

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Lokalizace a redistribuce enzymů produkujících oxid uhelnatý během meiotického zrání prasečích oocytů

Diplomová práce

Autor práce: David Němeček

Vedoucí práce: Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Lokalizace a redistribuce enzymů produkujících oxid uhelnatý během meiotického zrání prasečích oocytů jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Rád bych touto cestou mnohokrát poděkoval Ing. Mgr. Tereze Krejčové Ph.D. za vedení diplomové práce, za pomoc a spolupráci při získávání výsledků jakož i za cenné rady a připomínky. Rovněž bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu a zpracování diplomové práce.

Lokalizace a redistribuce enzymů produkujících oxid uhelnatý během meiotického zrání prasečích oocytů

Souhrn

Meiotické zrání je důležitou částí oogeneze. Tento proces může podstoupit jen plně dorostlý, meioticky kompetentní oocyt, který se nachází ve stádiu zárodečného váčku (GV). Dochází při něm k prolomení prvního meiotického bloku a následnému postupu z fáze diplotene profáze prvního meiotického dělení až do metafáze druhého meiotického dělení, kdy je meióza zastavena v druhém meiotickém bloku. Během meiotického zrání dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD), enzymatickým změnám, rozdělení chromozomů a vydělení prvního pólového tělíška. Plnohodnotný průběh meiotického zrání je klíčovým dějem předcházejícím vzniku oplozeníschopného oocytu.

Meiotické zrání ovlivňuje mnoho faktorů a jedním z nich může být i oxid uhelnatý (CO). CO patří mezi tzv. gasotransmitery, což jsou endogenně enzymaticky syntetizované plynné molekuly podílející se v organismu na přenosu signálů. CO je tvořen katabolismem hemu pomocí enzymu hemoxygenázy (HO). Jsou známy dva funkční izoenzymy hemoxygenázy, tj. HO – 1 a HO – 2. Oba tyto izoenzymy byly lokalizovány v různých částech reprodukční soustavy samic, ale nebylo známo, zda se nacházejí i v oocytech. Z tohoto důvodu byla stanovena hypotéza, že HO – 1 a HO – 2 jsou v oocytech lokalizovány a dochází k jejich intracelulární redistribuci během meiotického zrání prasečích oocytů. Cílem této práce bylo tuto hypotézu ověřit.

Pro experimenty byly použity prasečí oocyty získané z odporážených prasniček nacházejících se v neznámé fázi estrálního cyklu. Získané oocyty byly podle délky kultivace rozděleny do tří stádií meiotického zrání, tj. do stádia GV, metafáze prvního meiotického dělení (MI) a do metafáze druhého meiotického dělení (MII). Izoenzymy HO – 1 a HO – 2 byly detekovány imunocytochemickou metodou.

Izoenzymy HO – 1 a HO – 2 byly lokalizovány ve všech stádiích meiotického zrání a ve všech hodnocených oblastech oocytů, tj. v oblasti jádra, cytoplazmy a korové oblasti. Vyhodnocením redistribuce bylo zjištěno, že v případě HO – 1 nedochází ke statisticky významným změnám v lokalizaci tohoto izoenzymu uvnitř prasečího oocytů během meiotického zrání. U HO – 2 byl vyhodnocen statisticky významný pokles intenzity signálu v prasečím oocytu během meiotického zrání s nejvyšší hodnotou relativní intenzity signálu ve stádiu GV a nejnižší ve stádiu MII.

Lokalizací HO – 1 a HO – 2 v prasečích oocytech během meiotického zrání byla vědecká hypotéza potvrzena. Kvůli přítomnosti izoenzymů HO v oocytech lze předpokládat i přítomnost gasotransmiteru CO a jeho zapojení do signalizačních dějů. Ze změny v zastoupení HO – 2 lze uvažovat o zapojení CO do regulace meiotického zrání. Nicméně tyto předpoklady je potřeba prověřit dalším výzkumem.

Klíčová slova: *hemoxygenáza, meiotické zrání, oocyt, oogeneze, oxid uhelnatý.*

Localization and redistribution of enzymes producing carbon monoxide during meiotic maturation of porcine oocytes

Summary

A meiotic maturation is an important part of an oogenesis. This process may undergo only within a fully grown, meiotic competent oocyte, which is located at the stage of the germinal vesicle (GV). It occurs during a breach of a first meiotic arrest and the subsequent procedure of diplotene stage of the prophase of the first meiotic division into the metaphase of the second meiotic division when meiosis is stopped in the second meiotic arrest. During the meiotic maturation the germinal vesicle breakdown (GVBD), enzymatic changes, the separation of chromosomes and division of the first polar body occur. Full-featured course of meiotic maturation is a key factor of prior establishment of fertilizable oocyte.

Meiotic maturation is influenced by many factors and one of them might be carbon monoxide (CO). The CO belongs to the gasotransmitters, which are endogenously enzymatically synthesized gaseous molecules involved in a signal transduction in an organism. The CO is formed by the heme catabolism mediated by heme oxygenase (HO). There are two functional isoenzymes of heme oxygenase known, i. e. HO – 1 and HO – 2. Both these isoenzymes are localized in different parts of the female reproductive system, but it was unknown whether they are also present in oocytes. For this reason, it was determined hypothesis that HO – 1 and HO – 2 are localized in oocytes and that they are intracellular redistributed during meiotic maturation of porcine oocytes. The aim of this study was to verify this hypothesis.

Porcine oocytes obtained from slaughtered gilts in unknown phase of estrous cycle were used for the experiments. Obtained oocytes were subsequently cultured and grouped by the three stages of meiotic maturation, i. e. to the GV, metaphase of the first meiotic division (MI) and metaphase of the second meiotic division (MII). Isoenzymes HO – 1 and HO – 2 were detected by immunocytochemical method.

Isoenzymes HO – 1 and HO – 2 were located in all stages of meiotic maturation and in all evaluated areas of oocytes, i. e. in the nucleus, cytoplasm and cortical areas. By the evaluation of redistribution, it was found that the HO – 1 does not statistically significantly change in the localization of this isoenzyme during the meiotic maturation of porcine oocyte. For HO – 2, statistically significant declining of signal intensity was evaluated during meiotic

maturation of porcine oocytes with the highest relative signal intensity at the GV stage and the lowest in the MII stage.

By localization of HO – 1 and HO – 2 in porcine oocytes during meiotic maturation, the scientific hypothesis was confirmed. Due to the presence of HO isozymes in oocytes, the presence of CO gasotransmitter and its involvement in signaling processes could be expected. From changes in the representation of HO – 2 could be considered the involvement of CO in regulation of meiotic maturation. However, these assumptions need to be investigated by further research.

Key words: *heme oxygenase, meiotic maturation, oocyte, oogenesis, carbon monoxide.*

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 9 |
| 2. Vědecká hypotéza a cíle práce..... | 10 |
| 3. Literární rešerše | 11 |
| 3.1. Oogeneze a folikulogeneze | 11 |
| 3.1.1. Formování a migrace primordiálních zárodečných buněk | 11 |
| 3.1.2. Oogonie a vznik oocytů | 13 |
| 3.1.3. Vývoj oocytů..... | 14 |
| 3.1.4. Postnatální obnova oocytů | 15 |
| 3.1.5. Růst oocytu | 16 |
| 3.1.6.1. Folikulogeneze..... | 18 |
| 3.1.6.2. Vznik primordiálních folikulů | 19 |
| 3.1.6.3. Vznik primárních folikulů | 20 |
| 3.1.6.4. Vznik sekundárních folikulů..... | 21 |
| 3.1.6.5. Vznik antrálního folikulu..... | 23 |
| 3.1.6.6. Charakteristika folikulárního růstu | 24 |
| 3.1.7.1. Meiotické zrání | 26 |
| 3.1.7.2. První meiotický blok a obnovení meiotického zrání | 29 |
| 3.1.7.3. Význam EGF v meiotickém zrání | 31 |
| 3.1.7.4. Význam MPF..... | 31 |
| 3.1.7.5. Význam MAPK | 33 |
| 3.1.7.6. Význam APC/C a cytotatického faktoru..... | 34 |
| 3.1.7.7. Význam kumulární expanze | 36 |
| 3.2. Oxid uhelnatý a hemoxigenáza | 37 |
| 3.2.1. Gasotransmitery | 37 |
| 3.2.2. Oxid uhelnatý..... | 37 |
| 3.2.3. Fyziologické účinky oxidu uhelnatého | 40 |
| 3.2.4. Význam CO v reprodukčním systému..... | 42 |
| 4. Materiál a metodika | 47 |
| 4.1. Získávání a výběr oocytů pro experimentální účely | 47 |
| 4.2. Postup kultivace oocytů | 47 |
| 4.3. Lokalizace enzymů produkujících oxid uhelnatý | 47 |
| 4.4. Statistické hodnocení | 49 |
| 4.5. Experimentální schéma..... | 49 |
| 5. Výsledky | 51 |
| 6. Diskuze | 63 |
| 7. Závěr | 67 |
| 8. Seznam literatury | 68 |

1. Úvod

Meiotické zrání je důležitou částí oogeneze, při němž dochází k dějům, jejichž výsledkem je vznik oplozeníšchopného oocyty. Do procesu meiotického zrání může vstoupit v reakci na určitý stimul jen plně dorostlý, meioticky kompetentní oocyt. Tento oocyt je ve stádiu zárodečného váčku (GV) a nachází se v prvním meiotickém bloku. Oocyt v průběhu meiotického zrání vystoupí z prvního meiotického bloku, dokončí první meiotické dělení a vstoupí do metafáze druhého meiotického dělení. Zde je meiotické dělení opět zastaveno v druhém meiotickém bloku a oocyt, který úspěšně prošel meiotickým zráním a nachází se v tomto bodu, je připraven na oplození spermií. Díky důležitosti meiotického zrání pro vznik oplozeníšchopných oocytů je poznání faktorů, které tento proces regulují, považováno jako velmi důležité. Oxid uhelnatý (CO), jenž je důležitým gasotransmiterem, by faktorem ovlivňujícím meiotické zrání mohl být.

Gasotransmitery jsou endogenně produkované plynné molekuly podílející se v těle na přenosu signálů. Za endogenní tvorbu CO je zodpovědný enzym hemoxygenáza, který se v organismu vyskytuje ve dvou funkčních izoenzýmech, hemoxygenáza – 1 (HO – 1) a hemoxygenáza – 2 (HO – 2). Přítomnost HO – 1 a HO – 2 byla prokázána v různých částech samičí reprodukční soustavy, nicméně jeho lokalizace v oocytech během meiotického zrání byla neznámá. Z tohoto důvodu je cílem této práce lokalizovat HO – 1 a HO – 2 v oocytech během meiotického zrání.

Prokázání enzymu hemoxygenázy v oocytech během meiotického zrání by mohlo naznačit další směr výzkumu zabývajících se významem tohoto enzymu a jeho produktů v oocytech. Získané poznatky by mohly umožnit lépe poznat tento proces a zároveň by mohly být aplikovatelné do lidské asistované reprodukce nebo reprodukční biotechnologie zvířat, neboť plnohodnotné meiotické zrání je důležitou částí vzniku kvalitních oplozeníšchopných oocytů.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Stanovili jsme hypotézu, že oxid uhelnatý, endogenně produkováný enzymy hemoxygenázou – 1 a hemoxygenázou – 2, je zapojen do řízení průběhu meiotického zrání prasečích oocytů.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu prostřednictvím lokalizace enzymů hemoxygenázy – 1 a hemoxygenázy – 2 a sledováním jejich intracelulární redistribuce během meiotického zrání prasečích oocytů.

3. Literární rešerše

3.1. Oogeneze a folikulogeneze

U savců začíná oogeneze brzy během prenatalního vývoje. Nejdříve dochází ke vzniku primordiálních zárodečných buněk, ze kterých vzniknou oogonie a z nich následně oocyty. Oogeneze je citlivě řízený proces, během něhož vzniká velké množství oocytů, jenž jsou buňkou, která má po spojení se spermií jedinečnou schopnost umožnit vznik nového jedince (Wassarman and Albertini, 1994).

Proces formování oocytů zahrnuje několik kroků. Je to vytváření primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells, PGC), migrace PGC do budoucích gonád, kolonizace základu gonád PGC, diferenciací PGC v oogonie, iniciace meiózy, zastavení meiózy ve fázi diplotene prvního meiotického dělení v tzv. prvním meiotickém bloku. Během této fáze probíhá růst oocytů, který je nutný k získání meiotické kompetence. Stimulační faktory iniciují obnovení meiózy a postup do metafáze druhého meiotického dělení. V metafázi druhého meiotického dělení je meióza opět zastavena v tzv. druhém meiotickém bloku (Hurk and Zhao, 2004). Pokud má meióza pokračovat, musí oocyt dostat aktivační stimul, který přináší v *in vivo* podmínkách spermie a toto spojení spermie a zralého oocytu je základem pro vznik nového jedince (Wassarman and Albertini, 1994).

3.1.1. Formování a migrace primordiálních zárodečných buněk

V embryích všech druhů savců jsou v rané fázi vývoje vyčleněny určité buňky jako progenitory pohlavních buněk (Alberts et al., 2007). Těmito progenitory jsou PGC, které se mohou vyvinout v samičí i samčí pohlavní buňky (Picton et al., 1998). U savců je pohlaví embrya geneticky determinováno v okamžiku fertilizace (Sadler, 2011).

PGC lze pomocí různých metod identifikovat (např. dle velikosti, morfologie, barvitelnosti jejich cytoplazmy) a díky tomu lze určit dobu, kdy dochází k jejich vzniku a zároveň je možné sledovat jejich přesun do základu gonád. Rovněž je možné určit množství těchto buněk (Wassarman and Albertini, 1994).

PGC vznikají v epiblastu (ektoderm) a brzy během vývoje se přesouvají k povrchu žloutkového váčku, kde se nacházejí mezi entodermovými buňkami v blízkosti allantois. Vývoj PGC začíná brzy po fertilizaci. U mnoha organismů (např. u ryb, žab a bezobratlých) obsahuje neoplozený oocyt specifické molekuly, které jsou lokalizovány v určitém regionu cytoplazmy. Tyto molekuly determinují jaké buňky se stanou zárodečnými buňkami. Když je

oocyt oplodněn a začne se během raného embryonálního vývoje opakovaně dělit, dochází k asymetrickému rozdělování těchto molekul do dceřiných buněk. Buňky embrya, které tyto molekuly získají při dělení, se následně stanou PGC. Naproti tomu u jiných živočišných druhů (u savců) cytoplazma oocytu neobsahuje determinanty zárodečných buněk a místo toho signály z okolních buněk určují, které buňky se stanou PGC. Například u myši dochází 6 dní po fertilizaci oocytu v buňkách na povrchu embrya k syntéze specifických faktorů. Tyto faktory slouží jako signál, který vyvolá u několika buněk v přilehlé části změny. Tyto změny způsobí, že se z těchto buněk následně stanou prekurzory PGC (Alberts et al., 2007). Parakrinní faktory důležité pro vznik a vývoj PGC jsou odvozené z extra – embryonálního ektodermu a viscerálního entodermu. Patří sem proteiny z tzv. rodiny transformačních růstových faktorů beta (transforming growth factors beta, TGF – β), jako jsou kostní morfogenetické faktory (bone morphogenetic proteins, BMP), přesněji BMP4, BMP8b a BMP2 (Sánchez and Smitz, 2012).

Prekurzory PGC se mitoticky dělí a nashodují se v nich procesy, díky kterým se z nich stanou PGC. Procesy například zahrnují vypnutí řady genů určujících charakter somatických buněk a dále zapnutí genů podílejících se na udržení specifického charakteru zárodečných buněk (Alberts et al., 2007).

