotní aktivací MPF (Inoue et al, 1995; Lee et al, 2000), avšak existují i pozdější názory tvrdící opak (Inoue et al, 1998; Villa-Diaz and Miyano, 2004). Za základní látku aktivující MAPK oocyty je také považována p90rsk (Fan and Sun, 2004). MAP kináza oproti MPF vykazuje vysokou aktivitu v celé fázi zrání, kdy dojde k poklesu až po oplození či po partenogenetické aktivaci (Sun et al., 2001, Zhang et al., 2001).

U prasete nebyl prokázán negativní vliv narušení aktivity MAP kináz na zahájení meiózy (Josefsberg et al., 2003), stejně jako na rozpad zárodečného váčku, který probíhá i při znemožnění nástupu aktivity MAP kináz pomocí inhibitoru MEK (Tong et al., 2003). I přesto se aktivní MAP kináza významně podílí na urychlení rozpadu zárodečného váčku prasat (Josefsberg et al., 2003). Přítomnost MAP kinázy je důležitá při regulaci dynamiky mikrotubulů (de Vantéry et al., 1997) a je jí ovlivněna i velikost a extruze prvního pólového tělíska (Choi et al., 1996). MAPK taktéž zaujímá důležitou roli v metafázi II (Villa-Diaz and Miyano, 2004).

3. 3. 3 CSF – Cytostatic factor

Oocyty zastavené v metafázi II jsou ve druhém meiotickém bloku zastaveny pomocí skupiny molekul nazývané cytotatický faktor (CSF). CSF je přítomen v cytoplasmě ovulovaných oocytů. Brání zde degradaci cyklinu B, který je nutný pro udržení aktivity MPF (Stojkovic et al., 1999). Byly popsány enzymy Mos (Colledge et al., 1994; Hashimoto et al, 1994), Cdk2 (Gabrieli et al 1993), Emi (Tunquist and Maller, 2003), díky kterým je zabráněn vývoj z metafáze II do anafáze II (Masui and Markert 1971; Clarke et al., 1988) inhibicí degradace cyklinu B. CSF je zapojen i při procesu oplození (Schmidt et al., 2006).

Mos, serin/threonin kináza, je aktivní katalytická součást (Watanabe et al., 1989, Yew et al., 1992), která je produktem proto-onkogenu c-mos. Jedná se o nepostradatelnou součást metafáze II i procesu aktivace MPF (Hunt, 1992; Yew et al., 1992). CSF je inhibována činností mikrotubulárních motorů. Tím je udrženo neporušené dělicí vřeténko a pomocí CSF

dochází k zadržení oocyty v metafázi II (Shiina et al., 1992). Po degradaci CSF přechází oocyt do anafáze II a meiotický vývoj pokračuje (Jones, 2005).

Mezi další molekuly CSF patří i SAC (Spindle Assembly Checkpoint) proteiny. Ty jsou důležité pro zastavení buněk v metafázi II pomocí inhibice Anaphase Promoting komplexu (APC). Po aktivaci tohoto komplexu dochází k degradaci cyklinu B a výstupu z druhého meiotického bloku (Sagata, 1997).

3. 3. 4 Vápník

K funkci iontů vápníku patří přenášení intracelulárních signálů, regulace fyziologických procesů, membránová excitabilita, buněčný a mitochondriální metabolismus, proteosyntéza, průběh buněčného cyklu a apoptóza. Podstatná role vápníku je zaznamenána i v průběhu meiotického zrání (Homa et al., 1993; Takeo et al., 2010) a oplození oocytů (Yanagimachi, 1981; Miyazaki, 1991). Nejvíce iontů vápníků bylo v prasečích oocytech nalezeno v karyoplazmě, vakuolách, mitochondriích a na povrchu lipidových granul (Clapham, 1995; Petr et al., 2002). Vápník je do cytosolu transportován především přes 2 signální kaskády – dráhu využívající inositol 1,4,5 trifosfátové receptory (IP₃R) a dráhu využívající ryanodinové receptory (RyR) (Petr et al., 2002). Do lumenu zásobních organel se ionty vápníku z cytoplasmy dostávají pomocí ATPázových SERCA pump (Pozzan et al., 1994). Vápenaté ionty mají nezastupitelnou roli především v časně fázi výstupu z bloku v profázi I (Wassermann, 1988).

Ve všech eukaryotických buňkách je přítomen protein vázající na sebe vápník kalmodulin (CaM) (Tunquist and Maller, 2003), který se podílí na regulaci mnoha různých cílových enzymů, čímž ovlivňuje mnohé buněčné funkce. Kalmodulinem jsou zprostředkovány procesy jako zánět, imunitní reakce, apoptóza a mnoho dalších (Cheung, 1980). Kalmodulin dependentní kináza CaMK II má ve vývoji oocytů nezastupitelnou roli, jelikož se podílí na iniciaci degradace cyklinu B, jenž tvoří součást MPF (Lorca et al., 1993). Schopnost uvolnit vápník z vnitrobuněčných zásob je vyvinuta v průběhu zrání oocyty a je po oplození oocyty nepostradatelná k zahájení vývoje (Carroll et al., 1994; Mehlmann and Kline, 1994; Knott et al., 2006).

3. 3. 5 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) patří mezi plynné mediátory zvané gasotransmitery, které snadno prostupují přes buněčnou membránu (Wang, 2002). V mnoha fyziologických i patologických

pochodech je NO zapojen díky schopnosti regulace intracelulárních i extracelulárních procesů (Dixit and Parvizi, 2001; Bu et al., 2003). V nízké koncentraci má jako vnitrobuněčný posel v organismu nepostradatelnou funkci, avšak ve vysoké koncentraci může NO způsobit nevratné škody – např. buněčnou smrt oocyty (Bu et al., 2003). Vlivem krátkého poločasu rozpadu (pět až deset vteřin) je jeho působení jen lokální (Alberts et al., 1998).

NO se jako neurotransmitter podílí na šíření nervového vzruchu v organismu. Jeho úloha dále spočívá ve vazodilataci krevních cév (Aberts et al., 1998; Bian et al., 2012), procesu proliferace a diferenciaci buněk (Hattori et al., 2000) a apoptóze (Stefanelli et al., 1999). Podílí se také na regulaci mnoha procesů reprodukce jako navozování ovulace, aktivity pohlavních hormonů, prokrvení pohlavních orgánů, vývoj folikulu i oocyty a nidace embrya (Jablonka-Shariff and Olson, 2000). NO pravděpodobně hraje klíčovou roli v regulaci signalizace řídící přechod mezi metafází I a metafází II, stejně tak i přerušení meiozy v metafázi II (Jablonka-Shariff a Olson, 1998).

V savčích buňkách je oxid dusnatý syntetizován enzymem NO-syntázou (NOS) (Nathan and Xie, 1994), jejíž existence byla poprvé prokázána roku 1989 a dnes jsou známy celkem tři NOS izoformy (Janssens et al., 1992):

- Nervová NO-syntáza (nNOS, NOS1, NOS-I) má hlavní místo výskytu v nervové tkáni mozku (Bredt et al., 1990). Její přítomnost byla popsána v oocytech prasete (Kim et al., 2005) a později, během meiotického zrání *in vitro*, i v kumulárních buňkách (Chmelíková et al., 2010).

- Indukovatelná NO-syntáza (iNOS, NOS2, NOS-II) (Hattori et al., 2000) je produkována řadou buněk, včetně savčích folikulů a je schopná dlouhodobé, stálé syntézy NO (Jablonka-Shariff a Olson, 1997) ve větším množství (Bian et al., 2012). Aktivita tohoto typu syntázy je významná především pro vývoj terciálního folikulu, ovulaci a progresi žlutého tělíska (Tao et al., 2004). Součástí aktivity iNOS je navázání kalmodulinu, proto je označována jako Ca^{2+} dependentní (Rosselli et al., 1998; Alderson, 2001). Inhibicí iNOS-syntázy dojde ke snížení hladiny NO, v důsledku čehož je spuštěna kaskáda dějů, a výsledkem je pokračování zrání oocyty z fáze *diplotene* (Pandey and Chaube, 2015).

- Endoteliální NO-syntáza (eNOS) byla nalezena v buňkách endotelia (Alderson, 2001), savčích folikulech (Jablonka-Shariff and Olson, 1997), Leydigových a Sertolihových buňkách, ve spermatidách (Ambrosino et al., 2003), kumulárních buňkách, oocytech (Tao et al., 2004; Chmelíková et al., 2010) i buňkách endoteliálních (Tao et al., 2004). eNOS je schopna pouze krátkodobé syntézy menšího množství NO. eNOS je spojena s vývojem

oocyty, folikulu a progresí i regresí žlutého tělíska (Tao et al., 2004). eNOS je stejně jako izoforma iNOS Ca^{2+} dependentní (Janssens et al., 1992).

3. 3. 6 Sirovodík

Stejně jako NO je sirovodík (H_2S) řazen mezi buněčné signální gasotransmitery. Prekurzorem endogenního sirovodíku je aminokyselina L-cystein. Syntéza endogenního H_2S je katalyzována třemi enzymy (Kamoun, 2004). 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (MPST) je H_2S syntetizován v mitochondriích i v cytosolu. Cystathionine beta-syntáza (CBS) probíhá ve vaječnicích s největší expresí ve folikulárních buňkách ve všech stádiích folikulárního vývoje. Genovou inhibicí CBS byla způsobena inhibice zrací fáze oocyty (Zhu et al., 2011). Třetím enzymem umožňující produkci sulfanu je cystathionin gama-lyáza (CSE). Aktivita tohoto enzymu byla prokázána především v cévní soustavě (Zhao et al., 2001). Působení H_2S bylo prokázáno nejen na zrání oocyty, ale i na průběh a délku estrálního cyklu, růst folikulů a plodnost samic i samců (Zhu et al., 2011).

3. 3. 7 Cyklické nukleotidy

Cyklické nukleotidy, především cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), jsou významnými regulátory meiotického zrání (Norris et al., 2009). Inhibitor fosfodiesterázy (která štěpí cAMP), dibutyrylcyklický adenosinmonofosfát (dbcAMP), aktivátor adenyl cyklázy (katalyzuje vznik cAMP z ATP) či isobutyl metylxantin (IBMX) mohou zablockovat rozpad zárodečného váčku (Wassarman, 1988), kdy pravděpodobně dochází k působení cAMP přes cAMP dependentní protein kinázu (Sirard et al., 2001).