V dalším období vývoje začnou PGC migrovat améboidními pohyby dorsálním mesenteriem zadního střeva. Cílem jejich cesty je genitální lišta (Sadler, 2011). Během migrace jsou PGC vnímavé na řadu signálů pocházejících z ostatních PGC a z okolních tkání (Wylie, 1993). Schopnost PGC migrovat přesným směrem je dána souborem jejich vlastností. Zahrnují možnost aktivně se pohybovat a rovněž reagovat na chemotaktické podněty (Picton et al., 1998). Chemotaktické podněty jsou vylučovány přímo ze základu gonád a mimo navádění PGC zároveň ovlivňují jejich mitotickou aktivitu. Mezi látky s chemotaktickým účinkem může patřit TGF - β 1, dále interakce kit receptoru a kit ligandu (kit - kit ligand) a působení aktivinu (Hurk and Zhao, 2004).

Na migraci PGC má vliv kontakt se substrátem, po kterém se pohybují. Právě při tomto kontaktu je důležitá interakce kit – kit ligand (Hurk and Zhao, 2004). Kit receptor je členem rodiny tyrozinkinázových receptorů a jeho ligandem je faktor zárodečných buněk (stem cell factor, popisovaný jako kit ligand nebo i steel factor) (Wassarman and Albertini, 1994). U myši se kit receptor vyskytuje ve větším množství v PGC během migrace. Vymizí, jakmile u oogonií začne meióza a stane se opět detekovatelný v době, kdy oocyt vstupuje do diplotenní fáze meiózy. Změna v množství kit receptoru může rovněž usnadňovat vznik primordiálních folikulů (Driancourt et al., 2000).

Během migrace PGC dochází k jejich proliferaci. Interakce kit - kit ligand stimuluje proliferaci PGC. Množení PGC dále ovlivňuje fibroblastový růstový faktor - 2 (fibroblast growth factor - 2, FGF - 2), interleukin 4, tumor necrosis factor - α (TNF - α) a pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) (Dolci et al., 1993). Role aktivinu na proliferaci PGC závisí na živočišném druhu. U lidí působí proliferaci a zvýšení množství PGC (Martins da Silva et al., 2004), naproti tomu u myši proliferaci inhibuje (Richards et al., 1999).

Po usídlení v základu gonád ztrácejí PGC schopnost pohybovat se (Picton et al., 1998). PGC vykazují vysokou mitotickou aktivitu a díky tomu dochází k zvětšování počtu buněk. Po přesunu do základu gonád dochází ke snižování mitotické aktivity, která se nakonec během vývoje zastaví (Wassarman and Albertini, 1994). PGC jsou důležité nejen pro tvorbu pohlavních buněk, nýbrž i pro vývin gonád. Při absenci PGC v základu gonád nedochází k jejich vývinu (Sadler, 2011).

3.1.2 Oogonie a vznik oocytů

Jakmile se PGC dostanou do základu gonád, podstoupí v závislosti na chromozomální výbavě diferenciaci. Vzniknou z nich oogonie nebo spermatogonie, které oboje vykazují vysokou mitotickou aktivitu (Picton et al., 1998). U samičího pohlaví oogonie podstupují mitotickou proliferaci, se kterou je spojená neúplná cytokineze. Tento proces vede k vytvoření skupin buněk, které jsou navzájem spojené pomocí cytoplazmatických můstků. Tyto skupiny jsou nazývány „germ cell cysts“ nebo „germ cell nests“ (Pepling, 2006). Pomocí cytoplazmatických můstků dochází k přenosu různých molekul a organel mezi jednotlivými buňkami (Pepling and Spradling, 1998). U druhu *Drosophila melanogaster* vzniká z jedné zárodečné cysty pouze jeden oocyt a ostatní buňky z této cysty se stanou podpůrnými buňkami. Zdá se však, že u myši k tomuto ději nedochází a z jedné cysty vzniká po jejím rozpadu více oocytů. Rozpad zárodečných cyst je popisován jako tzv. cyst breakdown (Pepling and Spradling, 2001). Během tohoto procesu zaniká z každé cysty několik buněk pomocí programované buněčné smrti (Buszczak and Cooley, 2000). Dle pokusů autorů Greenfeld et al. (2007) se zdá, že pro rozpad cyst je programovaná smrt buněk nezbytná.

Ještě před formováním folikulu je mitotické dělení zastaveno a oogonie zahájí meiózu (Sánchez and Smits, 2012). Zahájení meiózy je závislé na působení retinové kyseliny a STRA8 (stimulated by retinoic acid gene 8 protein homolog). STRA8 je cytoplazmatický protein, který je tvořen v oogoniích těsně před vstupem do profáze prvního meiotického

dělení jako odpověď na působení retinové kyseliny. STRA8 je důležitý pro poslední replikaci DNA před vstupem do meiózy a dále pro děje probíhající během profáze meiózy I (Bowles et al., 2006, Zhou et al., 2008). V ováriích prasete vstoupí zárodečné buňky do meiózy zhruba 47. den březosti (Bielanska-Osuchowska, 2006). Po vstupu do meiózy se z oogonií stanou primární oocyty (Alberts et al., 2007).

3.1.3. Vývoj oocytů

Před vstupem do meiózy se každý chromozom oocytu skládá ze dvou chromatid, které jsou pevně spojené pomocí proteinového komplexu kohesinů. Pro správný průběh prvního meiotického dělení je důležité, aby došlo ke správnému párování homologních chromozomů a následnému vzniku tzv. bivalentů (Alberts et al., 2007). Během dlouhé profáze prvního meiotického dělení oocytu projdou fázemi leptotene, zygotene, pachytene a ve fázi diplotene je vývoj zastaven (první meiotický blok) (Hurk and Zhao, 2004). Prodloužená fáze vývoje oocytu během fáze diplotene je rovněž nazývána jako dictyate (Hunt and Hassold, 2008). Před fází leptotene je možné zařadit preleptotenní stádium, které je popisováno jako fáze po posledním mitotickém dělení oogonií (Wassarman and Albertini, 1994). Jedním ze zásadních dějů, který při profázi prvního meiotického dělení probíhá, je genetická rekombinace mezi homologními chromozomy (Alberts et al., 2007).

V době před pohlavní dospělostí nejspíše není dostatečná endokrinní stimulace na „prolomení“ prvního meiotického bloku a tím na pokračování meiózy (Wassarman and Albertini, 1994). Pro získání meiotické kompetence musí oocyt ještě růst a mnohokrát zvýšit svůj objem. Schopnost podstoupit meiotické zrání dosáhne oocyt mnohem později během vývoje a získání této vlastnosti koreluje s časem formování antrálního folikulu (Picton et al., 1998). Podle toho, o jaký živočišný druh se jedná, zůstane oocyt v prvním meiotickém bloku několik dní až mnoho let (Alberts et al., 2007).

Během prvního meiotického bloku, primární oocyty rostou a dochází k syntéze *zony pellucidy* a kortikálních granul (Alberts et al., 2007). Růst oocytů začíná před a pokračuje i po formování vlastního folikulu (Hurk and Zhao, 2004). Během růstu oocytu se ooplazma stává zásobárnou RNA, proteinů a dalších látek. Dochází i k vnitrobuněčným změnám, které poskytují vývojovou kompetenci (Picton et al., 1998). Díky těmto skutečnostem je oocyt ve fázi prvního meiotického bloku větší než-li oogonie, obsahuje více cytoplazmatických organel a dále, což je nejdůležitější, jeho DNA prošla rekombinací mezi mateřskými a otcovskými chromozomy (Picton et al., 1998).

Další fází oogeneze je meiotické zrání. Meiotické zrání znamená obnovení meiózy zastavené v prvním meiotickém bloku. Nicméně meiotické zrání většinou neproběhne dříve než v pohlavní dospělosti (Alberts et al., 2007).

V době pohlavní dospělosti, kdy se začínají vyskytovat změny v hladinách pohlavních hormonů, dochází u meioticky kompetentních oocytů k dokončení prvního meiotického dělení. Během meiózy I dochází k rozdělení chromozomů a cytoplazmy. Cytoplazma je však rozdělena asymetricky. Vzniknou dvě buňky: pólové tělísko, které neobsahuje skoro žádnou cytoplazmu a velký sekundární oocyt (Wassarman and Albertini, 1994, Alberts et al., 2007). Rozdělení chromozomů je zprostředkováno dělicím aparátem. U oocytu se v cytoplasmě nachází více tzv. mikrotubuly organizujících center (microtubule organizing centers, MTOCs), zatímco centrioly zmizí v rané fázi oogeneze. U zrajícího oocytu MTOCs vytvářejí útvary nazývané astery. To je umožněno díky polymerizaci mikrotubulů. Během meiotického zrání dochází po rozpadu zárodečného váčku (GVBD) k připojení mikrotubulů z asterů k chromozomům a zároveň k jejich vzájemnému propojení. To následně umožňuje rozdělení chromozomů (Eichenlaub – Ritter, 2012). Po vydělení prvního pólového tělíska meióza pokračuje a oocyt vstoupí do druhého meiotického dělení. Postup meiózou je ale zastaven v metafázi II v druhém meiotickém bloku (Alberts et al., 2007). V tomto stádiu oocyty zůstávají až do chvíle, kdy dostanou aktivační stimul prostřednictvím oplození spermií. Další možností obnovení meiózy je, že oocyt prodělá partenogenetickou aktivaci. Dále mohou oocyty podstoupit apoptózu (Wassarman and Albertini, 1994). V případě oplození oocytů zastavených v metafázi II dochází následně k vyloučení druhého pólového tělíska s haploidní sestavou chromozomů (Eichenlaub-Ritter, 2012).

3.1.4. Postnatální obnova oocytů

Podle teorie Zuckermana (1951) je množství jednou vytvořených oocytů definitivní a postnatálně dochází pouze ke snižování jejich počtu. Tato teorie předpokládá, že v dospělosti u samičího pohlaví neexistují kmenové buňky, které by se podílely na obnově pohlavních buněk. Podle výpočtu vyjádřených z míry degradace oocytů lze vypočítat, že ke kompletnímu vyčerpání zásoby pohlavních buněk by mohlo dojít velice brzy v dospělosti (Hurk and Zhao, 2004). Práce autorů Johnson et al. (2004) však vnáší do této teorie pochybnosti a připouští postnatální obnovu oocytů. V práci Johnson et al. (2005) je jako zdroj zárodečných buněk pro obnovu oocytů považována kostní dřeň. Bukovski et al. (2004) popisují, že ve vaječníku probíhá obnova zárodečných buněk i folikulů. Formování nových folikulů během

reprodukčního období může kompenzovat atresii velkého množství pohlavních buněk a může zajistit zachování relativně stálého množství folikulů během pohlavního života.

3.1.5. Růst oocyty

Jak je uvedeno výše, oocyt musí nejdříve růst, aby se stal kompetentním, tj. aby byl schopen podstoupit jaderné zrání, oplození a následné buněčné dělení (Hurk and Zhao, 2004). Během růstu oocyty probíhá intenzivní syntéza a příjem molekul, které jsou v oocyty skladovány. Tyto děje slouží v zásadě dvěma cílům. Za prvé jsou určeny pro růst, vývoj a zrání oocytů samotných. Za druhé slouží jako zásoba informací a materiálu potřebných pro první období po oplodnění, kdy ještě embryonální genom není aktivní (Picton et al., 1998). Spolu s obrovským nárůstem syntézy RNA a proteinů, dochází i k enormnímu zvětšování množství organel a k akumulaci mnoha membránových váčků, glykogenových granul, proteinů, lipidových váčků a multivesikulárních tělísek (Hurk and Zhao, 2004).

U rostoucích oocytů probíhá intenzivní syntéza RNA. Během této doby je vytvořena většina RNA, kterou zralý oocyt nakonec obsahuje (Wassarman and Albertini, 1994). V době dosažení plné velikosti oocyty dochází k prudkému poklesu míry transkripce (Picton et al., 1998). Tvorba a uchovávání RNA patří mezi hlavní aktivity rostoucího oocyty. Oocyt obsahuje 200 násobně více RNA a 1000 násobně více ribozomů oproti typické somatické buňce. Pokud se jedná o objemové hodnocení, koncentrace RNA a ribozomů v oocyty není oproti somatické buňce tolik rozdílná (Wassarman and Albertini, 1994). Pro regulaci uchovávání mRNA jsou důležité děje zvané polyadenylace (prodlužování poly – A konce mRNA) a deadenylace (zkrácení poly – A konce mRNA). Některé transkripty jsou syntetizovány pro okamžité použití, u některých ale dochází k deadenylaci. To vede buď k jejich odbourání, nebo určení pro následné skladování. Skladování probíhá v ooplazmě v ribonukleových proteinech (ribonucleoproteins, RNP). Transkripty skladované v RNP se nespojují s ribozomy, naopak dochází k asociaci s maskovacími faktory. Díky tomu nedochází k jejich okamžité translaci (Eichenlaub-Ritter and Peschke, 2002).

Rostoucí oocyt je velmi aktivní v syntéze proteinů různých funkcí. Dále oocyt získává velké množství proteinů pomocí endocytózy. Po GVBD dochází k poklesu syntézy proteinů (Picton et al., 1998).

Mnoho organel mění svojí stavbu a buněčnou lokalizaci. Dochází k přibližování některých organel k vnější membráně oocyty (Hurk and Zhao, 2004). Jádro během růstu oocyty zvětšuje svojí velikost. V porovnání se zvětšováním objemu cytoplazmy je však růst jádra pomalejší. V důsledku toho dochází k výrazné změně v poměru cytoplazmy a

nukleoplasmy. Dochází ke změně poměru ze zhruba 8 : 1 u malého oocyty k 64 : 1 u plně dorostlého oocyty. Jádro obsahuje jedno velké jádro a často ještě jedno nebo dvě menší jádra. Během růstu oocyty dochází rovněž k růstu jádra. Zvětšení jádra je spojeno s progresivní změnou v samotné struktuře jádra. Změna struktury ukazuje na intenzivní tvorbu RNA. Jádro podstoupí přechod z rozptýlené, síťovité struktury do husté, jednotné hmoty (Wassarman and Albertini, 1994).

Růst oocyty je doprovázen nejen podstatným zvýšením počtu mitochondrií, ale i změnou ve struktuře samotných mitochondrií. Malé oocyty obsahují protáhlé mitochondrie s četnými příčnými výběžky. Během růstu oocyty dochází ke zvyšování množství mitochondrií kulatého a oválného tvaru a u plně dorostlého oocyty již mitochondrie tohoto tvaru převažují (Wassarman and Albertini, 1994). Rovněž se mění buněčná lokalizace mitochondrií (Picton et al., 1998) a tvar mitochondriálních krist (Wassarman and Albertini, 1994). Rozdílná lokalizace je způsobena zvýšením množství mitochondrií nacházejících se blízko plazmatické membrány (Picton et al., 1998). V důsledku těchto změn je stavba a rozmístění mitochondrií u plně dorostlého a nerostoucího oocyty výrazně odlišná (Wassarman and Albertini, 1994).