K zastavení meiózy dochází fosforylací určitých proteinů oocyty protein kiazou, avšak nízkou úrovní cAMP lze zapříčinit jejich defosforylací a tím obnovu procesu meiotického zrání (Wassarman, 1988). Ke snížení hladiny cAMP v oocyty může dojít zvýšením hydrolytické degradace oocyty fosfodiesterázou nebo pozastavením přenosu cAMP z granulárních buněk přes gap junction (Sengoku et al., 2001). Ke znovuzahájení meiotického zrání v oocyty je však nutné nejprve zvýšení a až poté snížení intracelulární hladiny cAMP. Oba děje jsou odezvou na preovulační vlnu LH (Dekel et al., 1988).

Ačkoli je funkce cAMP při regulaci meiotického zrání oocyty poměrně dobře známa, úloha cGMP zcela objasněna není. Pokusy bylo zjištěno, že hladina cGMP je u preovulačních oocyty ovlivnitelná LH a prostaglandinem, kdy po stimulaci oocyty *in vivo* došlo k jejímu

výraznému poklesu. Snížení hladiny cGMP je však závislé na aktivaci epidermálních růstových faktorů. cGMP je v oocyty zapojen do zachování blokace meiotického zrání. cAMP a cGMP spolupracují při řízení zastavení meiotického zrání prostřednictvím regulace PDE3A (Vaccari et al., 2009).

3. 3. 8 PKC - Protein kináza C

Protein kináza C (PKC) z rodiny lipid-dependentních serin/threonin kináz má hlavní roli při mnoha procesech - modulování buněčné membrány, přenášení imunitních odpovědí, regulace transkripce, buněčný růst aj. (Nishizuka, 1992; Dekker and Parker, 1994). PKC má přinejmenším 12 izoform (Way et al., 2000), které je možné rozdělit do tří podtříd: klasické, nové a atypické (Fan et al., 2002). Přesná funkce všech izoform v oocyty však zatím není objasněna (Viveiros et al., 2003). Izoformy PKC α , $\beta 1$ a γ (především však α -izoforma), označované jako klasické, se podílejí na regulaci funkce jádra a exocytóze kortikálních granul u oocytů prasete (Fan et al., 2002). Mezi nové izoformy patří například δ , ϵ , θ , η a mezi atypické je řazena například izoforma λ (Überall et al., 1997). U myši byla přítomnost izoform α , $\beta 1$, δ , a γ prokázána v kumulárních buňkách i oocyty, ale izoforma ϵ byla detekována pouze v kumulárních buňkách (Downs et al., 2001). Přímou aktivací PKC je zrání oocytů potlačeno, zatímco stimulací oocytů bez kumulárních buněk je vyvolán podnět k pokračování meiózy (Downs et al., 2001). Aktivita PKC byla zaznamenána již v profázi I s nárůstem během meiotického zrání a vrcholem v metafázi I (MI). Použitím PKC inhibitoru bisindolylmaleimide I (BIM) u oocytů v pozdní fázi MI byla přechodně snížena aktivita MPF a tím podpořen postup do metafáze II (MII). Aktivita MAPK ale zůstala během přechodu z MI do MII zvýšená. PKC- δ , řazena mezi nové izoformy (Viveiros et al., 2003), je spojena s dělicím vřeténkem a chromozómy ve fázi MII. PKC se účastní regulačních mechanismů zpožďujících vstup do anafáze I. Její inhibicí je spuštěn předčasný vstup do interfáze. Ztráta regulační kontroly aktivity PKC v průběhu zrání oocyty narušuje kritický přechod z MI do MII, což vede k časnému ukončení meiózy (Viveiros et al., 2001).

3. 3. 9 Fosfátázy - kalcineurin

Fosfátázy jsou enzymy schopné defosforylovat fosfátové ionty a molekuly s volnou hydroxylovou skupinou. Jejich největší význam je regulace mitotického i meiotického buněčného cyklu (Mochida et al., 2010; Domingo-Sananes et al., 2011; Mochida and Hunt, 2012). Pro správný průběh meiotického zrání oocyty je důležitá současná spolupráce mnoha

protein kináz a protein fosfatáz (Swain et al., 2003; Adhikari et al., 2012). K této skupině patří kalcineurin (také znám jako fosfatáza 2B) z rodiny serin/threonin fosfatáz (Klee et al., 1988; Kincaid, 1993; Rusnak and Mertz, 2000; Sullivan and Rubin, 2002), který má nepostradatelnou roli při převodu vápníkových iontů na vnitrobuněčné procesy (Chang, 2007). Serin/threonin fosfatázy jsou podle biochemických parametrů děleny na PP1, PP2A, PP2B nebo kalcineurin, PP4, PP5, PP6 a PP7 (Cohen, 2002). Narozdíl od PP1 a PP2A (Rime and Ozon, 1990) je úloha ostatních serin/threonin fosfatáz při regulaci meiotického zrání oocytů savců jen málo prozkoumána (Takeo et al., 2010).

Kalcineurin je heterodimer složený z katalytické a regulační podjednotky (Klee et al., 1998; Rusnak and Mertz, 2000). Katalytická (A) podjednotka je u savců přítomna ve třech izoformách (A- α , A- β , A- γ) a obsahuje jedno místo pro navázání kalmodulinu. Regulační (B) podjednotka se vyskytuje pouze ve dvou izoformách (B1 a B2) (Klee et al., 1998).

3.3.9.1 Aktivita kalcineurinu

Aktivita kalcineurinu je zacílena na regulaci proteinů prostřednictvím defosforylace (Jesus and Haccard, 2007). Kalcineurin má poměrně úzkou specifitu substrátů (Klee et al., 1988), jejichž spolupůsobení je však nezbytné k správnému průběhu mnoha biologických funkcí (Kingsbury and Cunningham, 2000; Abbasi et al., 2006).

Přesný mechanismus aktivace kalcineurinu zatím nebyl plně objasněn (Stemmer and Klee, 1994; Takeo et al., 2010). Pro aktivaci kalcineurinu jsou nezbytné ionty železa a zinku (Yu et al., 1995; Klee et al., 1998), ale především ionty vápníku a kalmodulin. Tento proces tedy vyžaduje zvýšenou koncentraci vápenatých iontů (Stemmer and Klee, 1994; Sobotková a Bartůňková, 2008). Ionty vápníku jsou vázány na čtyři vazebná místa. Jedno z těchto míst vykazuje silnou afinitu k vápníku, zatímco ostatní tři vykazují afinitu slabší (Sobotková a Bartůňková, 2008). Při obsahu Ca^{2+} nižším než 10^{-7}M je vápník navázán pouze na místa s vysokou afinitou a, ačkoliv podjednotky zůstanou spojeny, enzym postrádá aktivitu. Navázání Ca^{2+} na podjednotku B má pravděpodobně pouze strukturální nikoliv řídicí význam (Stemmer and Klee, 1994).

Aktivita kalcineurinu je řízena mnoha regulátory. Jedním z nich je Sarah (Sra) z rodiny RCAN. Proteiny RCAN jsou zpravidla pozitivními regulátory kalcineurinu (Takeo et al., 2010). Dalším významným regulátorem, taktéž z rodiny RCAN (Porta et al., 2007), je kofaktor modulatory calcineurin-interacting protein (MCIP) s prokázaným pozitivním i negativním vlivem na kalcineurin. MCIP je kódován geny *mcip1* a *mcip2*. Fibroblasty myších embryí postrádající oba tyto geny vykazují narušenou aktivaci jaderného faktoru aktivujícího

T-buňky - NFAT (Sanna et al., 2006). MCIP je tedy nezbytný pro účinné navázání kalcineurinu a NFAT (Abbasi et al., 2006; Sanna et al., 2006). Deficit *mcip1/2* má u myši stejný fenotypový projev (dramatické poškození svalových vláken s pomalou oxidací, poškození v podobě srdeční hypertrofie, poškození pracovní paměti a zvýšená lokomoční aktivita) jako deficit kalcineurinu A β (Sanna et al., 2006). Prostřednictvím reverzibilní fosforylace MICP se na aktivaci kalcineurinu zásadně podílí i MAPK (Abbasi et al., 2006).

Existují inhibitory kalcineurinu z řady insekticidů – pyretroidů jako je cypermetrin, deltametrin a fenvalerát (Zhao et al., 2008) i látky nepyretroidní povahy jako je cyklosporin A a hymenistatin I (Cebrat et al., 1996). Za nejvýznamnější inhibitor kalcineurinu je však polypeptid cyklosporin A (Sobotková a Bartůňková, 2008), který je spolu s dalším inhibitorem kalcineurinu FK506 řazen mezi imunosupresivní léky (Liu et al., 1991; Rusnak and Mertz, 2000) užívané při léčbě autoimunitních onemocnění i při transplantacích orgánů. Cyklosporin A, izolovaný z plísně *Cylindrocarpon lucidum* a *Tolyypocladium inflatum*, a FK506, izolovaný z půdní bakterie *Streptomyces tsukubaensis* (Siemion et al., 1999), blokují defosforylaci a jaderný transport transkripčního faktoru NFAT (Liu et al., 1991; Ruff and Leach, 1995; Shaw et al., 1995).

3.3.9.2 Výskyt kalcineurinu

Přítomnost kalcineurinu je zaznamenána ve velkém množství organismů od kvasinek po savce (Kincaid, 1993; Sanna et al., 2006). Izoformy A- α , A- β , vážící se na regulační podjednotku B1, byly detekovány ve všech tkáních (Molkentin, 2004) a izoforma A- γ , vážící se na regulační podjednotku B2, byla u savců nalezena v tkáni mozku, varlat (Molkentin, 2004), srdce i v kosterní svalovině (Depreux et al., 2010). Kalcineurin byl pozorován v rostoucím prasečím oocytu, v plně dorostlém oocytu i v průběhu meiotického zrání oocytu *in vitro*. Podjednotka A a podjednotka B byly především lokalizovány v kůře všech oocytů prasete. Lokalizace jednotlivých podjednotek se však během meiotického zrání mění (Tůmová et al., 2013). V jádře dochází během růstu k expresi příslušných mRNA (pro všechny izoformy kalcineurinu), které jsou zde dočasně deponovány, nebo rovnou využity pro zajištění specifických potřeb dané buňky (Rusnak and Mertz, 2000). mRNA izoform A β , A γ a B2 byla nalezena v oocytech a mRNA izoform A β , A γ , B1 a B2 byla nalezena v kumulárních buňkách (Tůmová et al., 2013).

Genom mouchy rodu *Drosophila* obsahuje tři geny kódující podjednotku A (CanA1, Pp2B-14D, CanA-14F) a dva kódující podjednotku B (CanB, CanB2) (Takeo et al., 2010). K expresi Pp2B-14D, CanA-14F a CanB2 dochází již v raném stádiu vývoje embrya a vaječníků

(Takeo et al., 2006). Ztrátou funkce genu CanB2 je u *Drosophila* způsobena sterilita s meiotickými defekty (Takeo et al., 2010).

3.3.9.3 Funkce kalcineurinu

Prostřednictvím signalizace závislé na Ca^{2+} ovlivňuje kalcineurin činnost iontových kanálů (Klee et al., 1998) a tím i změny v genové transkripci (Rusnak and Mertz, 2000). Má významnou roli např. v převodu vápníkových signálů na buněčné procesy (Klee et al., 1988; Kincaid, 1993), při aktivaci T-buněk (Liu et al., 1991; Abbasi et al., 2006) i apoptóze (Yazdanbakhsh et al., 1995).

Nenahraditelnou roli zastupuje kalcineurin při aktivaci a následném transportu NFAT z cytoplasmy do jádra (Liu et al., 1991; Ruff and Leach, 1995; Shaw et al., 1995). Přímou komunikací kalcineurinu s NFAT je ovlivněno mnoho signálních a regulačních buněčných procesů savců (Roehrl et al., 2004). Kalcineurin spolu s NFAT chrání neurony Rcan1 (kalcineurinu 1) proti oxidativnímu stresu (Porta et al., 2007), který je základem dysfunkce neuronů u mnoha neurodegenerativních onemocnění (Porta et al., 2007). Proteiny kódované genem RCAN1 (regulátor kalcineurinu 1) interagují s kalcineurem a dochází k inhibici kalcineurin-dependentních signálních drah, čímž dochází ke zvýšení oxidativního stresu a ovlivnění vývoje centrální nervové soustavy. Nadměrná exprese tohoto genu v mozkové tkáni je prokázána u plodů s Downovým syndromem a může také způsobit vznik neurofibrilárních klubek, která jsou typická pro Alzheimerovu chorobu (Wu and Song, 2013).

Kalcineurem je také specificky ovlivněna defosforylace transkripčního faktoru Elk1, čímž dochází k pozitivnímu ovlivnění jeho transkripční aktivity (Tian and Karin, 1999).

Signalizace kalcineurinu při regulaci meiózy v oocytech je popsána u drápatky *Xenopus laevis* (Nishiyama et al., 2007) i mouchy rodu *Drosophila* (Thao et al., 2006; Thao et al., 2010), kdy je kalcineurin nezbytný k postupu meiózy z metafáze I (Thao, et al., 2010) a výstupu z metafáze II (Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007; Takeo et al., 2010). Aktivace kalcineurinu provázená následující inaktivací v oplozeném oocytu je potřebná pro úspěšný začátek vývoje embrya drápatky (Nishiyama et al., 2007).

V ranném embryonálním vývoji je kalcineurem ovlivněna dekondezace chromatinu a také změny v cytoskeletu včetně migrace prvojader (Jesus and Haccard, 2007). Kalcineurin zastává funkci i při defosforylaci komplexu anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), který je zodpovědný za degradaci cyklinu B a aktivitu MPF (Mochida and Hunt, 2007). Oocyty ze zárodečných buněk s nedostatkem regulační podjednotky B2 byly po aktivaci neschopné dokončit meiózu. Uvolněné oocyty vykazovaly pozastavení v

chromozómové konfiguraci anafáze I (Takeo et al., 2010). Důsledky blokace kalcineurinu v průběhu zrání zatím nejsou známy.

4. Materiál a metodika

4.1 Získávání a kultivace oocytů

Oocyty byly získány z vaječníků prasnic poražených na jatkách. Odebrané vaječníky byly transportovány v termosce s fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) zahřátým na 39 °C. Z vaječníků byly získávány oocyty rostoucí a oocyty s ukončeným růstem.

Z tenkých pásů z povrchu vaječníků (10 - 15 mm dlouhých a 1 – 2 mm širokých) odebraných skalpelem byly získány rostoucí oocyty různých rozměrů. Pásky tkáně byly umístěny do Petriho misek s kultivačním médiem. K uvolnění oocytů z folikulů došlo za použití špičky jehly 25G. Vnitřní průměr oocytů (bez *zona pellucida*) byl měřen objektivovým mikrometrem připevněným na mikroskopu.

Z folikulů o průměru 2 – 5 mm byly za použití jehly 20G získávány oocyty s ukončeným růstem. K pokusům byly využity pouze ty oocyty, které měly kompaktní obal z kumulárních buněk.

K následujícím pokusům byly vybrány pouze oocyty obklopené několika vrstvami kumulárních buněk. Před kultivací byly oocyty třikrát opláchnuty v kultivačním médiu.

Jako kultivační medium bylo použito modifikované médium M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Skotsko). Médium M199 bylo obohaceno o hydrogenuhličitan sodný (0,039 mL 7,0% roztoku na ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/mL), gentamicin (0,025 mg/mL), HEPES (1,5 mg/mL), 13,5 IU eCG: 6,6 IU hCG/mL (P.G.600 Intervet, Boxmeer, Holland) a 10% fetální bovinní sérum (GibcoBRL, Life Technologies, Německo).

Oocyty byly kultivovány 24, 48 a 72 hodin ve čtyřjamkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) obsahujících 3,0 mL kultivačního média při 39 °C v prostředí směsi 5% CO₂ a vzduchu.

4.2 Stanovení vlivu inhibice fosfátázy 2B

Pro stanovení vlivu inhibice kalcineurinu byl v různých koncentracích použit inhibitor kalcineurinu ze skupiny pyretroidů - deltametrin. Tento kalcineurin inhibující pyretroid byl pořízen od Sigma-Aldrich (Německo). 50mM zásobního roztoku bylo zředěno dimethylsulfoxidem (DMSO). Kontrolními experimenty bylo prokázáno, že čistý DMSO o stejné koncentraci, jaká byla užita během kultivace oocytů s deltametrinem, neměl na zrání oocytů *in vitro* žádný významný vliv.

Před každou kultivací byl k dosažení konečné koncentrace testované substance do kultivačního média přidán zásobní roztok. Rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí byly kultivovány s deltametrinen o koncentraci 0, 10, 25, 50 a 100 μM . U plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí byl testován deltametrin o stejné koncentraci, tedy 0, 10, 25, 50 a 100 μM .

Dále byl použit inhibitor kalcineurinu z jiné skupiny, ze skupiny nepyretroidních látek. Oocyty byly kultivovány v přítomnosti cyklosporinu A. Stejně jako v případě deltametrinu byly kultivovány oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a oocyty s plnou meiotickou kompetencí na konci růstové fáze. Inhibitor byl použit v koncentraci 0, 1, 4 a 8 μM u rostoucích oocytů a v koncentracích 0, 0,1, 1, 4 a 8 μM u oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí.

4.3 Hodnocení fáze zrání oocytů

Na konci kultivace byly oocyty umístěny na podložní sklíčko a fixovány nejméně 24 hodin ve směsi etanolu a kyseliny octové (3:1, v/v). Následně byly jaderné struktury barveny 1% orceinem. Pro stanovení stádia zrání byl použit fázový kontrastní mikroskop.

Fáze jaderného zrání - zárodečného váčku (GV), pozdní diakineze (LD), metafáze I (MI), anafáze I (AI), telofáze I (TI) a metafáze II (MII), byly hodnoceny podle kritérií popsaných Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu neodpovídající kritériím byla považována za degeneraci. Životaschopnost oocytů byla hodnocena po obarvení trypanovou modří. Čtyřicet oocytů z každé kategorie (rostoucí meioticky nekompetentní oocyty, rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a plně dorostlé meioticky kompetentní oocyty) bylo vždy hodnoceno po ošetření jednotlivou chemickou látkou (tj. deltametrinem a cyklosporinem A). Jelikož čas je při zrání oocytů jedním z faktorů ovlivňujících jeho průběh, byly pozorovány také oocyty kultivované 48 hodin a následně obarvené trypanovou modří. Výsledky dřívějších experimentů neprokázaly vliv pyretroidů na životaschopnost oocytů, a proto jsou v této práci prezentovány pouze výsledky z pozorování oocytů po kultivaci za použití vyšších koncentrací.

4.4 Statistická analýza

Každý experiment byl proveden u 40 oocytů a byl opakován třikrát. Pro hodnocení korelace mezi koncentrací pyretroidů a jejich efektem na zrání prasečích oocytů byl použit Spearmanův koeficient pořadové korelace.

Koncentrace příslušných pyretroidů potřebná pro iniciaci zrání až do MII fáze u 50% rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí (iniciační koncentrace 50, IndM₅₀) a koncentrace pyretroidů nezbytná pro vyvolání inhibice zrání u 50% plně dorostlých oocytů (inhibiční koncentrace 50, InhM₅₀) byly vypočítány pomocí nelineární regrese.

Procento oocytů v dané fázi meiotického zrání v každé koncentraci inhibitoru bylo porovnáno s kontrolní skupinou za použití χ^2 -testu. Celkové procento oocytů, které dosáhly stanovené fáze meiotického zrání, se ve všech opakováních nelišilo o více než 2,5%.

Jako statisticky významné byly hodnoceny rozdíly na hladině ($P < 0.05$).

5. Výsledky

5.1 Ověření meiotické kompetence oocytů

Cílem experimentu bylo v našich kultivačních a experimentálních podmínkách zjistit meiotickou kompetenci oocytů prasete o různých velikostech vnitřního průměru –80 – 89 μm , 90 - 99 μm , 100 - 110 μm a 120 μm .

Zjistili jsme, že v našich laboratorních podmínkách jsou oocyty velikostní skupiny 80-89 μm i oocyty o velikosti vnitřního průměru 90-99 μm zcela meioticky nekompetentní. Při 48 hodinové kultivaci v podmínkách *in vitro* nepostoupily za stádium zárodečného vajíčku. Skupina oocytů o velikosti vnitřního průměru 100-110 μm zahrnovala oocyty s již částečně vyvinutou meiotickou kompetencí. Tyto oocyty byly při 48 hodinové kultivaci schopné dojít do stádia první meiotické metafáze. Nebyly však schopny prolomit první meiotický blok. Oocyty o velikosti 120 μm jsou již zcela kompetentní dokončit meiotické zrání. V našich laboratorních podmínkách dosáhly po 48 hodinách druhé meiotické metafáze (viz Tabulka 1).