Stejně jako v případě mitochondrií, i Golgiho komplex prochází výraznými změnami. Tyto změny svědčí o jeho rostoucí metabolické činnosti. V malém oocyty se Golgiho komplex nachází v podobě zploštělých stohů klenutých lamel. Během prvních stádií růstu oocyty se Golgiho komplex stává více aktivní (jednotlivé lamely jsou od sebe více vzdáleny). Ve střední až pozdní etapě růstu oocyty Golgiho komplex vykazuje zvýšení počtu širokých lamel. Tyto změny jsou v souladu se zvýšenou účastí Golgiho komplexu při zpracování a koncentraci sekrečních produktů a kortikálních granul (Wassarman and Albertini, 1994). Cisterny Golgiho komplexu jsou z velké části umístěny blízko plazmatické membrány, kde se aktivně podílejí na exportu glykoproteinů do *zóny pellucidy* a formování kortikálních granul, potřebných pro zdárné oplození (Mehlmann et al., 1995).

Jednou z nejvýznamnějších změn v průběhu růstové fáze je právě sekrece glykoproteinové membrány *zóny pellucidy*, která tvoří ochrannou vrstvu kolem oocyty a je tvořena třemi glykoproteiny, ZP1 až ZP3. Pro expresi glykoproteinů *zóny pellucidy* je potřebný transkripční faktor Fig - α (Soyal et al., 2000). *Zona pellucida* je relativně tenká vrstva extracelulární hmoty, která obklopuje ocyt. Objevuje se během růstu oocyty, a jak ocyt roste, zvětšuje svojí šířku. V raných stádiích růstu oocyty glykoproteiny *zóny pellucidy* vytvářejí ostrůvky jemných vláken nacházejících se mezi oocytem a folikulárními buňkami. Jak růst oocyty pokračuje, *zona pellucida* se stává silnější a tvoří jí hustší síť propojených vláken, které plně obklopují ocyt a oddělují ho od folikulárních buněk. *Zona pellucida* však

spojení mezi oocytem a vnitřní vrstvou granulózních buněk nebrání. Spojení totiž pokračuje přes kontakty vzniklé mezi mikroklky oocytu a výběžky folikulárních buněk, které pronikají přes *zonu pellucidu*. Na těchto kontaktech probíhá vzájemná komunikace pomocí gap junctions. Pro růst oocytu je mezibuněčná komunikace s granulózními buňkami pomocí gap junctions nezbytná (Wassarman and Albertini, 1994).

Na konci růstové fáze a před meiotickým zráním získává jádro oocytu charakteristický vzhled. Tento útvar se nazývá zárodečný váček (GV) (Picton et al., 1998). K ukončení růstu oocytu dochází u pohlavně dospělých zvířat před formováním antra ve folikulu (Wassarman and Albertini, 1994).

Růst oocytu je spojený s proliferací granulózních buněk. U pohlavně dospělých zvířat dochází těsně před ovulací k procesu, kdy oocyt znovu zahájí a dokončí první meiotické dělení. K obnovení meiotického zrání může dojít po hormonální stimulaci nebo v *in vitro* podmínkách pomocí kultivace oocytu ve specifickém prostředí. Meiotické zrání je charakteristické rozpadem jaderné membrány oocytu, rozdělením homologních chromozomů, vydělením prvního pólového tělíška a zastavením meiózy v metafázi II, kdy jsou chromozomy seřazeny v metafázní figuře (Wassarman and Albertini, 1994).

3.1.6.1. Folikulogeneze

Pro zdárný průběh oogeneze a folikulogeneze jsou důležité signální faktory vyměňované mezi oocytem a okolními granulózními buňkami. Tyto faktory jsou důležité pro regulaci vývoje folikulárních buněk, jakož i pro samotný vývoj oocytu. Oocyt se podílí na řízení vývoje folikulu, který zahrnuje proliferaci a diferenciaci granulózních buněk. Diferenciace probíhá v buňky, které jsou schopné produkovat adekvátní proteiny a steroidy. Zároveň dochází během vývoje ke zvýšení citlivosti granulózních buněk na gonadotropní hormony. Na druhé straně jsou samotné granulózní buňky nezbytné pro růst oocytu a pro jaderné a cytoplazmatické zrání. Rovněž ovlivňují transkripční aktivitu oocytu. Tyto vlastnosti spolu se zjištěním, že oocyt po dosažení určité velikosti potlačuje schopnost granulózních buněk podporovat další růst oocytu ukazuje, že oocyt určuje nejen růst folikulu, ale nepřímo i svůj vlastní (Hurk and Zhao, 2004).

Jak je uvedeno výše, komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami pomocí gap junction je velmi důležitá. Tento způsob spojení se však nenachází pouze mezi oocytem a okolními granulózními buňkami. Komunikace pomocí gap junctions probíhá také mezi granulózními buňkami navzájem. Folikulární buňky obklopující oocyt nemají funkci pouze v produkci hormonů a růstových faktorů, ale zprostředkovávají i fyzickou podporu, poskytují

živiny a metabolické prekurzory. Navíc přímá komunikace mezi oocyty a granulózními buňkami usnadňuje přenos inhibičních a stimulačních meiotických signálů. Normální vývoj oocyty v *in vivo* podmínkách nemůže probíhat bez podpory somatických buněk folikulu a na druhou stranu odstranění oocyty z folikulu vede k předčasné luteinizaci a následné sekreci progesteronu ve folikulárních buňkách (Picton et al., 1998). Gap junctions jsou složeny z proteinů známých jako connexiny. Proteiny connexiny jsou důležité pro vývoj folikulů, neboť u myši s knockoutovaným genem pro connexin došlo k infertilitě díky selhání folikulárního růstu a poruchám vývoje reprodukčních orgánů (Wright et al., 2001).

Pro procesy folikulogeneze a oogeneze zastává významnou roli programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Apoptóza je důležitým procesem pro udržování funkční zásoby primordiálních folikulů a později během vývoje hraje roli ve folikulární atresii. Na regulaci buněčné smrti se podílí mnoho antiapoptotických a proapoptotických proteinů. Například, pokud chybí Bcl - 2, antiapoptotický člen rodiny proteinů B - cell lymfoma 2, dochází ke snížení počtu oocytů a primordiálních folikulů. Stejnou roli má rovněž Bcl - x (Rucker et al., 2000). Naproti tomu buněčnou smrt podporuje proapoptotický faktor BAX, který je rovněž členem rodiny Bcl - 2. Snížení exprese proteinu BAX v těle vede ke zvýšení počtu zárodečných buněk (Perez et al., 1999). Jako další důležitá signální dráha, která se podílí na regulaci buněčné smrti, je signální dráha kaspáz. Bylo prokázáno, že deficiencie kaspázy 2 vede ke zvýšení počtu primordiálních folikulů (Bergeron et al., 1998).

3.1.6.2. Vznik primordiálních folikulů

Během prvního meiotického bloku začínají tzv. pregranulózní buňky obalovat oocyty a díky tomu se vytváří primordiální folikuly. Z důvodu formování pregranulózních buněk se vytváří okolo oocyty jedna vrstva plochých buněk. Pregranulózní buňky pochází z epiteliálních buněk vaječníku a rovněž z buněk odvozených z mesonefros. Z pregranulózních buněk vznikají během vývoje buňky granulózní (Sawyer et al., 2002). K formování primordiálních folikulů dochází u lidí před porodem během druhého trimestru fetálního vývoje. U myši k tomuto ději dochází až po porodu (Pepling, 2006). U prasete dochází k formování folikulů přibližně v 56 dni březosti. U prasete, stejně jako u dalších živočišných druhů, se první folikuly začnou tvořit v hlubších vrstvách ovariální tkáně (Bielanska-Osuchowska, 2006). Vznik granulózní vrstvy je pro další vývoj oocyty nezbytný, neboť u neobalených oocytů dojde k apoptóze (Pepling and Spradling, 2001).

Důležitým faktorem pro počáteční vytváření primordiálních folikulů se zdá být transkripční faktor Fig α . Při absenci tohoto faktoru dochází k poruchám při vytváření

folikulů (Soyal et al., 2000). Formování primordiálních folikulů dále ovlivňují neurotropiny (Kerr et al., 2009).

V raném stádiu vývoje folikulů somatické buňky tvořící jejich stěny nesyntetizují hormonální látky, ani u nich nedochází k expresi receptorů pro folikuly stimulující hormon (FSH receptor). Dále nelze morfologicky rozlišit buňky théky, které se objeví až mnohem později ve vývoji folikulů. Jednotlivé folikuly zůstanou ve stádiu primordiálního folikulu až do období, kdy jsou rekrutovány do kohorty rostoucích folikulů (Picton et al., 1998).

3.1.6.3. Vznik primárních folikulů

Primordiální folikuly ve vaječnicích zůstávají relativně v klidu až do fáze recruitmentu (Hirshfield, 1991a). Recruitment se dělí na tzv. initial recruitment a cyclic recruitment. Initial recruitment představuje kontinuální proces probíhající aktivací primordiálních folikulů. Cyklický recruitment představuje vybrání několika folikulů, které dosáhnou preovulační velikosti (McGee and Hsueh, 2000). Samotný recruitment znamená nábor primordiálních folikulů do kohorty rostoucích folikulů. Osudem rostoucích folikulů je atresie nebo ovulace (Knox, 2005).

U prasete dochází během reprodukčního období k náboru primordiálních folikulů do kohorty rostoucích folikulů každý den (Knox, 2005). Samotný proces výběru konkrétních folikulů do kohorty rostoucích folikulů může být založen na pořadí, v jakém jsou jednotlivé folikuly formovány (Hirshfield, 1991a). Folikul se začne nazývat primárním v době, když se ploché granulózní buňky obklopující v jedné vrstvě oocyt stanou kubickými (Hurk and Zhao, 2004). Přeměna primordiálních folikulů v primární se odehrává nezávisle na FSH (Meduri et al., 2002).

Recruitment je v podstatě nevratný proces, a proto je důležité aby docházelo k aktivaci jen určité skupiny folikulů a ostatní zůstaly v klidovém stavu (Adhikari and Liu, 2009). Aktivaci primordiálních folikulů řídí rovnováha mezi inhibičními a stimulačními faktory, které jsou systémového a lokálního původu. Důležitou signalizační dráhou vedoucí k aktivaci primordiálních folikulů je signální dráha PTEN/PI3K (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10/phosphatidylinositol 3 kinase). Tato signální dráha je rovněž důležitá v regulaci buněčné diferenciaci a buněčné smrti. Spuštění PI3K signalizační dráhy vede k aktivaci serin/treonin kinázy AKT (protein kináza B), která zvyšuje buněčnou proliferaci a zároveň brání buněčné smrti (Sánchez and Smitz, 2012). Důležitými spouštěči PI3K jsou kit ligand a růstové faktory (Reddy et al., 2005). Růstovými faktory jsou faktory z rodiny růstových faktorů TGF- β jako jsou BMP a růstový diferenciační faktor 9 (growth

differentiation factor 9, GDF-9) (Lee et al., 2001) Kit ligand a jeho receptor jsou zapojené v klíčových dějích kontrolujících iniciaci folikulárního růstu, podporují formování thékálních buněk a stimulují proliferaci granulózních buněk (Nilsson and Skinner, 2004). Ve stádiu primordiálních folikulů, kit ligand produkovaný granulózními buňkami stimuluje růst oocyty přes kit receptor, který je vystavený na membráně oocyty. Kit ligand je nejdříve sekretován do extracelulárního prostředí a poté se naváže na svůj receptor (Montro and Bernstein, 1993).

V protikladu k aktivaci AKT, aktivní PTEN brání spuštění PI3K a tím aktivaci AKT. Aktivovaná kináza AKT fosforyluje transkripční faktor FOX3 (forkhead box 3). FOX3 je důležitý pro expresi proteinů zabraňujících buněčné proliferaci (Sánchez and Smits, 2012). FOX3 je rovněž zapojen do represe aktivace primordiálních folikulů pravděpodobně díky inhibici exprese proteinů důležitých pro folikulogenezi a oogenezi (Liu et al., 2006). Fosforylací FOX3 pomocí AKT dochází k jeho inaktivaci a díky tomu je umožněn vývoj folikulu. Dalším cílem aktivní kinázy AKT jsou proteiny TSC (tuberous sclerosis), což jsou negativní regulátory serin/treonin kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin). Důsledkem aktivace mTOR signální dráhy je pokračující folikulární vývoj. Synergické děje zprostředkované signálními drahami PTEN/PI3K a TSC/mTOR jsou důležité pro regulaci aktivace primordiálních folikulů (Sánchez and Smits, 2012).

Exprese anti – Müllerian hormonu (AMH) v granulózních buňkách je důležitá pro udržení rovnováhy mezi množstvím primordiálních folikulů, které budou aktivovány a mezi těmi, které zůstanou neaktivní. Bylo totiž prokázáno, že u myši mutantních v genu pro *amh* docházelo k navýšení recruitmentu (Durlinger et al., 1999). Efekt AMH na iniciaci růstu primordiálních folikulů byl rovněž prokázán u lidských folikulů (Schmidt et al., 2005).

Jedním z dalších faktorů ovlivňujících aktivaci primordiálních folikulů je aktivin. Působí jako intrafolikulární faktor a může kontrolovat aktivaci primordiálních folikulů. Jeho účinek je ovlivňován dostupností follistatinu (aktivin vázající protein), který snižuje jeho aktivitu (Hurk and Zhao, 2004).

3.1.6.4. Vznik sekundárních folikulů

Sekundárním folikulem se nazývá folikul, u kterého již vznikly dvě a více vrstev granulózních buněk. V tomto stádiu oocyt vstupuje do rozsáhlé růstové fáze, granulózní buňky proliferují a z intersticiálních buněk vaječníku se vyvine vrstva théka, která je okolo vrstvy granulózních buněk (Hurk and Zhao, 2004). Thékální buňky vznikají z fibroblastům podobných buněk ovariálního stromatu (Hirshfield, 1991b). Thékální a granulózní buňky společně podporují vývoj oocyty a vytváří důležité hormony (Erickson et al., 1985).

Vznik a počáteční růst sekundárních folikulů je nezávislý na působení FSH. K jejich vývoji totiž dochází i při absenci hormonů (Fortune and Eppig, 1979). Přeměna primárních folikulů v sekundární je řízena hlavně intraovariálními parakrinními faktory (Kol and Adashi, 1995). Ve fázi sekundárních folikulů se začne okolo oocyty vytvářet *zona pellucida* a rovněž se v cytoplazmě oocyty formují kortikální granula. Folikul se v průběhu této fáze vývoje stává citlivým na působení gonadotropních hormonů (Fair, 2003). Ze začátku má luteinizační hormon (LH) větší význam nežli FSH. LH působí přes LH receptory, které lze prokázat v thékální vrstvě potkaních raných sekundárních folikulů. LH spouští biosyntézu androgenů ve vrstvě théky. Tyto androgeny jsou schopné stimulovat formování FSH receptoru v granulózních buňkách a proto může LH zesilovat efekt FSH na granulózní buňky. Podobnou roli jako LH má i inzulin (Hurk and Zhao, 2004).

V sekundárních folikulech se nenachází enzym aromatáza potřebný pro přeměnu androgenů na estrogeny a díky tomu netvoří estrogeny. Nicméně v *in vitro* podmínkách působí estradiol synergicky s FSH na zvýšení proliferace granulózních buněk ve velkých sekundárních folikulech (Hirao et al., 1994).