Prokázali jsme, že oocyty prasete získávají meiotickou kompetenci graduálně v závislosti na své velikosti.

Tabulka 1.: Ověření meiotické kompetence oocytů prasete o různé velikosti po dobu 48 hod. kultivace v experimentálních laboratorních podmínkách.

Fáze meiotického zrání	% oocytů v dané fázi meiotického zrání			
	80 – 89 μm	90 – 99 μm	100 – 110 μm	120 μm
GV	97,8 \pm 2,2 ^a	88,5 \pm 6,0 ^a	12,8 \pm 5,4 ^b	6,2 \pm 6,1 ^b
MI	1,5 \pm 1,0 ^a	9,9 \pm 4,7 ^a	87,2 \pm 5,4 ^b	6,9 \pm 4,8 ^a
MII	0,7 \pm 0,7 ^a	1,6 \pm 1,2 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	86,9 \pm 5,7 ^b

GV: fáze zárodečného vajíčku; MI: fáze první meiotické metafáze; MII: fáze druhé meiotické metafáze

Analyzovány byly oocyty s vnitřním průměrem 80-89, 90-99, 100-110 a 120 μm . Byly kultivovány v modifikovaném médiu M199 po dobu 48 hodin. Získaná data byla prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka. Různá písmena v exponentech hodnot označují v rámci řádků statisticky významnou odlišnost ($P < 0,05$). Pokus byl čtyřikrát opakován.

5.2 Vliv inhibitorů na rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí

Po 48 hodinové kultivaci oocytů *in vitro* pod vlivem kalcineurin-inhibičního pyretroidu se procento oocytů dozrálých do fáze MII značně navýšilo a procento oocytů neschopných znovuzahájit meiózu a prodělat GVBD se značně snížilo (Tabulka 2, Graf 1). Obdobný efekt byl pozorován u rostoucích prasečích oocytů kultivovaných s nepyretroidním inhibitorem kalcineurinu – cyklosporinem A (Tabulka 2, Graf 2).

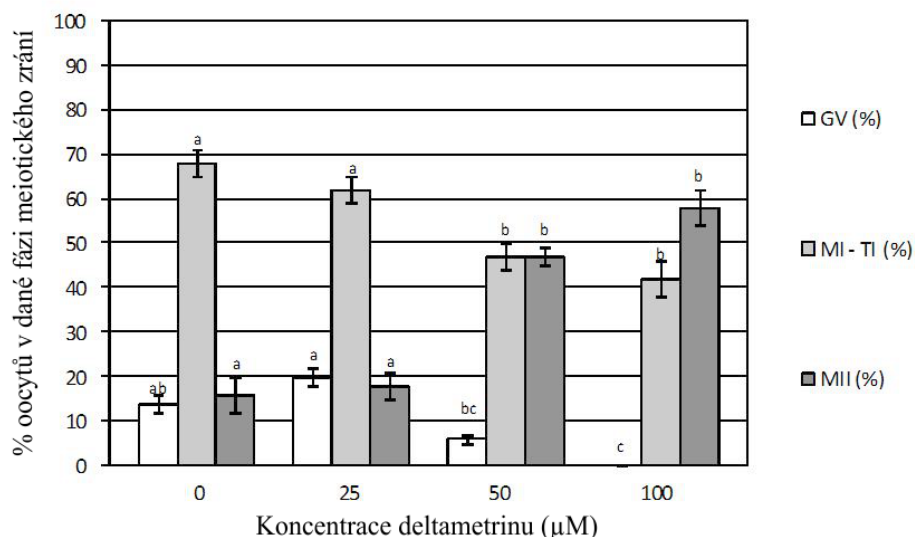
V průběhu 48 hodinové kultivace rostoucích prasečích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí s testovanými látkami o maximální koncentraci (100 μM deltametrin ($n = 50$), a 8 μM cyklosporin A ($n = 50$)) nebyla pozorována jejich degenerace. Rovněž nebyla významně ovlivněna ani jejich životaschopnost.

Tabulka 2: Vliv kultivace rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí (vnitřní průměr 110 μm) s deltametrinem a cyklosporinem A.

Testovaná látka	SCC mezi koncentrací a zráním do MII	Hodnota SCC	Inhibiční koncentrace 50 (μM)	Počet testovaných oocytů
Deltametrin	0.91	+	74	480
Cyklosporin A	0.90	+	5	480

Spearmanův koeficient korelace (SCC) mezi koncentrací dané látky a procentem oocytů dozrávajících do fáze metafáze II byl významný (+), když byla hodnota $P < 0,05$.

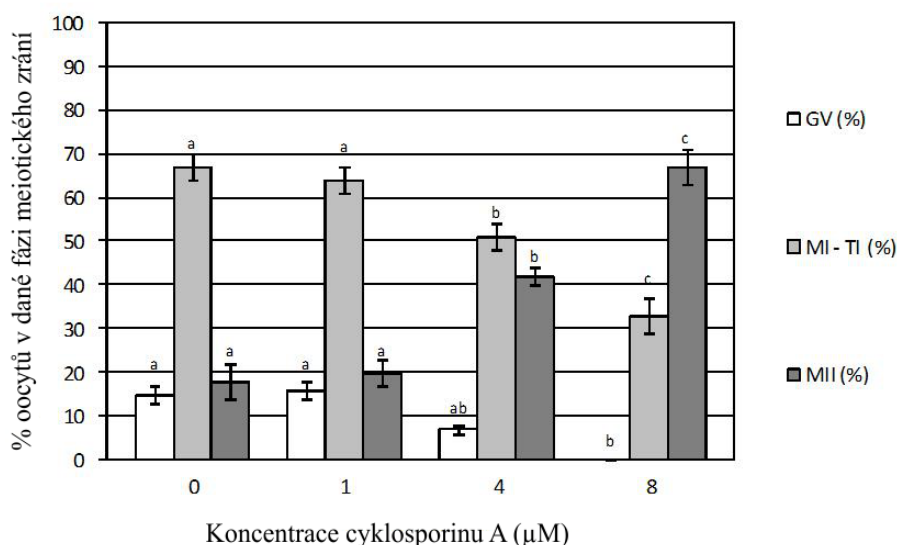
Graf 1: Vliv deltametrinu na vývoj rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí po 48 hodin dlouhé kultivaci.



^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi procentuálním vyjádřením oocytů v konkrétním stádiu vývoje s různými koncentracemi testovaného inhibitoru (t.j. rozdíly mezi koncentracemi pyretroidu deltametrinu) jsou popsány různými horními indexy.

Pro každou koncentraci deltametrinu bylo použito 120 oocytů.

Graf 2: Vliv cyklosporinu A na vývoj rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí po 48 hodin dlouhé kultivaci.



^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi procentuálním vyjádřením oocytů v konkrétním stádiu vývoje s různými koncentracemi testovaného inhibitoru (t.j. rozdíly mezi koncentracemi pyretroidu cyklosporinu A) jsou popsány různými horními indexy.

Pro každou koncentraci cyklosporinu A bylo použito 120 oocytů.

5.3 Vliv inhibitorů na oocyty s ukončenou růstovou fází a plnou meiotickou kompetencí

U plně dorostlých meioticky kompetentních oocytů byla schopnost meiotického zrání ovlivněna po 48 hodinové kultivaci v podmínkách *in vitro* s kalcineurin-inhibičním pyretroidem - deltametrinem. Tento efekt byl však závislý na množství testované látky (Tabulka 3, Graf 3). Zrání oocytů bylo deltametrinem pouze zpomaleno. Při kultivaci oocytů dlouhé 72 hodin s 25 µM deltametrinu dozrála většina oocytů až do fáze MII (96% oocytů v MII).

Obdobný efekt byl pozorován i po 48 dlouhé kultivaci plně dorostlých prasečích oocytů s úplnou meiotickou kompetencí se specifickým nepyretroidním inhibitorem kalcineurinu – cyklosporinem A (Tabulka 3, Graf 4). Meiotické zrání plně dorostlých oocytů

bylo cyklosporinem A rovněž pouze zpomaleno. Při prodloužení kultivace z 48 na 72 hodin v médiu s přídavkem 8 μM cyklosporinu A bylo 91% oocytů dozrálých do stádia MII. Všechny zbylé oocyty dosáhly stádia MI. Prodloužení kultivace oocytů s nepyretroidní inhibítozem kalcineurinu o 24 hodin (celkový čas kultivace byl tedy 72 hodin) vedl k dozrání oocytů do stejného stádia, které bylo zaznamenáno i po 48 hodin dlouhé kultivaci v médiu bez inhibitorů.

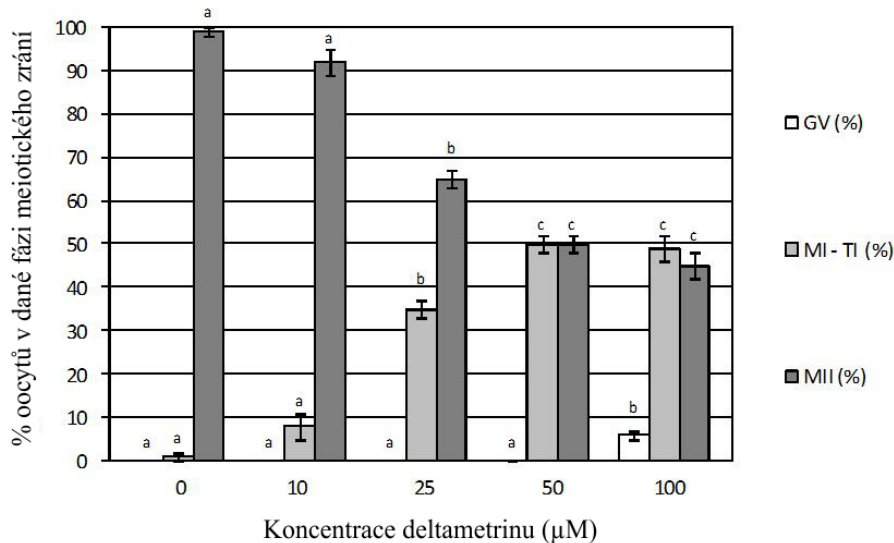
Během 48 hodin dlouhé kultivace plně dorostlých meioticky kompetentních oocytů prasete se všemi látkami o maximální koncentraci, tedy s 100 μM deltametrinu ($n = 50$) a 8 μM cyklosporinu A ($n = 50$), nebyla pozorována degenerace oocytů. Rovněž životaschopnost oocytů nebyla po 48 hodinové kultivaci významně ovlivněna.

Tabulka 3: Vliv kultivace plně dorostlých oocytů prasete s úplnou meiotickou kompetencí (vnitřní průměr 110 μm) s deltametrinem a cyklosporinem A.

Testovaná látka	SCC mezi koncentrací a zráním do MII	Hodnota CSS	Inhibiční koncentrace 50 (μM)	Počet testovaných oocytů
Deltametrin	- 0.98	+	50	600
Cyklosporin A	- 0.95	+	3	600

Spearmanův koeficient korelace (SCC) mezi koncentrací dané látky a procentem oocytů dozrávajících do fáze metafáze II byl významný (+), když byla hodnota $P < 0,05$.

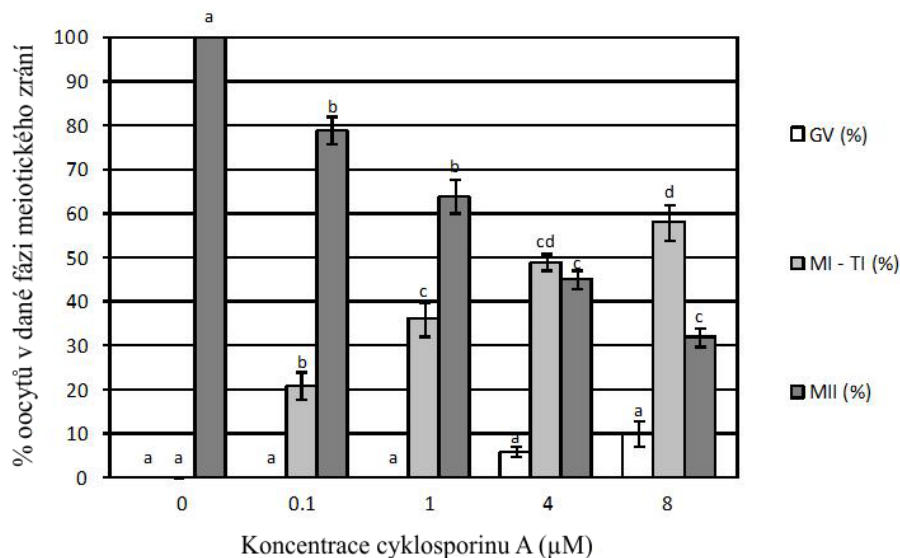
Graf 3: Vliv deltametrinu na vývoj plně dorostlých oocytů prasete s úplnou meiotickou kompetencí po 48 hodin dlouhé kultivaci.



^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi procentuálním vyjádřením oocytů v konkrétním stádiu vývoje s různými koncentracemi testovaného inhibitoru (t.j. rozdíly mezi koncentracemi pyretroidu deltametrinu) jsou popsány různými horními indexy.

Pro každou koncentraci deltametrinu bylo použito 120 oocytů.

Graf 4: Vliv cyklosporinu A na vývoj plně dorostlých oocytů prasete s úplnou meiotickou kompetencí po 48 hodin dlouhé kultivaci.



^{a,b,c,d} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi procentuálním vyjádřením oocytů v konkrétním stádiu vývoje s různými koncentracemi testovaného inhibitoru (t.j. rozdíly mezi koncentracemi pyretroidu cyklosporinu A) jsou popsány různými horními indexy.

Pro každou koncentraci cyklosporinu A bylo použito 120 oocytů.

6. Diskuze

V této práci byla sledována úloha kalcineurinu během meiotického zrání oocytů s různým stupněm meiotické kompetence pomocí inhibice kalcineurinu. K inhibici byl využit inhibitor z řady pyretroidů deltametrin a nepyretroid cyklosporin A. Zrání rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí bylo testováno různými koncentracemi deltametrinu stimulováno. Naproti tomu u zcela dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí bylo pozorováno výrazné zpoždění zrání.

Mechanismus působení pyretroidů na zrání oocytů není zcela objasněn (Soderlund, 2010). Toxický efekt pyretroidů je obvykle spojen s působením pyretroidů na iontové kanály nervových buněk (Tayebati et al., 2009; Soderlund, 2010). Iontové kanály jsou důležité i při složitém procesu zrání savčích oocytů (Tosti and Boni, 2004). Nelze tedy vyloučit možnost, že oocyty jsou pyretroidy ovlivněny právě skrze iontové kanály. Látka deltametrin je rovněž známa jako velmi specifický inhibitor protein fosfázy 2B, kalcineurinu (Enan and Matsumura, 1992). Z toho důvodu se zdá být velmi pravděpodobné, že efekt pyretroidů na meiotické zrání oocytů popsaný v této práci je důsledkem inhibice kalcineurinu.

Tato domněnka byla později podpořena experimenty, během kterých byly oocyty kultivovány se specifickým nepyretroidním inhibitorem kalcineurinu cyklosporinem A. Působení těchto inhibitorů na zrání oocytů prasete bylo velmi podobné jako působení pyretroidu inhibujícího kalcineurinu. Působení deltametrinu na iontové kanály navíc může být důsledkem inhibice kalcineurinu, který je zapojen do regulace vápníkových kanálů (Yakel, 1997). Po specifické inhibici L-type vápníkových kanálů bylo rovněž zaznamenáno opožděné zrání plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí (Rozinek et al., 2003). Je však nemožné vyloučit případné působení i dalších inhibitorů kalcineurinu.

Opačný efekt, tj. zahájení meiózy rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí a inhibice meiózy u plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí, je po ošetření inhibitory kalcineurinu překvapivý. Zrání savčích oocytů je mimo jiné závislé na cyklin-dependentní kináze 1 (CDK1), která spolu s cyklinem B vytváří komplex MPF. Snížení aktivity MPF je nezbytné pro výstup z fáze MI a následný vstup do fáze AI. Spontánní blokace zrání rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí ve fázi MI je způsobena neschopností těchto oocytů inaktivovat (nebo alespoň částečně inaktivovat) komplex MPF (Hampl and Eppig, 1995). MPF může být inaktivován destrukcí cyklinu B (Yu, 2002). Jsou zde však i alternativní dráhy inaktivace MPF, např. jeho navázání na separin nebo

fosforylace či defosforylace MPF (Gorr et al., 2006). Protein fosfátázy, včetně kalcineurinu, mohou hrát důležitou roli při mnoha mechanismech aktivace a inaktivace MPF. Právě ovlivnění těchto mechanismů může být cílem inhibitorů kalcineurinu jak u rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí, tak i u oocytů s ukončenou růstovou fází a plnou meiotickou kompetencí s úplnou meiotickou kompetencí. Výsledkem je právě opačný efekt na zrání.

Oocyty *in vitro* vystavené chemikáliím ovlivňujících průběh meiotického zrání mají omezenou schopnost oplození (Casas et al., 2010). Pyretroidy mohou kvalitu oocytů ovlivnit obdobně. Vlivem pyretroidů mohou mít dorostlé oocyty s opožděným zráním omezenou schopnost oplození a následného vývoje. Reprodukce samic může být narušena i podpořením zrání rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí. Takové oocyty znovu zahajují meiózu bez dokončené syntézy mRNA, která je v průběhu embryonálního vývoje nezbytná pro správné zrání i korektní průběh zahájení mitózy (Wassarman, 1988).

Vliv pyretroidů na savčí oocyty zasluhuje pozornost, jelikož jsou jejich účinku oocyty vystaveny v mnoha situacích. K primární kontaminaci pyretroidy dochází stravou (Julien et al., 2008). Metabolity pyretroidů byly zaznamenány u značné části lidské populace (Heudorf and Angerer, 2001). Pyretroidy jsou rovněž u lidí (Taplin and Meinking, 1987) i zvířat (Gassner et al., 1997; Sassine et al., 2004) užívány cíleně, např. jako insekticidy a látky proti blechám a klíšťatům (Fox et al., 1993). Celkové množství přijatých pyretroidů do organismu se pohybuje v gramech. Absorbce pyretroidů je variabilní (od 0,5 do 50%). U lidí je ale obecně nízká (Perger and Szadkowski, 1994).

Hladina pyretroidů i hladina jejich reziduí v organismu je díky rychlé metabolizaci a vylučování většiny z nich (kromě okamžiku ihned po vystavení pyretroidům) obvykle velmi nízká (Elflein et al., 2003). U lidí vystavených pyretroidům je hladina pyretroidů i jejich reziduí v krvi velmi nízká (1ppb) nebo nedetekovatelná (Ramesh and Ravi, 2004; Liao et al., 2011). I navzdory nezjistitelné hladině v krvi byla u testovaných osob obvykle hladina pyretroidů a jejich reziduí vyšší v moči (až 1 μM) (Leng et al., 1997). Hladina pyretroidů v krevní plazmě tedy neodráží skutečnou hladinu těchto insekticidů v těle (Kim et al., 2010). Pyretroidy mají lipofilní charakter, a proto jsou ukládány v tucích včetně tuku mléka. Dojné krávy lokálně ošetřované pyretroidem vylučovaly na 1 kg mléka od 0.025 mg do 0.168 mg pyretroidu (Rothwell et al., 2001; Sassine et al., 2004). Podobné hladiny pyretroidů byly detekovány i v lidském mléce (permethrin 14,51 $\mu\text{g/l}$, cypermethrin 4,24 $\mu\text{g/l}$, deltamethrin 8,39 $\mu\text{g/l}$) (Bouwman et al., 2006). Hladina pyretroidů přijatých kojenci se pak pohybuje od

0.67 do 9.0 μg na kg tělesné hmotnosti za den (Feo et al., 2012). Tuk, ale i kůže a svaly, jsou schopné akumulovat pyretroidy (až 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a chovají se jako zásobárny s pomalým uvolňováním (Kim et al., 2008). Ošetřování zvířat proti ektoparazitům pomocí pyretroidů je rovněž zdrojem rozsáhlé a vytrvalé kontaminace prostředí, kdy byla hladina jejich reziduí na některých místech detekovatelná i několik týdnů po zahájení ošetřování s poločasem rozpadu až 44 dnů (Gassner et al., 1997).