Mezi důležité faktory, které ovlivňují vývoj sekundárních folikulů, patří růstové faktory GDF – 9 a BMP – 15. Tyto faktory hrají roli ve vývoji folikulů již od prvních stádií folikulogeneze a jejich vliv pokračuje až do doby ovulace. GDF – 9 je důležitý pro formování sekundárních folikulů, protože u GDF – 9 deficientních myší k jejich vývoji nedochází (dochází k zániku granulózních buněk po stádiu primordiálních folikulů) (Nilsson and Skinner, 2002). GDF – 9 dále kontroluje dostupnost aktivinu a inhibinu (Elvin et al., 1999a). Jak je napsáno výše, další důležitou látkou pro vývoj sekundárních folikulů je BMP – 15. Jeho vliv byl prokázán u ovcí (Galloway et al., 2000). U myší je jeho význam menší, nicméně i zde má na reprodukční funkci vliv (Yan et al., 2001). GDF – 9 i BMP – 15 parakrinně kontrolují tvorbu kit ligandu v granulózních buňkách folikulu. GDF – 9 působí jako inhibitor a BMP – 15 jako aktivátor exprese kit ligandu (Otsuka and Shimasaka, 2002). Kit ligand, který je tvořen v sekundárních a antrálních folikulech, podporuje růst oocyty. Oocyt je díky tomu stimulován k dosažení druhově specifické velikosti a po dosažení této velikosti produkuje GDF – 9, který potlačuje expresi kit ligandu v granulózních buňkách a díky tomu následně dochází ke zpomalování růstu oocyty (Matzuka et al., 2002).

S vývojem, růstem a přežitím sekundárních folikulů jsou spojené další růstové faktory: epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF), TGF, inzulinu podobný růstový faktor (insulin – like growth factor, IGF) a FGF. V *in vitro* podmínkách potlačují apoptózu folikulárních buněk a podporují proliferaci a diferenciaci granulózních buněk (McNatty et al.,

1999). EGF a TGF jsou si strukturně velmi podobné a oba působí přes EGF receptor především na mitogenní aktivitu granulózniých buněk. TGF - β může inhibovat růst folikulárních buněk a usnadňuje jejich diferenciaci. Je to inhibitor proliferace granulózniých buněk u prasnic a krav, ale ne u potkanů. Jedním z faktorů syntetizovaných sekundárním folikulem, který je schopný stimulovat syntézu FSH receptorů, je IGF - 1. Díky syntéze FSH receptorů stimulované IGF - 1 se folikul stává více sensitivní na působení FSH (Zhou et al., 1997).

Další faktory ovlivňující růst folikulu jsou aktivin a AMH. AMH může modifikovat růst pomocí snižování schopnosti folikulů odpovídat na signalizaci pomocí FSH (Hurk and Zhao, 2004).

3.1.6.5. Vznik antrálního folikulu

Formování tekutinou vyplněné dutiny (antra) je charakteristické pro antrální folikul (Hurk and Zhao, 2004). Toto stádium je charakterizováno pokračující proliferací granulózniých buněk a diferenciací somatických buněk obklopujících folikul do *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. Dále dochází k vlastní tvorbě antra a oddělení kumulárních a murálních buněk (Driancourt, 1991). Diferenciace murálních a kumulárních buněk je aktivně podporována samotným oocytem (Sánchez and Smits, 2012). Během folikulárního vývoje dochází k vaskularizaci folikulu a zvýšení propustnosti krevních cév. Tyto děje vedou ke zvýšení velikosti antrálního folikulu (Hurk and Zhao, 2004). Stejně jako v předchozí etapě vývoje mají na přechod pre - antrálního folikulu v časný, antrální folikul, vliv růstové faktory GDF - 9 a BMP - 15. Oba jsou syntetizovány oocytem a ovlivňují proliferaci granulózniých buněk (Otsuka et al., 2000).

Odhaduje se, že u prasete je délka časového intervalu, který začíná od nábory folikulů až do formování antra, zhruba 84 dní (Morbeck et al., 1992). U prasat folikuly velikosti pod 0,7 mm obsahují oocyty neschopné podstoupit meiotické zrání. Některé oocyty z folikulů velikosti 0,8 až 1,6 jsou schopné podstoupit meiotické zrání v *in vitro* podmínkách. U folikulů velikosti 1,7 mm je již schopnost v *in vivo* podmínkách podstoupit meiotické zrání přítomna u většiny oocytů (Hunter, 2000).

Tak jako v předchozích etapách, oocyt aktivně řídí funkce somatických buněk i během antrální fáze. Oocyt pokračuje ve formování proteinů *zony pellucidy*. Dále sekretuje parakrinní faktory, které podporují proliferaci a diferenciaci granulózniých buněk. Odstranění nebo ztráta oocytu vyústí v předčasnou luteinizaci a zvýšení produkce progesteronu v granulózniých buňkách (Hurk and Zhao, 2004).

3.1.6.6. Charakteristika folikulárního růstu

Vývoj folikulu je klasicky charakterizován několika fázemi. Jsou to fáze recruitment, selekce a dominance (Hurk and Zhao, 2004).

U druhů s charakteristickými folikulárními vlnami (jako je např. skot) je popisováno, že na začátku cyklického recruitmentu během estrálního cyklu dochází ke zvýšení sérové hladiny FSH. Folikuly, které mají schopnost odpovědět na zvyšující se hladinu FSH, vstoupí do kohorty rostoucích folikulů (Fair, 2003). Než se antrální folikuly stanou citlivé na stimulaci gonadotropními hormony, musí dosáhnout průměru přibližně 1 mm (prasnice), 2 mm (ovce, primáti), 4 mm (kráva) a 10 mm (klisna). Množství rekrutovaných folikulů se liší dle živočišného druhu i individuálního jedince (5 – 10 u krav, 1 – 4 u koně a přes 50 u prasete). Během jednoho cyklu se vyskytuje různý počet vln (2 – 3 kráva, 3 – 4 ovce, 4 – 5 koza, 1 – 2 klisna) (Driancourt, 2001). U druhů (skot, kůň), kde je průběh folikulárních vln dobře popsán, probíhá následně selekce dominantního folikulu. Po několika dnech růstu folikulů, které vstoupily do kohorty rostoucích folikulů během cyklického recruitmentu, se jeden z nich stane větší než ostatní. Tento větší folikul se stane dominantním a ostatní menší folikuly podlehnou atresii. U dominantního folikulu dochází k syntéze estradiolu (Beg and Ginther, 2006).

U pohlavně dospělé prasnice mají vaječníky vzhled moruše. Tohoto vzhledu je dosaženo díky přítomnosti mnoha antrálních folikulů a žlutých tělísek. Mimo změny během folikulární fáze estrálního cyklu lze na povrchu vaječníků prasnice nalézt stálou zásobu antrálních folikulů o velikosti 1 – 6 mm v průměru. V čase po ovulaci dochází ke zvýšení hladiny FSH, které trvá zhruba do čtvrtého až pátého dne estrálního cyklu. Tato zvýšená hladina FSH umožňuje malým (do 3 mm) a středním (3 až 6,9 mm) folikulům vývoj a snižuje procento folikulů podstupujících atresii (Knox et al., 2003). Po pátém dni estrálního cyklu dochází ke snížení hladiny FSH. S tím je spojeno zvýšení atresie folikulů (Guthrie et al., 1995). V průběhu 14. a 15. dne estrálního cyklu dochází k luteolýze. Díky následnému snížení hladiny progesteronu dochází k druhému zvýšení množství FSH, což je důležité pro proces recruitmentu (Knox et al., 2003). Během folikulární fáze estrálního cyklu dochází na povrchu vaječníků ke snížení počtu malých folikulů (do velikosti 6,5 mm) a objevují se folikuly větší nežli 6,5 mm. K této změně dochází díky tomu, že z rekrutovaných folikulů jsou následně vybrány (selektovány) pre-ovulační folikuly, jejichž cílem bude ovulace (Knox, 2005). Pro další vývoj folikulů a pro proces selekce je důležitá změna ve způsobu sekrece LH. Během luteální a na začátku folikulární fáze estrálního cyklu je hladina LH relativně stabilní (Knox et al., 2003). Fenomén

pulsativní sekrece LH je možné pozorovat až během pokračující folikulární fáze (Driancourt et al., 1995). Základem procesu selekce je syntéza LH receptoru u folikulů, které budou vybrány při procesu selekce. Pulsativní sekrece LH umožňuje u folikulů, které vytvořili LH receptory, pokračovat ve vývoji i přes snižující se hladinu FSH, ke které dochází v průběhu folikulární fáze (Prunier et al., 1993). K selekci dochází rovněž i díky tomu, že malé a střední folikuly ztrácejí receptory pro FSH (Lucy et al., 2001). U folikulů, které nevytvořily LH receptory, dochází díky snížení hladiny FSH k atresii (Prunier et al., 1993).

LH receptory se začínou v granulózních buňkách formovat po dosažení průměru přibližně 4 mm (ovce), 5 – 6 mm (prasnice), 8 mm (kráva) nebo 25 mm (klisna). Díky zvýšení citlivosti na LH a FSH dochází během pár dní k rapidnímu zvětšení selektovaných folikulů oproti ostatním. Tyto folikuly se nazývají dominantní a dosáhnou maximální velikosti 6 – 7 mm (ovce), 8 – 10 mm (prasnice), 15 – 20 mm (kráva) a 35 – 50 mm (klisna) (Driancourt, 2001).

Indikátorem folikulární zralosti je aktivace enzymatického komplexu aromatázy v granulózních buňkách, což umožňuje sekreci estradiolu. Rovněž v době aktivace aromatázy dochází i k syntéze inhibinu (Yen et al., 2005). Během luteální fáze je koncentrace těchto hormonů stabilně nízká. Po luteolýze je pozorováno postupné zvýšení hladiny estradiolu a inhibinu, jejichž zvýšená hladina je detekována v době ovulace, kdy dochází k iniciaci LH vlny (Knox et al., 2003).

Hlavním estrogenem syntetizovaným folikulem je estradiol. Vyšší hladina estrogenů je totiž nezbytná pro další vývoj folikulu. Estrogeny indukují proliferaci granulózních buněk a zároveň jejich diferenciaci v murální nebo kumulární buňky. Estrogeny dále zvyšují citlivost granulózních buněk na gonadotropiny (Findlay et al., 2000). Na regulaci proliferace a míry apoptózy granulózních buněk se rovněž podílí androgeny, které působí přes receptor androgenů (AR). U myši s deficitem AR dochází ke snížení množství antrálních a ovulovaných oocytů. Dále u těchto myši dochází ke zvýšení míry apoptózy granulózních buněk (Hu et al., 2004).

V syntéze estrogenů folikulem se uplatňuje model dva druhy buněk – dva druhy gonadotropinů. Thékální buňky totiž produkují pod vlivem LH androgeny. Tyto androgeny jsou následně použity granulózními buňkami jako substrát pro syntézu estrogenů. Syntéza estrogenů granulózními buňkami je pod vlivem FSH (Hillier et al., 1994). Přítomnost aromatázy umožňuje rekrutovaným folikulům produkovat z androgenních prekurzorů hormon estradiol. LH stimulovaná syntéza androgenů je oslabována thékálním EGF a aktivinem z granulózních buněk. Naopak zesilována je inhibinem rovněž pocházejícím z granulózních buněk. Pro recruitment je kromě adekvátní koncentrace FSH v krvi důležité také vyšší

množství aktivinu než inhibinu a dále zvětšující se koncentrace IGF - 1. FSH stimulovaná přeměna androgenů na estrogeny je zesílena lokální produkcí IGF - 1, aktivinu a proteinů BMP. Tato produkce estrogenů je naopak neutralizována EGF. Působení růstových faktorů je závislé na jejich receptorech a biologická dostupnost těchto faktorů je ovlivněna vazebnými proteiny (BP). FSH snižuje expresi vazebného proteinu pro IGF-1 (IGFBP - 2), což vede ke zvýšení dostupnosti aktivního IGF - 1, který synergicky s FSH zvyšuje folikulární citlivost na gonadotropiny a rovněž zvyšuje aktivitu aromatázy. FSH dependentní inhibice IGFBP - 2 je tudíž důležitým krokem v recruitmentu folikulů do dalšího růstu (Hurk and Zhao, 2004).

Během růstu je rekrutovanými folikuly produkován ve vzrůstajícím množství aktivin vázající protein follistatin. V selektovaných antrálních folikulech způsobí změny v obsahu follistatinu odchýlení od rovnováhy dostupnosti aktivinu a inhibinu. Inhibin se díky tomu stane dostupnějším. Během selekce dochází ke zvyšování intrafolikulární koncentrace IGF - 1 a IGF - 2. Zvýšení dostupného množství inhibinu stimuluje společně s IGF sekreci androgenů. To následně vede i ke zvýšení množství estrogenů. IGF rovněž stimuluje formování LH receptorů v granulózních buňkách a selektované folikuly se díky tomu stávají citlivé na působení LH. U selektovaných folikulů dochází k indukci syntézy FSH receptorů. To jim umožní reagovat na FSH i přes jeho sníženou syntézu, která je způsobená vysokou produkcí estrogenů a inhibinu (Driancourt, 2001). AMH může v této době působit jako inhibitor selekce, neboť snižuje schopnost folikulu odpovídat na působení FSH (Durlinger et al., 2001). Jednou z reakcí na působení LH je tvorba angiogenního faktoru VEGF (vascular endothelial growth factor) v thékálních buňkách. VEGF zvyšuje v thékální vrstvě angiogenezi. Následně zvýšené krevní zásobení folikulu poskytne více živin, kyslíku a stimulačních faktorů (Garrido et al., 1993).

3.1.7.1. Meiotické zrání

Meiotické zrání zahrnuje přeměnu plně dorostlého oocyty ve zralý oocyt. Dochází k němu těsně před ovulací jako odpověď na změny v hladinách gonadotropních hormonů. Pouze oocyty, které úspěšně prošly meiotickým zráním, jsou oplození schopné a mohou se po oplození spermií zdárně vyvíjet (Wassarman and Albertini, 1994). V rostoucím a dominantním folikulu zůstává oocyt v diplotenním stádiu profáze prvního meiotického dělení v prvním meiotickém bloku. Obnovení meiózy je iniciováno preovulační LH vlnou a k obnovení meiózy dochází jen u plně dorostlých, vývojově kompetentních oocytů z dominantních, preovulačních folikulů. Během periody mezi LH vlnou a ovulací probíhá v jádře a cytoplazmě oocytů série výrazných změn (Hurk and Zhao, 2004). Rovněž dochází

ke změnám genové exprese, jakož i k morfologickým a fyziologickým změnám nejen v samotném oocytu, ale také v granulózních buňkách a buňkách théky (Silvestre et al., 2011).

Pro získání vývojové kompetence je nutné, aby oocyt byl schopný podstoupit jaderné zrání a rovněž je potřebná jeho cytoplazmatická zralost. Oocyt získává schopnost podstoupit jaderné zrání v době, kdy je ještě vývojově nekompetentní. Díky tomu musí být udržován ve stavu zárodečného váčku až do doby, kdy dosáhne plné kompetence (Sánchez and Smitz, 2012). Získání meiotické kompetence na konci růstu oocytu je v korelaci se syntézou a akumulací cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1, také označovaná jako $cdc2$ nebo $p34^{cdc2}$) a proteinu cyklinu B (Chesnel and Eppig, 1995).

Jak bylo napsáno výše, pro iniciaci meiotického zrání je důležitá LH vlna. Inhibice sekrece LH nebo inaktivace LH receptorů vede k zabránění zrání oocytu a selhání ovulace. Nicméně přímo v oocytu nebyly detekovány žádné LH receptory, proto signál, který vede ke zrání oocytu po LH vlně, pochází z okolních buněk (Peng et al., 1991). LH se váže na receptory, které se nachází na kumulárních i murálních buňkách folikulu (Amsterdam et al., 1975). Folikul odpovídá na LH vlnu změnou steroidní produkce v granulózních buňkách z estrogenů na progesteron. Reakce dále zahrnuje syntézu hyaluronanu granulózními buňkami. To později vede k mucifikaci a expanzi kumulárních buněk. Tento děj se podílí na porušení kumulo – oocytárního spojení pomocí gap junctions (Picton et al., 1998).

Jak je napsáno výše, LH působí přes LH receptory, což jsou receptory spojené s G proteiny. V LH receptorech se vyskytuje několik typů G proteinů (G_s , G_i a $G_{q/11}$) (Lee et al., 2002). Aktivace přes typ G_s vede k produkci cAMP v granulózních buňkách. Pokud dojde k aktivaci přes G_i nebo $G_{q/11}$, dochází k aktivaci fosfolipázy C, což vede následně ke zvýšení nitrobuňčné hladiny iontů vápníku. Oba tyto děje odehrávající se v granulózních buňkách mohou následně vést u oocytu k rozpadu zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown, GVBD). GVBD je však naproti dějům v granulózních buňkách dosaženo díky snížení hladiny cAMP v oocytu (Hsieh et al., 2007). Aktivace fosfolipázy C v granulózních buňkách vede k hydrolýze fosfatidylinositolu a produkci inositoltrifosfátu a diacylglycerolu. Signalizací fosfolipázy C stimulovaná intracelulární mobilizace Ca^{2+} je rovněž spojená s influxem Ca^{2+} z extracelulárního prostředí. Ke zvýšení hladiny Ca^{2+} v oocytu po LH vlně může dojít pomocí přímého transportu Ca^{2+} z kumulárních buněk. Ke zvýšení může rovněž docházet pomocí transportu inositoltrifosfátu, který následně v oocytu indukuje uvolnění Ca^{2+} . Zvýšení intracelulární hladiny vápníku je důležitým faktorem, který se podílí na řízení meiotického dělení. Ca^{2+} dále ovlivňuje aktivitu proteáz, které mohou odbourávat proteiny

důležité pro buněčný cyklus (Homa, 1995). Ca^{2+} působí přes kalcium/kalmodulin dependentní protein kinázu II (CaMKII). Tato kináza má roli při řízení aktivity MPF (Lorca et al., 1993).

Jaderné zrání trvá asi 24 hodin u krávy a ovce, 44 hodin u prasete a 36 hodin u klisny. Skládá se z několika kroků a dochází při něm k dokončení meiózy I a následnému zahájení meiózy II (Hurk and Zhao, 2004). Jaderné zrání začíná mírným zvlněním jaderné membrány. Následně vymizí jaderné póry a posléze dochází k rozpadu jaderné membrány, neboli k rozpadu zárodečného váčku GVBD (Wassarman and Albertini, 1994). Dalším důležitým dějem jsou změny v mikrotubuly organizujících centrech. Tyto změny jsou důležité pro rozdělení chromozomů (Schuh and Ellenberg, 2007). Zahájení GVBD je iniciováno aktivací CDK1 (Voronina and Wessel, 2003). Po GVBD dochází k rozdělení bivalentů. Důležitým znakem meiotického dělení je, že kinetochory obou chromozomů v každém bivalentu vytvářejí jednu funkční jednotku. Kromě toho, že se kinetochory stanou vazebným místem pro mikrotubuly, vytváří rovněž základ pro důležitou regulační kaskádu nazývanou spindle assembly checkpoint (SAC). SAC představuje velkou skupinu proteinů (Mps1, Bub1, BubR1, MAD1, MAD2 a kináza Aurora) (Holt et al., 2013) a hraje důležitou roli v kontrole, zda je dělicí aparát sestaven správně. Dokud nejsou chromozómy správně napojeny, proteiny SAC oddalují postup meiózou do anafáze (Hoyt, 2001). Zastavení postupu meiózou může být způsobeno vazbou určitých proteinů (např. MAD2) na protein CDC20 (cell division cycle protein 20), který je koaktivátorem enzymového komplexu nazývaného anafáze podporující komplex/cyclosome (anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C). Zablokováním CDC20 je následně zabráněno aktivaci APC/C, který řídí postup meiózou (Eichenlaub – Ritter, 2012). Pro vazbu sesterských chromatid v bivalentech jsou potřebné proteiny nazývané kohesiny (Buonomo et al., 2000). Na začátku anafáze jsou kohesiny odstraněny díky štěpení enzymem separázou. Odstranění kohesinů je pro segregaci chromozomů nezbytné (Kudo et al., 2009).

Vyloučením prvního pólového tělíska je ukončena meióza I. K oddělení homologních chromozomů dochází společně s asymetrickým rozdělením cytoplazmy oocyty. Kromě chromozomů obsahuje pólové tělísko malé množství organel (mitochondrie, ribozomy). Plasmatická membrána pokrývající místo vydělení pólového tělíska je relativně hladká, zatímco zbytek plasmatické membrány oocyty obsahuje mikroklky (Wassarman and Albertini, 1994).

Cytoplazmatické zrání je nutné například pro získání podmínek bránicích polyspermii, dále je nutné po oplození pro dekonenzaci penetrované spermie a tvorbu prvojader. Zahrnuje

redistribuci buněčných organel, migraci mitochondrií do perinukleární polohy a akumulaci kortikálních granul podél oolemy (Hurk and Zhao, 2004).

3.1.7.2. První meiotický blok a obnovení meiotického zrání

Pro udržení první meiotického bloku je důležitá přítomnost granulózních buněk. Pokusy s odstraněním samotného oocytu nebo komplexu kumulus – oocyt z folikulu vedly k obnovení meiózy. Tyto výsledky naznačují, že zdrojem meiotických inhibičních faktorů jsou spíše murální buňky nežli kumulární (Edwards, 1965). Pro přenos inhibičních signálů a díky tomu udržení prvního meiotického bloku jsou důležitá spojení pomocí gap junctions mezi murálními, kumulárními buňkami a oocytem (Sela-Abramovich et al., 2006).

Hlavní vnitřní faktor, který udržuje oocyt v prvním meiotickém bloku, je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Adenylátcykláza je enzymem syntetizujícím cAMP z adenosintrifosfátu (ATP) (Downs et al., 1989). V oocytu se nacházející cAMP může být dvojího původu. Prvním je tvorba cAMP ve folikulárních buňkách a jeho následný transport přes gap junctions do oocytu (Sela-Abramovich et al., 2006). Druhým a pravděpodobnějším způsobem je endogenní tvorba cAMP v oocytu pomocí aktivace receptorů spojených s G proteiny 3 a 12 (GPR3, GPR12). Signalizace pomocí těchto receptorů vede k aktivaci adenylátcyklázy, která tvoří cAMP přímo v oocytu (Vaccari et al., 2008). Důležitou roli v regulaci prvního meiotického bloku zaujímá cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Je tvořen v kumulárních buňkách a po transportu do oocytu pomocí gap junctions zabraňuje aktivaci enzymu cAMP fosfodiesterázy (PDE3A). Enzym PDE3A se nachází v oocytu a je zodpovědný za rozložení cAMP na 5' adenosin monofsfát (5' - AMP) a tím jeho degradaci (Norris et al., 2009). cGMP je vytvářen enzymem guanylylcyklázou (GUCY nebo GC). Existují dvě formy tohoto enzymu, rozpustná GUCY a transmembránová GUCY (Sela-Abramovich et al., 2008). Podle práce Zhang et al. (2010) je za tvorbu cGMP zodpovědný membránový receptor natriuretického peptidu 2 (NPR2, rovněž nazývaného gaunlylcykláza B, GC – B). Díky inhibici PDE3A pomocí cGMP je zabráněno snížení cAMP a tím prolomení prvního meiotického bloku (Norris et al., 2009).

Oocyt se sám podílí na udržení svého meiotického bloku. Oocyt totiž podporuje expresi NPR2 v kumulárních buňkách. NPR2 je aktivován jeho ligandem, prekurzorem natriuretického peptidu typu C (NPPC), který je produkován v murálních buňkách. Aktivace NPR2 pomocí NPPC vede k tvorbě cGMP, který po přesunu do oocytu inhibuje PDE3A (Zhang et al., 2010).

Jak bylo uvedeno výše, důležitou roli během meiotického zrání oocyty má cAMP. Umělé zvýšení hladiny cAMP v oocyty vede k zablokování meiózy. Díky tomu můžeme k tomuto účelu sloužit inhibitory PDE3A (Hurk and Zhao, 2004), membránou propustné analogy cAMP a látky zvyšující aktivitu adenylátcyklázy (Wassarman and Albertini, 1994). Vysoká koncentrace cAMP udržuje první meiotický blok prostřednictvím dráhy cAMP dependentní proteinkinázy A (PKA) (Richard et al., 2001). V oocyty se vyskytují dvě formy PKA. Jsou to PKA1 a PKA2 (Newhall et al., 2006). Ribonukleotid cAMP udržuje meiotický blok díky tomu, že aktivuje PKA, která následně fosforyluje proteiny kontrolující aktivitu CDK1 (Kovo et al., 2006). Důležitým enzymem, který kontroluje aktivitu CDK1, je fosfatáza CDC25. Fosforylace CDC25 pomocí PKA vede k inhibici její defosforylační aktivity. Díky tomu CDC25 potom nemůže odstranit inhibiční fosfáty z CDK1 a tím je zabráněno její funkci (Zhang et al., 2008). PKA inhibuje aktivitu CDK1 nejen prostřednictvím CDC25, ale také pomocí aktivace Wee1B kinázy inhibující CDK1 (Han and Conti, 2006).

Kromě signalizační dráhy PKA se na regulaci meiotického bloku podílí i protein kináza C (PKC) (Downs et al., 2001). Pokud je v *in vitro* podmínkách aplikován diacylglycerol, který je aktivátorem PKC, dochází k inhibici spontánního zahájení zrání oocyty. K této inhibici dochází i při snížené hladině cAMP. Aktivátory PKC inhibují změny v metabolismu fosfoproteinů, které jsou spojené se spontánní aktivací (Wassarman and Albertini, 1994).

Dalším vnitřním faktorem, který zabraňuje meiotickému zrání, je tzv. inhibitor zrání oocyty (oocyte maturation inhibitor, OMI), který je produkován granulózními buňkami. OMI je polypeptid o molekulární hmotnosti okolo 1 - 2 kDa, který byl objeven ve folikulární tekutině mnoha druhů savců, a v *in vitro* podmínkách zabraňuje spontánnímu zahájení meiotického zrání. OMI uplatňuje svůj inhibiční účinek přes kumulární buňky, protože brání meiotickému zrání u oocyty s kumulárními buňkami, ale nezasahuje do meiotického zrání u oocyty kumulárních buněk zbavených (denudovaných). V důsledku toho je pravděpodobné, že OMI je dostatečně malý na to, aby mohl projít pomocí gap junctions z kumulárních buněk do oocyty. Účinek OMI na inhibici meiotického zrání může být nejspíše potencován cAMP (Wassarman and Albertini, 1994).

Meiotické zrání je obnoveno po LH vlně, která vede v oocyty k aktivaci PDE3A, což způsobí drastické snížení hladiny cAMP (Richard et al., 2001). Pro obnovení meiózy je důležitá omezená difúze cGMP z murálních buněk do oocyty a zároveň snížená tvorba cGMP v murálních buňkách. Tuto skutečnost podporuje fakt, že po LH vlně dochází ke snížení syntézy NPPC. Díky snížené tvorbě cGMP ve folikulárních buňkách a následně jeho omezené difúzi do oocyty je umožněna aktivace PDE3A a tím degradace cAMP (Kawamura et al.,

2011). Navíc uzavírání gap junctions po LH vlně díky fosforylaci connexinu 43 působením mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) k tomuto procesu přispívá. K uzavírání gap junctions dochází u všech buněk folikulu (Sela-Abramovich et al., 2005). Dalším důležitým dějem při aktivaci PDE3A je aktivační fosforylace pomocí protein kinázy B (PKB). Ke zvýšení aktivity PKB dojde po LH vlně (Han et al., 2006).

3.1.7.3. Význam EGF v meiotickém zrání

Pro obnovení meiotického zrání po LH vlně je důležitý přenos aktivačního signálu z vnějších buněčných vrstev folikulu do vnitřních. Syntéza a uvolnění ligandu EGF receptorů může být látkou, která tento signál přenáší (Kawamura et al., 2009). EGF receptory se nachází na povrchu murálních i kumulárních buněk. Nenachází se ale na oocytu. Brzy po LH vlně dochází k fosforylaci EGF receptorů a jejich aktivaci (Panigone et al., 2008). Bylo dokázáno, že po aplikaci ligandu EGF receptorů do antrálního folikulu dochází k obnovení meiózy (Park et al., 2004).

Jako ligandy EGF receptorů, které způsobí po LH vlně jejich aktivaci, se zdají být epregrulin, amphiregrulin a β - cellulin. Jsou to polypeptidy, které jsou produkovány v granulárních buňkách. Tyto parakrinní faktory rovněž hrají roli v kumulární expanzi. Jsou syntetizovány jako neaktivní integrální membránové prekurzory. Z těchto membránových prekurzorů jsou uvolňovány do mezibuněčného prostředí pomocí proteolytického štěpení jejich vnější domény, vystavené na vnějším povrchu buňky (Silvestre et al., 2011). Proteolytické štěpení je prováděno pomocí enzymatické aktivity metalloendoproteázy a význam tohoto enzymu lze prokázat při použití inhibitoru metalloendoproteázy galardinu, který zabrání obnovení meiózy po LH vlně (Ashkenazi et al., 2005). Jedním z důležitých dějů po aktivaci EGF receptorů je spuštění signalizační dráhy MAPK v buňkách folikulu. MAPK může být aktivovaná i nezávisle na EGF (Panigone et al., 2008). Jak bylo uvedeno výše, aktivace MAPK vede k uzavírání gap junctions (Sela-Abramovich et al., 2005). Dalším dějem způsobeným aktivací EGF receptoru po LH vlně může být snížení hladiny cGMP (Vaccari et al., 2009). Tohoto snížení může být dosaženo pomocí několika mechanismů a to buď snížením aktivity GUCY, a nebo zvýšením aktivity cGMP fosfodiesterázy. Rovněž mohou oba mechanismy probíhat současně (Silvestre et al., 2011).

3.1.7.4. Význam MPF

Důležitou roli v obnově meiózy zaujímá faktor nazývaný maturation promoting factor (nebo též mitosis promoting factor, MPF). MPF je komplex složený z regulační a katalytické

podjednotky. Cyklin B je regulační podjednotka a kináza CDK1 je katalytickou podjednotkou. Aktivní MPF je schopný fosforylovat proteiny, které tvoří jaderný obal a podílí se na kondenzaci chromatinu a organizaci cytoskeletu (Gordo et al., 2001).

U savců je intracelulární množství CDK1 a cyklinu B jedním z důležitých faktorů, který udržuje oocyty v profázi prvního meiotického dělení. U malých nerostoucích folikulů je dostupnost obou podjednotek MPF nízká a proto musí dojít k jejich syntéze při růstu oocyty (Holt et al., 2013). Plně dorostlý oocyt následně obsahuje zásobu předpřipravených komplexů cyklinu B a CDK1. Tento komplex je v neaktivní formě a nazývá se pre – MPF (Gordo et al., 2001). U plně dorostlých oocytů s dostatečným množstvím pre – MPF se na udržení prvního meiotického bloku podílí hlavně působení cAMP (Holt et al., 2013).