V této práci byl zkoumán vliv pyretroidů na zrání oocytů prasete v koncentracích (IndM50 nebo InhM50), které byly mnohem vyšší než hladiny obvykle detekované v organismu lidí či zvířat pyretroidům vystavených. Z toho důvodu by se mohlo zdát, že výsledky této práce mají pouze omezenou významnost. Dle mnoha autorů však mohou pyretroidy (obzvláště v některých tkáních) přechodně dosáhnout srovnatelných hladin (Kim et al., 2010). Zvířata i lidé mohou být náhodně či záměrně vystaveni takovému množství pyretroidů, kterým je hladina těchto látek přinejmenším dočasně zvýšena na hladinu srovnatelnou s koncentrací v této práci.

Lipofilním charakterem pyretroidů je podpořena jejich afinita k tkáním a buňkám s vysokým obsahem tuku. V oocytech je množství lipidů druhově odlišné. Prasečí oocyty obvykle obsahují 156 ng lipidů (McEvoy et al., 2000), což je mnohem více než u oocytů myší - 4 ng na oocyt (Lowenstein and Cohen, 1964), krav - 58 ng na oocyt (Ferguson and Leese, 1999) nebo ovcí - 89 ng na oocyt (Coull et al., 1998). Proto lze usuzovat na větší zatížení lipofilními pyretroidy u prasečích oocytů. S ohledem na vzrůstající problém plodnosti lidí je nezbytné tuto problematiku zkoumat i nadále.

7. Závěr

Pomocí experimentů byl prokázán významný vliv inhibitorů fosfátázy 2B, kalcineurinu na meiotické zrání oocytů prasete. Oocyty byly *in vitro* podrobeny inhibici vlivem pesticidní látky ze skupiny pyretroidů deltametrinu i látky nepyretroidní povahy cyklosporinu A. Testovanými inhibitory nebyla způsobena degenerace oocytů a nebyla jimi ovlivněna ani životaschopnost oocytů. Pyretroidem inhibujícím kalcineurin však bylo významně ovlivněno meiotické zrání oocytů. Pozorovaný efekt byl závislý na stupni meiotické kompetence oocytů. U plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí došlo k narušení meiotického zrání, zatímco u rostoucích oocytů s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí, bylo naopak meiotické zrání stimulováno. Kalcineurin může být tudíž významným regulátorem meiotického zrání a také zisku meiotické kompetence. Jeho přesný mechanismus účinku v oocytech není znám a je třeba ho detailně prostudovat.

8. Seznam použité literatury

Abbasi, S., Lee, J-D., Su, B., Chen, X., Alcon, J. L., Yang, J., Kellems, R. E., Xia, Y. 2006. Protein Kinase-mediated Regulation of Calcineurin through the Phosphorylation of Modulatory Calcineurin-interacting Protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 281. 7717-7726.

Adhikari, D., Liu, K., Shen, Y. 2012. Cdk1 drives meiosis and mitosis through two different mechanisms. *Cell Cycle*. 11(15). 2763–2764.

Albertini, D. F. 1992. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research*. 296. 57-68.

Alberts, B. Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition. Garland Science. p. 1600. ISBN: 0-8153-4106-7

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630s. ISBN: 80-902906-2-0

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 Veterinaria Brno*. 72. 493 – 498.

Bian, K., Ghassemi, F., Sotolongo, A., Siu, A., Shauger, L., Kots, A., Murad, F. 2012. NOS-2 signaling and cancer therapy. *IUBMB Life*. 63(8). 676-683.

Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anatomical Record*. 161. 45–56

Blanco, F. J., Montoya, G. 2011. Transient DNA/RNA-protein interactions. *Febs Journal*. 278. 1643-1650.

Bouwman, H., Seereda, B., Meinhadt, H. M. 2006. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from malaria endemic area in South Africa. *Environmental Pollution*. 144. 902-917.

Bredt, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347(6295). 768–770.

Brunet, S., Maro, B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*. 130. 801-11.

Brunet, S., Maria, A. S., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J. Z., Maro, B. 1999. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse

oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. *Journal of Cellular Biology*. 146. 1-12.

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Molecular and cellular endocrinology* 207. 21 –30.

Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543-547.

Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Betancourt, M. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Toxicology in Vitro*. 24. 224-230.

Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular (Ca^{2+}) oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*. 120. 3507-3517.

Cebat, M., Wiczorek, Z., Siemion, I. Z. 1996. Immunosuppressive activity of hymenistatin I. *Peptides*. 17. 191–196.

Cecconi, S., Rossi, G., De Felici, M., Colonna, R. 1996. Mammalian oocyte growth *in vitro* is stimulated by soluble factor(s) produced by preantral granulosa cells and by Sertoli cells. *Molecular Reproduction and Development*. 44. 540–546.

Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80. 259–268.

Clarke, H., Rossant, J., Masui, Y. 1988. Suppression of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development*. 104. 97–103.

Clarke, P. R., 1995. Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation *Current Biology*. 5(1). 40–42.

Cohen, P. T. W. 2002. Protein phosphatase 1 - targeted in many directions. *Journal of Cell Science*. 2. 241-256.

Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B., Evans, M. J. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370. 65-68.

Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Steirteghem, A. C. 1997. Assessment of the need for follicles stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture *in vitro*. *Human Reproduction* 12. 759–768.

Coticchio, G., Albertini, D. F., De Santis, L. 2013. *Oogenesis*. Springer. London. p. 376. ISBN: 978-0-85729-825-6

- Coull, G. D., Speake, B. K., Staines, M. E., Broadbent, P. J., McEvoy, T. G. 1998. Lipid and Fatty acid composition of zona-intact sheep oocytes. *Theriogenology*. 49. 179.
- Danner, S., Kajahn, J., Geismann, C., Klink, E., Kruse, C. 2007. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Molecular Human Reproduction*. 13. 11-20.
- Dekel, N., Galiani, D., Sherizly, I. 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Moll. Cell. Endocrinology*. 56. 115-121.
- Dekker, L. V., Parker, P. J. 1994. Protein kinase C--a question of specificity. *Trends in Biochemical Science*. 19(2). 73-77.
- Depreux, F. F., Scheffler, J. M., Grant, A. L., Bidwell, C. A., Gerrard, D. E. 2010. Molecular cloning and characterization of porcine calcineurin- γ subunit expression in skeletal muscle. *Journal of Animal Science*. 88(2). 562-571.
- de Vantéry, C., Stutz, A., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine, S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology*. 187. 45-53.
- Dixit, D. V., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science*. 65. 1-16.
- Domingo-Sananes M. R., Kapuy O., Hunt T., Novak B. 2011. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 366(1584). 3584-3594.
- Downs, M. S, Cottom, J., Hunzicker-Dunn, M. 2001. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 101-115.
- Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35. 55 - 68.
- Dyce, P. W., Li, J. 2006. From skin cells to ovarian follicles? *Cell Cycle*. 5. 1371-1375.
- Dyce, P. W., Wen, L., Li, J. 2006. In vitro Germáne potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology*. 8. 384-390.
- Dunphy, W, Kumagai, A. 1991. The cdc25 protein contains intrinsic phosphatase activity. *Cell*. 54. 424-432.

Dupré, A., Buffin, E., Roustan, C., Nairn, A. C., Jesus, C., Haccard, O. 2013. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the autoamplification of MPF independent of PKA in *Xenopus* oocytes. *Journal of cell science*. 126. 3916-3926.

Elflein, L., Berger-Preiss, E., Preiss, A., Elend, M., Levsen, K., Wunsch, G. 2003. Human biomonitoring of pyrethrum and pyrethroid insecticides used indoors: determination of metabolites E-cis/trans chrysanthemum dicarboxylic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization. *Journal of Chromatography B*. 795. 195-207.

Enan, E., Matsumura, F. 1992. Specific-inhibition of calcineurin by type-II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochemical Pharmacology*. 43. 1777-1784.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 810–837.

Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of reproductions*. 45. 824-830.

Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., Wagers, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441. 1109-1114.

Fan, H-Y., Tong, C., Li, M-Y., Lian, L., Chen, D-Y., Schatten, H., Sun, Q-Y. 2002. Translocation of the Classic Protein Kinase C Isoforms in Porcine Oocytes: Implications of Protein Kinase C Involvement in the Regulation of Nuclear Activity and Cortical Granule Exocytosis. *Experimental Cell Research*. 277(2). 183-191.

Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195. 327-336.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78. 203 – 2016.

Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 63. 481–488.

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

Ferguson, E. M., Leese, H. J. B. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 116. 373-378.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71. 836-848.

Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and mikrotubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular cellular biology*. 11. 1965-1971.

Feo, M. L., Eljarrat, E., Manaca, M. N., Dobaño, C., Barcelo, D., Sunyer, J., Alonso, P. L., Menendez, C., Grimalt, J. O. 2012. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environment International*. 38(1). 67-72.

FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell*. 14. 288-301.

Fox, R. G. R., Mmbando, S. O., Fox, M. S., Wilson, A. 1993. Effect on herd health and productivity of controlling Tsetse and Trypanosomiasis by applying deltamethrin to cattle. *Tropical Animal Health and Production Journal*. 25. 203-214.

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

Fulka, J., Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on Terminal vesicle breakdown of oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 29. 379-384.

Gabrieli, B. G., Roy, L. M., Maller, J. L. 1993. Requirement for cdk2 in cytosolic factor-mediated metaphase II arrest. *Science*. 259. 1766-1769.

Gassner, B., Wüthrich, A., Lis, J., Scholtysik, G., Solioz, M. 1997. Topical application of synthetic pyrethroids to cattle as a source of persistent environmental contamination. *Journal of Environmental Science and Health*. 32. 729-739.

Gautier, J., Maller, J. 1988. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *The EMBO Journal*. 10. 178-182.

Gautier, J., Maller, J., Langan, T., Lohka, M., Shwnoy, S., Shalloway, D., Nurse, P. 1989. Maturation promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science (Suppl)*. 2. 54-62.

- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., Kirschner, M. W. 1991. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 67. 197–211.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349. 132–138.
- Goodenough, D. A., Paul, D. L. 2009. Gap Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1(1).
- Gorr, I. H., Reis, A., Boos, D., Wuhr, M., Madgwick, S., Jones, K. T., Stemmann, O. 2006. Essential CDK1-inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nature Cell Biology*. 8(9). 1035-1037.
- Gosden R. G., Bownes M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development, Gametes - The Oocyte. Cambridge University Press. Cambridge. p. 25–51.
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19. 875-882.
- Guthrie, H., Garrett, W. M. 2000. Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*. 54(3). 390–400.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J. L., 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*. 262. 262–1265.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase-I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925-933.
- Hara M., Abe Y., Tanaka T., Yamamoto T., Okumura E., Kishimoto T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature communications*. 3. 1059.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K, Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mosdeficient mice. *Nature*. 370. 67–71.
- Hattori, M–A., Nishida, N., Takesue, K., Kato, Y., Fujihara, N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24. 65–73.
- Herlands, R. L., Schultz, R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth, *Journal of Experimental Zoology*. 229. 317–325.