Hladina cyklinu B je důsledně kontrolována. Při poruše v regulaci jeho množství může dojít k předčasnému meiotickému zrání. Proto je u oocyty důležitý poměr mezi syntézou a degradací cyklinu B v různých fázích meiotického dělení. Regulace hladiny cyklinu B je důležitým prostředkem řízení aktivity CDK1 během meiotického dělení (Holt et al., 2013). Degradace cyklinu B je zprostředkována APC/C ve spojení s koaktivátorem FZR1 (fizzy related protein homolog, též nazývaný CDH1, neboli cadherin1) (Peters, 2006). Význam APC/C bude popsán dále.

Pre - MPF je v neaktivní formě udržována pomocí inhibiční fosforylace CDK1 na dvou místech (Tyr15 a Thr14), překrývajících ATP vazebná místa (Ferrell et al., 1991). Inhibiční fosforylaci mohou zajišťovat dvě kinázy: Wee a Myt1 (Mueller et al., 1995). Oocyt obsahuje jedinečnou izoformu Wee kinázy, která se nazývá Wee1B (nebo též Wee2). Wee1B je pozitivně regulována fosforylací pomocí PKA. Positivní fosforylace následně způsobí autofosforylaci Wee1B (Han et al., 2005). Zdá se, že Myt1 a Wee1B působí synergicky na zabránění v postupu meiózou (Oh et al., 2010).

Defosforylace a aktivace CDK1 vyžaduje fosfatázu CDC25 (Lincoln et al., 2002). Pro aktivaci CDK1 je rovněž potřebná aktivační fosforylace. Tato fosforylace probíhá na jiných místech CDK1, nežli inhibiční fosforylace. Aktivační fosforylace je katalyzovaná CDK1 aktivační kinázou (CAK) (Poon et al., 1993). Nicméně, tato fosforylace se na MPF vyskytuje již v době neaktivní pre – MPF. Díky tomu během signalizační dráhy vedoucí k aktivaci pre - MPF na aktivní MPF aktivační fosforylace nehraje velký význam (De Smedt et al., 2002).

Aktivace pre - MPF probíhá v několika krocích. Nejdříve dochází v reakci na aktivační stimul k aktivaci několika pre - MPF na MPF. Aktivované MPF jsou následně schopny posílit aktivaci CDC25 a zároveň inaktivovat Wee1B. Díky tomu vznikne pozitivní zpětná vazba

nazývajících se autoamplifikace MPF. Přeměna pre - MPF na MPF je aktivně řízena samotnou MPF (Palmer et al., 1998).

Studie zabývající se dynamikou cyklinu B naznačují, že dochází k neustálému přesunu komplexu CDK1 – cyklin B mezi jádrem a cytoplasmou (Marangos and Carroll, 2004). V oocytu ve stádiu zárodečného vajíčku převažuje cytoplazmatická lokalizace tohoto komplexu. Je to pravděpodobně způsobeno díky jaderné lokalizaci APC/C (ve spojení s FZR1) a kinázy Wee1B (Oh et al., 2010). Krátce před GVBD dochází ke změnám v buněčné lokalizaci faktorů podílejících se na regulaci CDK1 – cyklin B. Dochází k výraznému zvýšení komplexu CDK1 - cyklin B v jádře (Marangos and Carroll, 2004). Toto zvýšení jaderné lokalizace cyklinu B překoná inhibiční aktivitu APC/C (ve spojení s FZR1), což umožní následnou aktivaci CDK1. Dále díky snížení hladiny cAMP v průběhu meiotického zrání a tím způsobené snížení aktivity PKA vede ke ztrátě aktivity Wee1B a zároveň i k přesunu této kinázy z jádra oocytu do cytoplazmy. Snížení aktivity PKA rovněž zvýší dostupnost CDC25 (Oh et al., 2010).

V průběhu postupu do druhého meiotického dělení je potřebná změna v aktivitě MPF (Picard et al., 1985). Výstup z meiózy I vyžaduje snížení aktivity CDK1, ale v porovnání s mitotickým dělením není toto snížení CDK1 kompletní. Díky tomu je umožněno vstoupit oocytu přímo do druhého meiotického dělení (Holt et al., 2013). Po snížení aktivity MPF je v druhém meiotickém bloku přítomna opět vysoká aktivita MPF. Vysoká aktivita MPF je důležitá pro udržení druhého meiotického bloku (Ito and Kashiwazaki, 2012).

3.1.7.5. Význam MAPK

Důležitým signalizačním dějem, vedoucím po LH vlně k meiotickému zrání, je aktivace MAPK. V savčím oocytu hrají důležitou roli ERK1 (p44) a ERK2 (p42) (Hurk and Zhao, 2004). Důležitým proteinem, který se na aktivaci MAPK podílí, je serin/threonin protein kináza mos. U oocytu nacházejícího se v prvním meiotickém bloku je kináza mos nedetekovatelná. Její syntéza ze zásoby mRNA začne v době aktivace MPF (Sagata et al., 1989a). Kináza mos aktivuje mitogenem aktivovanou kinázu kinázy (MAPKK, neboli MEK). MEK aktivuje MAPK, která následně aktivuje kinázu p90^{rsk} (Nebreda and Hunt, 1993). Kináza p90^{rsk} fosforyluje regulační doménu Myt1, což způsobí snížení její aktivity. Jak bylo napsáno výše, Myt1 inhibičně fosforyluje CDK1 (Palmer et al., 1998). Určitou inhibiční roli na Myt1 má přímo i samotná mos (Peter et al., 2002). MAPK se podílí na uzavírání gap junctions díky fosforylaci connexinů (Norris et al., 2008). Na rozdíl od MPF se načasování aktivace MAPK během zrání oocytu liší u různých druhů. MAPK má mnoho molekulárních

cílů, které se nacházejí buď v jádře, nebo v cytoplazmě. Během meiotického zrání je aktivita MAPK potřebná pro zabezpečení činnosti MPF, a dále pro formování dělicího vřeténka a i pro udržení druhého meiotického bloku (Hurk and Zhao, 2004). Během druhého meiotického bloku je přítomna vysoká aktivita MAPK, která potlačuje degradaci cyklinu B. Prostřednictvím toho je udržena vysoká aktivita MPF. Po oplození oocyty spermií dochází k inaktivaci MAPK (Ito and Kashiwazaki, 2012).

3.1.7.6. Význam APC/C a cytostatického faktoru

Degradace proteinů během mitotického přechodu z metafáze do anafáze a rovněž během G1 fáze a S fáze je řízena APC/C. Tento komplex má rovněž velký význam v průběhu meiózy. APC/C je multipodjednotková E3 ligáza zodpovědná za značení proteinových substrátů ubiquitinem. Takto označené proteiny jsou následně určeny k degradaci v proteasomu (Peters, 2006). APC/C může provádět ubiquitinaci substrátů pouze s pomocí dalších dvou enzymů. Jsou to E1 (ubiquitin aktivující enzym) a E2 (ubiquitin konjugující enzym) (Castro et al., 2005). APC/C potřebuje pro svojí aktivitu navázání koaktivátorů. K tomuto účelu slouží CDC20 nebo FZR1. Díky těmto koaktivátorům je určen stupeň substrátové specificity. Aktivní APC/C umožňuje postup anafází díky degradaci cyklinu B a securinu (Peters, 2006). U oocytů má na regulaci APC/C větší význam protein FZR1 (Jones, 2011). Protein FZR1 je regulován pomocí CDC14b (pozitivní regulátor) a Emi1 (negativní regulátor) (Holt et al., 2013). FZR1 může efektivně asociovat s APC/C pouze tehdy, když jsou některé ze subjednotek APC/C fosforylovány pomocí MPF nebo polo – like – kinase 1 (PLK1) (Kramer et al., 2000).

Securin je malý protein, který slouží jako chaperon a zároveň i jako inhibitor proteolytického enzymu separázy. Aktivní separáza štěpí proteiny kohesiny a díky tomu dochází k rozrušení spojení mezi chromozomy v bivalentech. Pokud je ale přítomen securin, nemůže ke štěpení kohesinů pomocí separázy docházet (Nasmyth, 2001).

Jak je uvedeno výše, během prvního meiotického bloku je hladina cyklinu B řízena APC/C ve spojení s FZR1. Krátce po GVBD dochází ke snížení množství FZR1. K tomuto snížení dochází díky tomu, že FZR1 je negativně kontrolován aktivitou CDK1. Na druhou stranu aktivita CDK1 během GVBD podporuje CDC20, který se následně stane koaktivátorem APC/C. Spojení APC/C a CDC20 má rovněž za úkol degradaci cyklinu B a securinu (Reis et al., 2007). Tímto způsobem a díky kontrole proteiny SAC je umožněn výstup z prvního meiotického dělení (Holt et al., 2013). Dochází totiž ke snižování hladiny

cyklinu B a následně i k poklesu aktivity CDK1. Rovněž je díky štěpení securinu aktivována separáza (Holt et al., 2013).

Během meiotického zrání dochází ke zvýšení syntézy cyklinu B. Díky zvýšené syntéze dochází i přes aktivitu APC/C pouze k částečnému snížení množství cyklinu B během anafáze I. Toto snížení ale zabrání vstupu do S fáze buněčného cyklu (Iwabuchi et al., 2000). V metafázi II dochází k stabilizaci vysoké aktivity MPF díky inhibici APC/C pomocí cytostatického faktoru (CSF).

CSF brání postupu meiotickým dělením během metafáze II. Byly navrženy tři různé cesty, jakými CSF inhibuje APC/C. Může to být Emi1 (early mitotic inhibitor 1) zprostředkovaná dráha (Reimann and Jackson, 2002), dále tzv. spindle – checkpoint zprostředkovaná dráha (Tunquist and Maller, 2003), nebo Erp1 (Emi1 – related protein, rovněž nazývaný Emi2) zprostředkovaná dráha (Schmidt et al., 2006).

Bylo navrženo několik kandidátů, kteří by ve skutečnosti mohli být CSF. Prvním je kináza mos (Sagata et al., 1989b), která, jak je uvedeno výše, působí prostřednictvím dráhy mos/MEK/MAPK/p90^{rsk} (Lorca and Castro, 2010). Jako další kandidát je popisován Emi1, což je inhibitor APC/C (Raimann and Jackson, 2002). Důležitým kandidátem je Erp1, který rovněž inhibuje APC/C. Inhibice je způsobena přímou vazbou Erp1 k APC/C a inhibiční aktivita Erp1 je pozitivně řízena fosforylací pomocí p90^{rsk} (Inoue et al., 2007). Díky tomu je vysoká aktivita CDK1 během druhého meiotického bloku udržována prostřednictvím signalizační dráhy mos/MEK/MAPK/p90^{rsk}, která aktivuje a udrží Erp1 zprostředkovanou inhibici APC (Lorca and Castro, 2010).

Snížení aktivity CSF a s tím spojený výstup z druhého meiotického bloku je spojen se snížením aktivity CDK1 kvůli degradaci cyklinu B pomocí APC/C. Tento děj probíhá po oplození a jako reakce na oplození dochází v oocyту ke zvýšení hladiny Ca²⁺ a následné aktivaci Ca²⁺/kalmomodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII). Na modelovém organismu *Xenopus laevis* bylo prokázáno, že aktivní CaMKII fosforyluje Erp1 a tato fosforylace působí jako tzv. priming, který umožní následnou fosforylací Erp1 pomocí Plx1 (*Xenopus* polo – like kinase 1). Tímto způsobem fosforylovaný Erp1 je rozpoznán ubiquitin ligásou Skp1 – Cullin – Fbox - β trcp (SCF ^{β trcp}) a to vede k degradaci Erp1. Společně s degradací Erp1 rovněž dochází k degradaci kinázy mos a tím inaktivaci signalizační dráhy mos/MEK/MAPK/p90^{rsk} (Lorca and Castro, 2010). Podobně bylo prokázáno i u myši, že pro udržení druhého meiotického bloku jsou potřebná kináza mos i Erp1, nicméně přesný mechanismus působení není znám (Nishiyama et al., 2010).

Jako další mechanismus, který je zapojen do dějů spojených s výstupem z druhého meiotického bloku, je aktivace fosfatázy kalcineurinu pomocí Ca^{2+} (Mochida and Hunt, 2007). CaMKII rovněž způsobí aktivaci Wee1B, která může následně inaktivovat MPF (Eichenlaub-Ritter, 2012).

3.1.7.7. Význam kumulární expanze

Jedním z dějů vedoucích k obnově meiózy po LH vlně je mucifikace a expanze kumulárního obalu oocyty. Tento děj je způsobený produkcí hyaluronové kyseliny kumulárními buňkami jako reakce na působení gonadotropinů (Ashkenazi et al., 2005). Kumulární expanze je závislá na produkci tzv. LH – indukovatelných – EGF – podobných peptidů (LH – induced – EGF – like peptides) v murálních buňkách, ke které dojde po LH vlně. Těmito peptidy mohou být epiregulin, amphiregulin a β - cellulin a jejich prostřednictvím je signál způsobený LH vlnou přenesen ke kumulárním buňkám (Park et al., 2004). V kumulárních buňkách způsobí aktivaci genů a zvýšení syntézy látek zapojených do kumulární expanze (Ashkenazi et al., 2005). Mezi produkovanými látkami jsou zejména pentraxin – 2, hyaluronan syntáza – 2, prostaglandin endoperoxid syntáza – 2 (nebo též cyklooxygenáza – 2, COX2) a tumor necrosis factor alfa induced protein 6 (Richards, 2005). Rovněž dochází k potlačení syntézy urokinázového typu aktivátoru plazminogenu (urokinase – type plasminogen activator, uPA) (Elvin et al., 1999b). COX2 je potřebná pro syntézu prostaglandinu E2 (PGE2) (Richards et al., 2002). PGE2 vyvolá další navýšení produkce EGF podobných peptidů v granulárních buňkách, což následně zesiluje odpověď na LH vlnu (Ben-Ami et al., 2006). COX2 je navíc důležitým enzymem produkujícím prostaglandiny zapojené do procesu ovulace (Lim et al., 1997). Kumulární expanze může být ale vyvolána i jiným způsobem. Mohou ji vyvolávat oocytem produkované faktory, tzv. kumulární expanzi umožňující faktory (CEEF, cumulus expansion enabling factors) (Dragovic et al., 2007). Tento fakt je prokázán v *in vitro* podmínkách např. u myši, kde vyjmutí oocyty z folikulu zabrání kumulární expanzi (Buccione et al., 1990). U jiných živočichů (např. prase) však kumulární expanzi vyjmutí oocyty z folikulu nebrání (Procházka et al., 1991).

Přesná modifikace extracelulárního prostředí je rovněž potřebná pro úspěšnou ovulaci. Tato modifikace zahrnuje kumulární expanzi. Díky produkci kyseliny hyaluronové vzniká mukózo – elastická extracelulární matrix složená z proteinů pocházejících ze samotného folikulu, ale i z krevního séra. Struktura matrix je důležitá při vytlačení oocyty z folikulu a pro zachycení pomocí fimbrií vejcovodu. Dále může fungovat jako selektivní bariéra při průniku spermií (Talbot et al., 2003).

3.2. Oxid uhelnatý a hemoxygenáza

3.2.1. Gasotransmitery

Prvním důležitým objevem ukazujícím význam plyných molekul v přenosu signálů bylo poznání, že endoteliálními buňkami syntetizovaný faktor, tzv. endothelium derived relaxing factor (EDRF), který způsobuje relaxaci hladkého svalstva ve stěnách cév, je ve skutečnosti molekula plynu, přesněji oxid dusnatý (NO) (Furchgott and Zawadzski, 1980). Tento poznatek vedl ke zkoumání, zda nemohou mít určitý fyziologický účinek na organismus i oxid uhelnatý (CO) a sulfan (H₂S). Tento předpoklad se potvrdil a tyto endogenní plyné molekuly byly označeny jako gasotransmitery (Untereiner et al., 2012). Gasotransmitery jsou tedy skupinou endogenních plyných molekul, které mohou v buňkách vyvolat určitou signalizační kaskádu (Wu and Wang, 2005).

Dle prací Wu and Wang (2005) a Wang (2002) je charakteristika gasotransmiteru následovná. Jsou to malé plyné molekuly jako CO, NO a H₂S (respektive molekuly plynů s malou molární hmotností). Mohou volně procházet buněčnou membránou. Nepotřebují žádné receptory, které by zprostředkovaly jejich pohyb z vnějšího prostředí do buňky. Nejsou skladovány ve váčcích uvnitř buněk, díky čemuž musí jejich syntéza probíhat rychle v reakci na stimulační signál. Jejich syntéza probíhá endogenně a enzymaticky a je kontrolována fyziologickými stimuly. Biologický efekt gasotransmiteru může být napodoben exogenní aplikací stejného druhu molekuly. Gasotransmitery musí mít specifické buněčné a molekulární cíle. Účinek gasotransmiterů na buňky může, ale nemusí, být zprostředkován tzv. druhým poslem.

Jedním ze zajímavých rysů gasotransmiterů je unikátní mechanismus jejich signalizace. Na rozdíl od klasických signálních molekul, které působí např. prostřednictvím aktivace receptorů spojených s G proteiny nebo tyrozin kinázových receptorů, gasotransmitery chemicky modifikují svoje vnitrobuněčné cíle (Untereiner et al., 2012).

Rovněž je snaha prokázat, zda by mimo CO, NO a H₂S nemohli jako endogenní mediátory působit i jiné plyny. Mezi tyto plyny patří acetaldehyd (CH₃CHO), oxid siřičitý (SO₂), oxid dusný (N₂O) a amoniak (NH₃) (Untereiner et al., 2012).

3.2.2. Oxid uhelnatý

CO je molekula složená ze dvou atomů. Jsou to atomy uhlíku a kyslíku. Při teplotách vyšších než -190°C se jedná o bezbarvý plyn bez zápachu. Při standardní teplotě a tlaku je hustota CO 1,25 g/l. Chemicky je to stabilní molekula, jejíž rozpustnost ve vodě je nízká a

vzniká při nedokonalém spalování materiálu obsahujícím uhlík. Může vznikat přírodními procesy (např. produkcí rostlinami nebo přírodními požáry) a činností člověka (např. topením v kamnech s nedostatečným spalováním), a dále je přítomen v automobilových výfukových plynech a tabákovém kouři. Intoxikace CO je způsobena náhlým vystavením vysoké koncentraci CO nebo déle trvající chronické intoxikaci (Wu and Wang, 2005). Inhalovaný CO rychle prostupuje přes alveolární a kapilární stěnu a vytváří těsnou vazbu s hemoglobinem. Tímto způsobem vzniká tzv. karboxyhemoglobin (COHb). CO má přibližně 200 až 250 násobně vyšší afinitu k hemoglobinu než kyslík. Díky tomu CO částečně obsadí vazebná místa hemoglobinu pro kyslík a způsobí inhibici uvolňování kyslíku ze zbývajících hemových skupin hemoglobinu. To vede ke snížení kapacity krve pro dopravu kyslíku a následně vzniká hypoxie tkání (Von Burg, 1999). Vazba CO na hemoglobin je reverzibilní a inhalace kyslíku v nepřítomnosti zdroje CO může vést k navrácení hemoglobinu do původního stavu. Bazální hladina COHb u člověka se pohybuje od 0,1 % do 1 %. V relaci na vnější zdroje CO může docházet ke zvýšení této hladiny (Rudra et al., 2010). Zvýšení hladiny COHb na více než 20 % je spojeno se vznikem příznaků akutní toxicity (jako je dušnost, závratě a bolest hlavy). Chronické expozice CO mohou vést k neurotoxicitě, kognitivním poruchám a zhoršení zraku. Smrtelná koncentrace COHb je v rozsahu 50 % až 80 %. Ačkoli hemoglobin představuje hlavní cíl pro vazbu CO, dochází rovněž při zvýšené expozici CO k vazbě i na jiné hemoproteiny (např. myoglobin, cytochrom c oxidáza a cytochrom p450) (Gorman et al., 2003).

V biologických systémech CO typicky reaguje s kovy v metaloproteinech, což jsou proteiny, které obsahují jako kofaktor molekuly kovu (Piantadosi, 2002). Fyziologické účinky CO jsou způsobeny jeho vazbou na hemovou skupinu v hemoproteinech (Rochette et al., 2013). Endogenní produkce CO jako přírodního produktu degradace hemoglobinu, byla uznána od poloviny dvacátého století (Sjostrand, 1952). V letech 1968 a 1969 byl hemoxygenázový (HO) enzymatický systém, který způsobuje degradaci hemoglobinu, charakterizován jako hlavní endogenní zdroj CO v těle (Tenhunen et al., 1968, Tenhunen et al., 1969). Indukovatelná forma HO, neboli HO – 1 byla identifikována jako stresový protein reagující na stres způsobený xenobiotiky (Keyse and Tyrrell, 1989) a může být rovněž označována jako protein tepelného šoku 32 (heat shock protein 32, hsp32) (Li et al., 2013). Dalším cílem bylo poznání fyziologické funkce endogenně produkovaného CO, jakož i vysvětlení cytoprotektivních vlastností HO – 1. Postupně bylo určeno, že CO hraje roli v řadě biologických procesů. Jsou to regulace tonu cév, zánětu, neurotransmise, proliferace buněk, programované buněčné smrti, tvorby mitochondrií a jejich autofágie (Ryter and Choi, 2013).

Většina endogenně produkovaného CO (zhruba 85 %) vzniká při přirozené degradaci hemových skupin, které většinou pochází ze systémového obratu hemoglobinu, mohou ale pocházet i z jiných buněčných hemoproteinů (Ryter and Choi, 2013). HO katalyzují oxidativní štěpení hemu za vzniku biliverdinu - IX α , dvojmocného železa (Fe²⁺) a CO. HO vyžaduje 3 molekuly kyslíku na každou molekulu hemu, kterou oxiduje. Dále HO vyžaduje nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) a cytochrom P450 reduktázu jako donory elektronů (Tenhunen et al., 1969). Vzniklý biliverdin - IX α je redukován na bilirubin - IX α pomocí enzymu NADPH dependentní biliverdin reduktasy (Tenhunen et al., 1970). Produkty degradace hemu, Fe, CO a bilirubin, mají důležité buněčné funkce (Levytska et al., 2013). Bilirubin je důležitý antioxidant a má cytoprotektivní účinky (Mustafa et al., 2009).

HO představuje hlavní zdroj CO. V organismu se však nacházejí další, minoritní zdroje endogenního CO, kde neslouží jako substrát hemová skupina. CO může vznikat jako produkt oxidace lipidů nebo jako produkt metabolismu xenobiotik pomocí cytochromu p450 (Ryter and Choi, 2013).

HO se vyskytuje ve dvou hlavních izoenzimech (HO - 1 a HO - 2) a každý je syntetizován podle specifického genu (Maines, 1997). Dále se vyskytuje HO - 3, o němž se soudí, že je to neaktivní izoforma a představuje pseudogen vzniklý z transkriptu HO - 2 (Hayashi et al., 2004). Konstitutivní izoenzym HO - 2 je exprimován v mnoha tkáních, přičemž nejvýše zastoupen je ve varlatech a mozku (Maines, 1997). Aktivace HO - 2 může být způsobena účinkem kalmodulinu - Ca²⁺ (Boehning et al., 2004) a dále pomocí kasienu kinázy 2 (Boehning et al., 2003). Důležitou lokalizací HO - 2 je endoteliální vrstva cév, kde se podílí na řízení napětí hladkého svalstva krevních cév (Untereiner et al., 2012). Předpokládá se, že HO - 2 zaujímá důležitou roli ve vývoji epidermálních a zárodečných buněk a podílí se na signalizaci v nervové tkáni (Abraham and Kappas, 2008). HO - 1 představuje indukovatelný izoenzym a podílí se na odpovědi buněk a tkání na působení stresorů. Účelem této odpovědi je udržení homeostázy. Exprese HO - 1 reaguje na mnoho rozdílných chemických a fyzikálních stimulů (např. oxidativní stres, zánět a expozice těžkým kovům). Hlavním transkripčním regulátorem exprese genu pro HO - 1 je protein Nrf2 (Ryter and Choi, 2013).

I když se HO vyskytuje ve všech dosud zkoumaných tkáních, nejvyšší exprese tohoto enzymu je dosahováno v mozku (hlavně HO - 2), játrech (HO - 2 i HO - 1), slezině (HO - 1), vaskulárních endoteliálních buňkách a buňkách hladké svaloviny (HO - 1 i HO - 2) (Abraham and Kappas, 2008).

Na rozdíl od NO a H₂S, není CO metabolizován v těle savců (Motterlini and Otterbein, 2010). Eliminace CO z organismu probíhá výlučně pomocí respiračního systému výdechem aniž by došlo k biochemické modifikaci CO (Kreck et al., 2001). CO je v porovnání s NO a H₂S biologicky nejstabilnější, díky tomu může působit v organismu delší čas a na větší vzdálenost (Untereiner et al., 2012).

Je zkoumáno terapeutické využití CO v inhalační terapii zánětlivých onemocnění. Inhalace při vysoké koncentraci CO představuje riziko, neboť se projevují jeho toxické účinky. Protektivní účinky CO jsou způsobené několika mechanismy, zahrnujícími regulaci zánětu, imunitní reakce a apoptózy. Dále ovlivňují mikrocirkulaci a rovnováhu buněčného redox systému (Ryter and Choi, 2013).

3.2.3. Fyziologické účinky oxidu uhelnatého

Fyziologický účinek CO se projevuje hlavně díky regulaci různých signálních drah. CO může aktivovat rozpustnou formu guanylyl cyklázy (soluble GC, sGC) a kinázu MAPK nebo AKT. Dále může způsobit otevření BK_{Ca} kanálů (draselné kanály). Způsob a regulace těchto signálních drah závisí na typu buněk a dalších faktorech (Untereiner et al., 2012).

Důležitou rolí CO je regulace napětí cév. CO způsobuje relaxaci hladké svaloviny a vazodilataci prostřednictvím několika signálních kaskád (Untereiner et al., 2012). CO se v endoteliálních buňkách váže na hemovou skupinu sGC a to následně vede ke zvýšení intracelulární hladiny cGMP. Po přesunu cGMP do hladkosvalových buněk stěny cév dojde k aktivaci cGMP dependentních protein kináz. Cílem těchto kináz je myozin a další proteiny regulující svalovou kontrakci (Mustafa et al., 2009). Vazodilatace může být dále způsobena otevřením BK_{Ca} kanálů (Li et al., 2008). Otevření BK_{Ca} kanálů vede k hyperpolarizaci, což způsobí uzavření napětím řízených Ca²⁺ kanálů. Uzavření těchto Ca²⁺ kanálů vede ke snížení intracelulární koncentrace Ca²⁺. Výsledkem těchto dějů je vazodilatace (André et al., 2011). Na druhou stranu, může v době oxidativní stresu, CO působit i jako vazokonstriktor (Lamon et al., 2009).

Další rolí CO je regulace apoptózy. CO působí jako antiapoptotický faktor např. v endoteliálních buňkách (Brouard et al., 2000), hepatocytech (Kim et al., 2007) a kardiomyocytech (Clark et al., 2003). CO může potlačit produkci proapoptotických mediátorů (např. kaspáza) a indukovat tvorbu antiapoptotických faktorů (např. Bcl – x, Bcl – 2) (Li et al., 2013). Díky tomu může chránit buňky a tkáně před poškozením. Antiapoptotický efekt CO může být způsoben díky aktivaci p38 signální dráhy nebo AKT kinázy. CO působí jako ochranný faktor proti apoptóze indukované TNF (Brouard et al., 2000) a dále proti buněčné

smrti způsobené stresem endoplazmatického retikula (Kim et al., 2007). V hepatocytech se ochranný vliv CO projevuje prostřednictvím aktivace transkripčních faktorů NF - κ B. K aktivaci NF - κ B dochází prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a signální dráhy AKT (Kim et al., 2008a). V *in vitro* podmínkách nízké koncentrace CO snižují propustnost mitochondriální membrány a díky tomu dochází k zabránění uvolňování proapoptotických faktorů (Queiroga et al., 2011). Protein p38 je členem rodiny MAPK a je obecně citlivý na různé formy stresu, mezi které patří i oxidativní stres. V případě působení stresorů dojde ke zvýšení jeho aktivity (Untereiner et al., 2012). CO ovlivňuje p38 právě prostřednictvím indukce přechodného zvýšení ROS (Bilban et al., 2006) a rovněž může p38 regulovat díky signalizační dráze cGMP tvořeného GC (Wang et al., 2001).

Nízká koncentrace ROS působí jako důležitý druhý posel, který moduluje intracelulární signální dráhy (Untereiner et al., 2012). Pokud je však přítomno vysoké množství ROS, dochází k poškození buněk. Negativní působení ROS může být jednou z příčin poškození oocytů během prvního meiotického bloku (Eichenlaub-Ritter, 2012). CO může modulovat tvorbu ROS, jako je superoxidový anion (O_2^-) a hydrogen peroxid (H_2O_2). Tvorba těchto ROS může probíhat z cytosolových a mitochondriálních zdrojů (Untereiner et al., 2012).

Rovněž bylo prokázáno, že CO může působit i jako proapoptotický faktor. Tento efekt byl prokázán např. u buněk hladké svaloviny (Peyton et al., 2002) a fibroblastů. Působení CO na fibroblasty ve specifických podmínkách snižuje míru jejich proliferace. Dochází u nich k zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1 a ke změnám v expresi proteinů buněčného cyklu (zvýšení exprese inhibitoru CDK a snížení exprese cyklinu A a D) (Zhou et al., 2005). Rovněž u buněk hladké svaloviny může CO snižovat míru proliferace, což má dopad na prevenci aterosklerózy (Mustafa et al., 2009). Zdá se zřejmé, že signální dráha CO/HO je důležitým prostředníkem v regulaci buněčného přežití (Untereiner et al., 2012).

Dalším z efektů CO je možnost zabránění agregace krevních destiček a tím zachování krevního průtoku v místech poškození cév. V *in vitro* podmínkách dochází v kultuře cévních buněk vystavených stresovému faktoru k syntéze CO pomocí HO – 1. Uvolněný CO následně v krevních destičkách zvýší hladinu cGMP a ten brání jejich aktivaci (Wagner et al., 1997).

Fyziologicky může CO v organismu mít protizánětlivý efekt. Je to způsobeno buď přímým působením CO, nebo prostřednictvím aktivace různých signálních drah. Výsledkem je potlačení aktivace pro – zánětlivých enzymů (jako je inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS) nebo cyklooxygenáza 2) stejně jako transkripčního faktoru zánětu NF - κ B. CO může

dále inhibovat produkci pro - zánětlivých cytokinů. Rovněž dokáže u leukocytů snižovat tzv. rolling a u neutrofilů migraci do místa zánětu (Untereiner et al., 2012).