- Heudorf, U., Angerer, J. 2001. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany. *Environmental Health Perspectives*. 109. 213-217.
- Heyting, C. 1996. Synaptonema complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 8. 389-396.
- Homa S. T., Carroll J., Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction* 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. *Reproduction*. 5. 122–130.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T. 1999 Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. (3-4). 247–254.
- Chang, K. C. 2007. Key signalling factors and pathways in the molecular determination of skeletal muscle phenotype. *Animal*. 5. 681-698.
- Chawengsaksophak, K., Svingen, T., Ng, E. T., Epp, T., Spiller, C. M., Clark, Ch., Cooper, H., Koopman, P. 2011. Loss of Wnt5a disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biology of Reproduction*. 111. 095232.
- Chen, W., Yang, J., Li, P., 2000. Effect of dexamethasone on the expression of p34cdc2 and cyclin B1 in pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 56. 74-79.
- Cheung, W. Y. 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*. 207(4426). 19-27.
- Choi, T., Fukusawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borrer, K., Resau, J., Vande – Woude, G. 1996. The Mos / mitogen proteinkinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93. 7033–7035.
- Chmelíková, E., Jeřeta, M., Sedmíková, M., Petr J., Tůmová, L., Kott T., Lipovová, P., Jilek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18. 235–244.
- Ioune, M., Natio, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during mestic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265-271.

- Inoue, Y., Tsujimoto, Y., Kimura, A. 1998. Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *Journal of Biological Chemistry*. 273. 2977–2983.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460-468.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knockout mouse oocytes. *Endocrinology*. 139. 2954.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 2000. Molecular reproduction and development. 55. 412 – 421.
- Jaffe, L. A., Terasaki, M. 1994. Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Developmental Biology*. 164. 579-587.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., Bloch, K. D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *Journal of biological chemistry*. 267(21). 14519–14522.
- Jessup, C., Haccard, O. 2007. Calcium's double punch. *Nature*. 449. 20.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G.B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone-marrow and peripheral blood. *Cell*. 122(2). 303-15.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145–150.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: From Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130. 813-823.
- Josephsberg, L. B., Galiani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 68. 1284–1289.
- Julien, R., Adamkiewicz, G., Levy, J. I., Bennett, D., Nishioka, M., Spengler, J. D. 2008. Pesticide loadings of select organophosphate and pyrethroid pesticides in urban public housing. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 18. 167-174.

- Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. 26(3). 243-254.
- Kanayama, N., Miyano, T., Lee, J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote*. 10(3). 261-70.
- Kikuchi, K., Naito, K., Daen, F. P., Izaïke, Y., Toyoda, Y. 1995. Histone H1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 43. 523-532.
- Kincaid, R. 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man - a study in structural conservatism and biological diversity. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. 27. 1-23.
- King, R., Deshaies, R., Peters, J., Kirschner, M., 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 274. 1654–1658.
- Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & development*. 14(13). 1595–1604.
- Kim, H., Moon, C., Ahn, M., Lee, Y., Kim, H., Kim, S., Ha, T., Jee, Y., Shin, T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of Veterinary Science*. 6. 97–101.
- Kim, K-B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., Bruckner, J. V. 2008. Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences*. 101. 197-205.
- Kim, K-B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., Fisher, J. W., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V. 2010. Age, dose, and time dependency of plasma and tissue distribution of deltamethrin in immature rats. *Toxicological Sciences*. 115. 354-368.
- Kishimoto, T., Kanatani, H. 1976. Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocytes. *Nature*. 221. 273–274.
- Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the Calmodulin stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *The Journal of biological chemistry*. 273. 22. 13367–13370.
- Klee, C. B., Draetta, G. F., Hubbard, M. J. 1988. Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas of Molecular Biology*. 61. 149-200.
- Knott, J. G., Gardner, A. J., Madgwick, S., Jones, K. T., Williams, C. J., Schultz, R. M. 2006. Calmodulin-dependent protein kinase II triggers mouse egg activation and embryo development in the absence of Ca²⁺ oscillations. *Developmental Biology*. 296. 399-395.

- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8. 119-125.
- Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., Rao, C. V. 2011. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular Endocrinology*. 15. 184-200.
- Leng, G., Kühn, K-H., Idel, H. 1997. Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. *Science of the Total Environment*. 199. 173-181.
- Liao, H. T., Hsieh, C. J., Chiang, S. Y., Lin, M. H., Chen, P. C., Wu, K. Y. 2011. Simultaneous analysis of chlorpyrifos and cypermethrin in cord blood plasma by online solid-phase extraction coupled with chromatography-heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 879. 1961-1966.
- Liu, J., Farmer, J. D. Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S., L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 66(4). 807-815.
- Lorca, T., Cruzalegui, F., Fesquet, D., Cavadore, J., Mery, J., Means, A., Doree, M., 1993. Calmodulin dependant protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366. 270-273.
- Louros, N. N., Iconomidou, V. A., Giannelou, P., Hamodrakas, S. J. 2013. Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation. *PLoS One*. 8. 73258.
- Lowenstein, J. E., Cohen, A. I. 1964. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 12. 113-121.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58. 871-885.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2003. Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assay. *Theriogenology*. 60(4). 659-667.
- Lüllmann-Rauch, R. 2012. *Histologie*. Grada Publishing a.s. Praha. s. 556. ISBN: 978-80-247-3729-4.

- Machatková, M., Hulínská, P., Horáková, J., Rečková, Z., Hanzalová, K. 2008. Oestrus stage influences the morphology and maturation of porcine oocytes in vitro. *Veterinární medicína*. 53. 70-76.
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., Mermillod, P. 2002 Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 57(5). 1523-1532.
- Marlovits, G., Tyson, Ch. J., Novak, B., Tyson, J. J. 1998. Modeling M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA. *Biophysical Chemistry*. 72. 170–184.
- Marteil, G., Richard-Parpaillon, L., Kubiak, J. Z. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*. 9(3). 203-224.
- Masui, Y., Markert, C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of experimental zoology*. 177. 129–146.
- Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. 1991 Changes in maturationpromoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 30. 120–125.
- McEvoy, T. G., Coull, G. D., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S., Speake, B. K. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact *zona pellucida*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11. 163-170.
- Mehlmann, L. M., Kline, D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biology of reproduction*. 51(6). 1088–1098.
- Mitra, J., Schultz, R. M. 1996. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *Journal of Cellular Science*. 109(9). 2407-15.
- Miyazaki, S. 1991: Repetitive calcium transients *in* hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12. 205-216.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 336–340.
- Mochida, S., Maslen, S. L., Skehel, M., Hunt, T. 2010. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science*. 330. 1670–1673.

- Molkentin, J. D. 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*. 63. 467– 475.
- Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47. 485-491.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72. 323-328.
- Motlík J., Fulka J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198. 155 – 162.
- Motlík, J., Kubelka, M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27. 368–376.
- Murray, A. W., Kirschner, M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339. 276–280.
- Nathan, C., Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78(6). 915–918.
- Neal, P., Baker, T. G. 1975. Response of mouse graafian follicles in organ culture to varying doses of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*. 65. 27-32.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 341-345.
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258. 607-614.
- Norberg, H. S. 1972. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 131. 497-517.
- Norris, R. P., Ratzan, J. W., Freudyon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136. 1869-1878.
- Nussbaum, R. I., McIllnes, R. R., Willard, H. F. 2004. In: Thompson and Thompson, *Klinická genetika*. Triton. ISBN 80-7254-475-6.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344. 504-508.

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

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

Payne, C., Schatten, G. 2003. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Developmental Biology*. 264. 50-63.

Petr, J., Rozinek, J., Fulka, J. Jr., Jílek, F. 1994. Influence of cytoplasmic microinjection on meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 34(1). 81-7.

Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of *in vitro* matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal reproduction science*. 70(3). 235–249.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 30–38.

Porta, S., Serra, S. A., Huch, M., Valverde, M. A., Llorens, F., Estivill, X., Arbonés, M. L., Martí, E. 2007. RCAN1 (DSCR1) increases neuronal susceptibility to oxidative stress: a potential pathogenic process in neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. 16(9). 1039-1050.

Pozzan T., Rizzuto R., Vsipe P., Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews* 74. 595 – 636.

Prasanthi, K., Muralidhara, Rajini, P. S. 2005. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following *in vitro* exposure to fenvalerate and its metabolite. *Toxicology in Vitro*. 19. 449-456.

Procházka, R., Motlík, J., Fulka, J. 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cellular Differentiation*. 27. 175–181.

Ramesh, A., Ravi, P. E. 2004. Negative ion chemical ionization-gas chromatographic-mass spectrometric determination of residues of different pyrethroid insecticides in whole blood serum. *Journal of Analytical Toxicology*. 28. 260-266.

Rath, D., Topfer-Petersen, E., Michelmann, H. W., Schwartz, P., von Witzendorff, D., Ebeling, S., Ekhlasi-Hundrieser, M., Piehler, E., Petrunkina, A., Romar, R. 2006. Structural,

biochemical and functional aspects of spermoocyte interactions in pigs. Society for Reproduction and Fertility. 62. 317–330.

Reece, W. O. 1998. Fyziologie domácích zvířat. Grada Publishing, spol. s.r.o. Praha. s. 465. ISBN: 80-71069-547-5.

Rime, H., Ozon, R. 1990. Protein phosphatases are involved in the *in vivo* activation of histone H1 kinase in mouse oocyte. Developmental Biology. 141. 115–122.

Roehrl, M. H., Wang, J. Y., Wagner, G. 2004. Discovery of small-molecule inhibitors of the NFAT--calcineurin interaction by competitive high-throughput fluorescence polarization screening. Biochemistry. 43. 16067-16075.

Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L. K., Plancha, C. E., Albertini, D. F. 2008. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. Journal of Cellular Physiology. 216. 355-65.

Rosselli, M., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J., Dubey, R. K. 1994. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol-mediated NO release. Biochemical and Biophysical Research Communications. 202. 1543-1552.

Rothwell, J. T., Burnett, T. J., Hackett, K., Chevis, R., Lowe, L. B. 2001. Residues of zeta-cypermethrin in bovine tissues and milk following pour-on and spray application. Pest Management Science. 57. 993-999.

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.

Ruff, V. A., Leach, K. L. 1995. Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. The Journal of Biological Chemistry. 270(38). 22602-22607.

Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and Function. Physiological Reviews. 80. 1483-1521.

Sagata, N. 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? BioEssays. 19. 13 – 21.

Sanna, B., Brandt, E. B., Kaiser, R. A., Pfluger, P., Witt, S. A., Kimball, T. R., van Rooij, E., De Windt, L. J., Rothenberg, M. E., Tschop, M. H., Benoit S. C. Molkenin, J. D. 2006. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators

in vivo. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America. 103(19). 7327-7332.

Sassine, A., Moura, S., Léo, V. M., Bustillos, O. V. 2004. Cypermethrin residues determination in the milk of lactating dairy cows by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 28. 238-241.

Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 262- 268.

Shaw, K. T., Ho, A. M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Sharma, S., Rao, A., Hogan, P. G. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 92. 11205-11209.

Shiina, N., Moriguchi, T., Ohta, K., Gotoh, Y., Nishida, E., 1992. Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *The EMBO Journal*. 11. 3980–3984.

Shimada, M. 2009. Cumulus Oocyte Complex: Cumulus Cells Regulate Oocyte Growth and Maturation. *Journal of Mammalian Ovarian Research*. 26(4). 189-194.

Schatten, G. 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Developmental Biology*. 165. 301–329.

Scherthan, H. 2007. Telomereattachment and clustering during meiosis. *Cell*. 64. 117-124.

Schmidt, A., Rauh, N. R, Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*. 119. 1214–1217.

Schramm, R. D., Bavister, B. D. 1999. Onset of nucleolar and extranuclear transcription and expression of fibrillarin in mouse embryos developing *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 60. 721-728.

Schuh, M., Ellenberg, J. 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 130. 484-98.

Siemion, I. Z., Cebrat, M., Wieczorek, Z. 1999. Cyclolinopeptides and Their Analogs – a New Family of Peptide Immunosuppressants Affecting the Calcineurin System. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 47. 143-153.

- Sirard, M. A., Dubuc, A., Bolamba, D., Zheng, Y., Coenen, K. 1993. Follicle-oocyte-sperm interactions *in vitro* and *in vitro* in pigs. Journal of reproduction and fertility. Supplement. 48. 5–14.
- Stefanelli, C., Pignatti, C., Tantini, B., Stanić, I., Bonavita, F., Muscari, C., Caldarera, C. M. 1999. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1450(3). 406-413.
- Sobotková, M., Bartůňková, J. 2008. Antibiotická imunopresiva. Remedia. 18. 233-241.
- Soderlund, D. M. 2010. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology. 97. 78-86.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology. 171. 3-59.
- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle, S., Zakchartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. Reproduction in Domestic Animals. 34. 336–342.
- Stemmer, P. M., Klee, C. B. 1994. Dual Calcium Ion Regulation of Calcineurin by Calmodulin and Calcineurin B. Biochemistry. 33(22). 6859-6866.
- Sullivan, K. M. C., Rubin, G. M. 2002. The Ca^{2+} -calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin negatively regulates Egf receptor signaling in Drosophila development. Genetics. 161(1). 183-193.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanisms Under lying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. J Reproduction Development. 49. 347-359.
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Biology of Reproduction. 64. 875–889.
- Swain, J. E., Wang, X., Saunders, T. L., Dunn, R., Smith, G. D. 2003. Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. Molecular reproduction and development. 65(1). 96–103.

- Takeo, S., Hawley, R. S., Aigaki, T. 2010. Calcineurin and its regulation by Sra/RCAN is required for completion of meiosis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 344(2). 957-967.
- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The Calcineurin Regulator Sra Plays an Essential Role in Female Meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*. 16. 1435–1440.
- Tao, Y., Fua, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J., Xie, H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222. 93–103.
- Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., Zhang, J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 15. 1–9.
- Tayebati, S. K., Di Tullio, M. A., Ricci, A., Amenta F. 2009. Influence of dermal exposure to the pyrethroid insecticide deltamethrin on rat brain microanatomy and cholinergic/dopaminergic neurochemistry. *Brain Research*. 1301. 180 – 188.
- Tian, J., Karin, M. 1999. Stimulation of Elk1 Transcriptional Activity by Mitogen-activated Protein Kinases Is Negatively Regulated by Protein Phosphatase 2B (Calcineurin). *The Journal of Biological Chemistry*. 274. 15173-15180.
- Tichovská, H., Petr, J., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Tůmová, L., Krejčová, M., Dörflerová, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. 9. 1398-1405.
- Tilly, J. L. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2. 838–848.
- Tong, C, Fan, H. Y., Chen, D. Y., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*. 13. 376–384.
- Tosti, E., Boni, R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human Reproduction Update*. 10. 53-65.
- Touny, L. H., Banerjee, P. P. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. 1. 66(14). 1542–1554.

Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Development*. 17. 683-710.

Tůmová, L., Petr, J., Žalmanová, T., Chmelíková, E., Kott, T., Kučerová-Chrpová, V., Hošková, K., Jílek, F. 2003. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal reproduction science*. 141(3-4). 154-163.

Überall, F. Giselsbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H. H., Baier, G. 1997. Conventional PKC- α , Novel PKC- ϵ and PKC- θ , but not Atypical PKC- λ Are MARCKS Kinases in Intact NIH 3T3. *Journal of Biological Chemistry*. 272. 4072-4078.

Vaccari, S., Weeks II, L. J., Hsieh, M., Menniti, S. F., Conti, M. 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*. 81. 595-604.

Vacek, Z. 2006. Embryologie:učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Grada Publishing. 255 s. ISBN: 978-80-247-1267-3.

Van den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E. E., Bevers, M. M. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as source of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update*. 6. 457-474.

Verlhac, M., Kubiak, J., Clarke, H., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. 1017-1025.

Villa-Diaz, L. G., Miyano, T. 2004. Activation of p38 MAPK During Porcine Oocyte Maturation. *Biology of Reproduction*. 71. 691-696.

Viveiros, M. M., Hirao, Y., Eppig, J. J. 2001. Evidence That Protein Kinase C (PKC) Participates in the Meiosis I to Meiosis II Transition in Mouse Oocytes. *Developmental Biology*. 235(2). 330-342.

Viveiros, M. M., O'Brien, M., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. 2003. Characterization of Protein Kinase C- δ in Mouse Oocytes Throughout Meiotic Maturation and Following Egg Activation. *Biology of reproduction*. 69. 1494-1499.

Wang, W. H., Sun, Q. I., Hosoe, M., Shioya, Y., Day, B. N. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56. 1376-1382.

Wang, R. U. I. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. 16(13). 1792-1798.

Wartenberg, H., Breucker, H., Holstein, A. H., Dvořák, M., Tesařík, J. 1990. Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. In: Hinrichsen, V. K., Beier, M. H., Breucker, H., Christ, B., Duncker, R. H., Dvořák, M., Gaudecker, B., Dorsche, H. H., Holstein, A. F., Jacob, J. H., Jacob, M., Jorch, G., Kaufmann, P., Kostkovic, I., Prindull, G., Seidl, W., Steding, G., Tesařík, J., Wartenberg, H. (eds). Humanembryologie. Springer Berlin Heidelberg. Berlin. p. 745-822. ISBN: 978-3-622-07815-0.

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

Wassarman, P. M., Mortillo, S. 1991. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. International Review of Cytology. 130. 85–110.

Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. The Journal of biological chemistry. 283(36) 24285–24289.

Watanabe, N., Vandeoude, G., Ikawa, Y., Sagata, N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos protooncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. Nature. 342. 506–511.

Wang, T. R., Yan, L. Y., Yan, J., Lu, C. L., Xia, X., Yin, T. L., Zhu, X. H., Gao, J. M., Ding, T., Hu, W. H. 2014. Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during grow in vitro. Human Reproduction. 29. 568-576.

Way, J. K., Chou, E., King, L. G. 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. Trends in Pharmacological Sciences. 21 (5). 181-187.

Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. Developmental Biology. 143. 162-72.

Wolansky, M. J., Harrill, J. A. 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. Neurotoxicology and Teratology. 30. 55-78.

Wu, Y., Song, W. 2013. Regulation of RCAN1 translation and its role in oxidative stress-induced apoptosis. FASEB Journal. 27(1). 208-221.

Yanagimachi R. 1981. Mechanism of fertilisation *in* mammals In: Fertilisation and embryonic development *in vitro*. Eds. Mastroianni L. a Biggers J. D., Plenum Press. New York. 81–182.

- Yazdanbakhsh, K., Choi, J. W., Li, Y., Lau, L. F., Choi, Y. 1995. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *This Issue*. 92(2). 437-441.
- Yew, N, Mellini, M., Vande Woude, G. 1992. Meiotic initiation by the Mos protein in *Xenopus*. *Nature*. 355. 649–652.
- Yu, H. T. 2002. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology*. 14. 706-714.
- Yu, L., Haddy, A., Rusnak, F. 1995. Evidence That Calcineurin Accommodates an Active Site Binuclear Metal Center. *Journal of the american chemical society*. 117(40). 10147-10148.
- Yuan, C., Wang, C., Gao, S. Q., Kong, T. T., Chen, L., Li, X. F., Song, L. , Wang, Y. B. 2010. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility *in vitro* evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicology in Vitro*. 24. 382-386.
- Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Subramanian, M. G. 1987. Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*. 262(2). 565–70.
- Zhang, X., Khimji, I., Shao, L., Safae, H., Desai, K., Keles, H. O., Demirci, U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*. 7(4). 553–564.
- Zhao, G., Jeoung, N. H., Burgess, S. C., Rosaaen-Stowe, K. A., Inagaki, T., Latif, S., Shelton, J. M., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Harris, R. A., Richardson, J. A., Klierer, S. A. 2008. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 294. 936-943.
- Zhao, W., Zhang, J., LU, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous K(ATP) channel opener. *EMBO. J*. 20. 6008-6016.
- Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 75-82(8).
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J. 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*. 11(5). 631-6.

Zuckerman, S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress in Hormone Research*. 6. 63–108.

Zuckerman, S., Baker, T. G. 1977. The development of the ovary and the process of oogenesis. In: *The Ovary*: Zuckerman, S., Weir, B. J., eds. New York: Academic Press. 41–67.