Oba izoenzymy HO (HO – 1 a HO – 2) jsou přítomny jak v centrální, tak v periferní nervové soustavě (CNS a PNS). CO produkovaný v CNS hraje roli v mechanismu sluchu, čichu a dále v hypotalamo – hypofýzo – adrenální ose. CO působí jako inhibitor uvolňování kortikotropního uvolňovacího hormonu (corticotropin releasing hormon), vazopresinu a dále jako inhibitor sekrece oxytocinu (Wu and Wang, 2005). Naopak efekt CO v *in vitro* podmínkách na uvolňování gonadotropního uvolňovacího hormonu (gonadotropin releasing hormon) je pozitivní (Lamar et al., 1996).

Enzym HO – 1 rovněž hraje roli v metabolismu. Bylo prokázáno, že chronická indukce HO – 1 způsobuje snížení tělesné hmotnosti a upravuje hyperglykémii společně se zvýšenou hladinou inzulínu. Dochází i k pozorovatelným změnám adipocytů. Při chronicky zvýšené hladině HO – 1 se mění velké, cytokiny produkující adipocyty v malé, adiponectin vyrábějící adipocyty (Rochette et al., 2013).

3.2.4. Význam CO v reprodukčním systému

Význam systému HO/CO na reprodukční funkce se zdá nezbytný. Vztah enzymů HO k činnosti reprodukčního traktu potvrzuje jejich přítomnost v reprodukčních orgánech a nervové soustavě. CO má význam v samičí i samčí reprodukční soustavě. Ve varlatech je detekovatelná vysoká aktivita HO (Abdel Aziz et al., 2008) a aktivita HO ve varlatech úzce souvisí s regulací steroidogeneze a zároveň má vliv na spermiogenezi (Maines and Ewing, 1996). Ve varlatech je HO – 1 exprimovaná hlavně v intersticiálních makrofázích a Sertoliho buňkách a v menším množství je exprimována v zárodečných a Leydigových buňkách. HO – 2 se vyskytuje hlavně v populaci zralých zárodečných buněk. V reakci na stres se aktivita a distribuce HO mění. Dochází k výraznému zvýšení HO – 1 v Leydigových buňkách, zatímco u HO – 2 dojde ke snížení. Snížení HO – 2 je v důsledku stresorem způsobeného snížení počtu zárodečných buněk. Díky těmto změnám se zdá, že Leydigovy buňky fungují ve varlatech jako detektor stresu a dále regulují apoptózu zárodečných buněk prostřednictvím působení CO (Ozawa et al., 2002). Zvýšená aktivita HO může způsobit snížení steroidogeneze. Stejný efekt byl prokázán v případě steroidogeneze v nadledvinách (Piotrkowski et al., 2009).

Také HO – 1 exprimovaná v Sertoliho buňkách má vliv na podporu zárodečných buněk a zároveň jejich ochranu před nepříznivými podmínkami (Maines and Ewing, 1996). Buněčná lokalizace HO – 1 v Sertoliho buňkách je v adlumínálním buněčném kompartmentu, zatímco

sGC, která je cílem CO produkovaného HO – 1, se nachází výhradně v bazální části. Toto zjištění ukazuje na subcelulární separaci místa produkce a účinku CO. Zvýšení hladiny cGMP může ovlivnit základní sekreční aktivitu Sertoliho buněk (Middendorff et al., 2000).

CO tvořený v Sertoliho buňkách pomocí HO – 1 působí jako ochranný faktor. U myší, kde byl v Sertoliho buňkách proveden pomocí RNA interference knockdown pro HO – 1, byla detekovatelná zvýšená míra apoptózy Sertoliho buněk (Li et al., 2013).

Rovněž v semenné plazmě se vyskytuje vysoká aktivita HO. Hladina aktivity HO v semenné plazmě pozitivně koreluje s koncentrací spermií a jejich motilitou. Se sníženým množstvím spermií je spojena i snížená aktivita HO. Nízká aktivita HO je rovněž spojená se zvýšeným výskytem abnormální morfologie spermií (Abdel Aziz et al., 2008). Důležitý význam HO v semenné plazmě a ve varlatech je ochrana před volnými radikály (Maines and Ewing, 1996).

Jak je uvedeno výše, HO se nachází v centrální i periferní nervové soustavě. Díky tomu, že CO je schopen působit jako neurotransmitter a vazodilatátor, může se podílet i v procesu erekce penisu. Exprese HO – 2 probíhá v různých částech reprodukčního traktu, včetně hladkého svalstva kavernózního tělesa penisu. Bylo prokázáno, že relaxace kavernózního tělesa je ovlivňovaná HO – 2, neboť u potkanů, kterým byl aplikován inhibitor HO, docházelo k inhibici relaxace. Díky tomuto zjištění lze předpokládat, že činnost HO – 2 a produkovaný CO hrají roli v erekci penisu. Jejich vliv je ale druhově specifický (Ushiyama et al., 2004). HO – 2 má rovněž význam pro kopulační reflexy a dále pro reflexní aktivitu svalů zapojených do ejakulace. U myší knockoutovaných pro HO – 2 docházelo k opožděné ejakulaci (Burnett et al., 1998).

Je známo několik důležitých funkcí systému HO/CO v rámci samičí reprodukční soustavy. V ováriích lze detekovat obě izoformy HO (HO – 1 i HO – 2). HO – 2 je detekovatelná ve všech částech ovárií, zatímco HO – 1 vykazuje variabilitu v distribuci. Nachází se hlavně v thekálních a granulózních buňkách a ve žlutém tělísku (CL). Naproti tomu ve stromatu ovárií se nachází pouze v malém množství (Alexandreaanu and Lawson, 2003).

Je prokázán vliv HO na normální průběh estrálního cyklu a laktaci. Bylo prokázáno, že aplikace heminu (substrát pro HO) potkaním samicím vede k narušení estrálního cyklu, především estrální fáze. Efekt inhibice HO během laktace je rovněž negativní (Alexandreaanu and Lawson, 2002)

Několik katalytických kroků v biosyntéze pohlavních steroidů je zprostředkováno činností cytochromu p450. Díky tomu, že cytochrom p450 obsahuje hemovou skupinu, lze

předpokládat, že se HO může podílet na řízení steroidogeneze. Mezi drahou steroidogeneze a metabolismem hemu existuje vzájemná závislost. Pokud totiž dojde ke změně v biosyntéze nebo degradaci hemu, odrazí se to na koncentraci cytochromu p450. Zdá se, že endogenně tvořený CO je pozitivním regulátorem steroidogeneze v ováriích. Po aplikaci heminu potkaním samicím dochází ke zvýšení syntézy androstendionu a estradiolu, ale míra produkce progesteronu zůstává nezměněná. Po aplikaci inhibitoru HO potkaním samicím dochází ke snížení syntézy progesteronu a androstendionu. V tomto případě se nemění hladina estradiolu (Alexandreaanu and Lawson, 2003).

V práci autorů Zenclussen et al. (2011a) je popisován význam HO – 1 pro ovulaci a tvorbu CL. Bylo prokázáno, že u myši deficientních pro HO – 1 dochází po hormonální stimulaci ke snížení počtu ovulovaných folikulů a kvůli tomu i menšímu zisku oocytů. S nižší mírou ovulovaných folikulů souvisí i následný nižší počet CL.

V CL myši s normální expresí HO – 1 se vyskytuje vysoká míra exprese HO – 1. Díky tomuto zjištění lze předpokládat, že HO – 1 je důležitá pro formování a udržení CL. To potvrzuje i fakt, že u myši deficientních pro HO – 1 docházelo ve zvýšené míře k buněčné smrti. Apoptóza představuje důležitý proces v regulaci životnosti CL a zjištěná zvýšená míra apoptózy může způsobovat špatné reprodukční výsledky. Dále bylo prokázáno, že u HO – 1 deficientních myši dochází ke snížení míry oplození. To je způsobeno horší kvalitou oocytů (Zenclussen et al., 2011a).

HO – 1 vykazuje během ovulace cytoprotektivní efekt. Ovulace je v podstatě zánětlivý proces. Dochází při ní k hemolýze a hromadění volného hemu, který má cytotoxický účinek. Volný hem může zvyšovat citlivost buněk k zahájení apoptózy (Zenclussen et al., 2011a). Autoři Zenclussen et al. (2011a) předpokládají, že při nedostatku HO – 1 ve vaječnicích dochází k zániku zralých folikulů díky tomu, protože nejsou chráněny před výrazným zánětlivým procesem a díky tomu nemohou ovulovat.

Vliv HO na míru apoptózy granulózních buněk byl zkoumán u prasete. V *in vitro* podmínkách bylo prokázáno, že HO má vliv na míru apoptózy granulózních buněk. Exprese HO – 1 v granulózních buňkách získaných z kvalitních folikulů vykazuje nízké hodnoty. Naproti tomu u granulózních buněk získaných z atretických folikulů lze detekovat vysoké množství HO – 1. V případě izoenzymu HO – 2 je detekována exprese v granulózních buňkách z kvalitních folikulů a v granulózních buňkách z atretických folikulů dochází ke snížení. Bylo zjištěno, že v *in vitro* podmínkách dochází po aplikaci heminu ke zvýšené míře apoptózy u určité skupiny granulózních buněk prasete. Pokud je současně s aplikací heminu použit inhibitor HO, poté ke zvýšení míry apoptózy nedochází. Tento efekt může být

způsoben díky tomu, že HO má schopnost zvýšit produkci Fas ligandu (Harada et al., 2004). Vazba Fas ligandu k Fas receptoru zahajuje tzv. vnější dráhu apoptózy. Tato signalizační dráha se podílí na apoptóze granulózních buněk a hraje důležitou roli v řízení folikulární atresie (Kim et al., 1999).

Pro zdárný průběh gravidity je důležité, aby došlo k hemodynamickým a imunitním změnám. Dochází ke zvýšení srdečního výdeje a krevního objemu a cílem těchto změn je zajištění potřebných látek pro růst a vývoj plodu. V řízení těchto změn je důležitá rovnováha mezi proangiogenními a antiangiogenními faktory. Pokud nastane nerovnováha těchto faktorů, může docházet ke komplikacím během gravidity. Gasotransmitery působící vazodilatačně zaujmají důležitou roli v regulaci kardiovaskulárních změn a snížení jejich produkce se může podílet na maternálních vaskulárních dysfunkcích a hypertenzi (Levytska et al., 2013). Bylo prokázáno, že indukce HO – 1 může díky tvorbě CO zmírnit nerovnováhu proangiogenních a antiangiogenních faktorů posunutou ve prospěch antiangiogenních faktorů pomocí snížení hladiny antiangiogenních faktorů (Cudmore et al., 2007). Dalším důležitým efektem CO během gravidity je snížení kontraktility myometria, což je pro udržení gravidity nezbytné (Acevedo and Ahmed, 1998).

Exprese HO – 1 a HO – 2 byla prokázána v placentě lidí a hlodavců (Levytska et al., 2013). Na míru exprese HO mohou působit různé faktory, přičemž u lidí je progesteron popisován jako faktor, který pozitivně zvyšuje expresi HO – 1 (Acevedo and Ahmed, 1998). Naopak u potkanů jsou jako pozitivní regulátory exprese HO – 1 uváděny estrogény (Cella et al., 2006). Lidská placenta obsahuje různé buněčné typy a lokalizace izoforem HO je odlišná v jednotlivých typech. HO – 1 se nachází ve velkém množství ve vrstvách syncytiotrofoblastu. Naopak v cytotrofoblastu se HO – 1 vyskytuje v menším množství. Izoenzym HO – 2 je exprimován převážně v hladkosvalových a endoteliálních buňkách dělohy. V lidské placentě rovněž dochází během gravidity k časovým změnám v expresi jednotlivých izoforem HO. V lidské placentě se míra exprese HO – 1 během gravidity nemění, naproti tomu exprese HO – 2 se zvyšuje ke konci gravidity (Yoshiki et al., 2000). V děloze březích potkaních samic probíhají změny v expresi HO – 1, přičemž tyto změny korelují s hladinou estrogenu. K výraznému zvýšení množství HO – 1 dochází během 19 a 22 dne březosti a právě v tuto dobu je možné současně zaznamenat zvýšení hladiny estrogenu. V případě HO – 2 nedochází v děloze gravidních potkaních samic ke změnám v expresi. (Cella et al., 2006). Pokud dojde v placentě ke snížení exprese HO oproti fyziologickým hodnotám, tento nedostatek může vést k poruchám funkce placenty a tím ohrožení gravidity (Levytska et al., 2013).

Na myším modelu bylo prokázáno, že změny hemodynamických parametrů během gravidity jsou spojeny s vyšší endogenní produkcí CO a zvýšenou hladinou bilirubinu v krevní plazmě. Význam HO během gravidity byl prokázán u myší deficientních pro HO – 1, u kterých dochází k restrikci intrauterinního růstu plodů, abortům a změnám v placentě v důsledku zvýšené míry apoptózy. Zvýšená míra apoptózy u myší deficientních pro HO – 1 ukazuje na antiapoptotický efekt HO – 1 v placentě (Zhao et al., 2009). Změny ve fetomaternálním spojení pozorovatelné u myší deficientních pro HO – 1 ukazují snížení objemu kapilár a zároveň jejich dezorganizaci (Zhao et al., 2011). Pokud se HO – 1 deficientním myším exogenně aplikuje CO v době implantace embryí, dochází ke snížení embryonální mortality (Zenclussen et al., 2011b). Podobně jako v případě HO – 1 bylo prokázáno i u izoenzymu HO – 2, že jeho snížená exprese v placentě souvisí se zvýšením rizika abortu (Zenclussen et al., 2005). Rovněž bylo prokázáno, že u blastocyst myší s normální expresí HO – 1 dochází ke dřívějšímu připojení k endometriu oproti myším deficientním pro HO – 1. Enzym HO – 1 je dále důležitý pro diferenciaci trofoblastických kmenových buněk, což je nezbytné pro správný vývoj placenty (Zenclussen et al., 2011b).

I přes poznatky týkající se významnosti systému HO/CO v reprodukční soustavě, nebyl prozatím hodnocen jeho význam v oocytech. Z tohoto důvodu je cílem této práce zjistit, zda se v oocytech HO – 1 a HO – 2 nachází a zda dochází ke změnám v jejich distribuci během meiotického zrání.

4. Materiál a metodika

4.1. Získávání a výběr oocytů pro experimentální účely

Prasečí vaječníky, ze kterých byla prováděna aspirace oocytů, byly získávány z odporažených prasniček. Prasničky se nacházely v neznámé fázi estrálního cyklu. Odebrané vaječníky byly ihned transportovány do laboratoře KVD v termo lahvích naplněných fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C. Po převozu byly jednotlivé vaječníky povrchově desinfikovány ethanolem a následně byla provedena aspirace folikulární tekutiny společně s oocyty pomocí injekční stříkačky (10 ml, Lauer solo, B. Braun) s jehlou 20G (Sterican, Braun Melsungen, Germany). Aspirovaná folikulární tekutina byla z injekční stříkačky vypuštěna do Petriho misky (Nunc, Roskilde, Denmark). Pod binokulární lupou byly z folikulární tekutiny skleněnou pipetou vybírány oocyty. Následně probíhala selekce oocytů dle neporušenosti cytoplazmy a kompaktnosti kumulárního obalu.

4.2. Postup kultivace oocytů

Před samotnou kultivací byly vybrané oocyty třikrát promývány v modifikovaném kultivačním médiu M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Scotland). Toto kultivační médium obsahuje hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7 % roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), 10 % fetálního telecího séra (GibcoBRL, Life Technologies, Germany, Lot No. 40F2190F) a 13, 5 IU eCG: 6,6 hCG/ml (P.G. 600, Intervet, Boxmeer, Holand). Následná kultivace probíhala v Petriho miskách ve 3 ml kultivačního média M199. Kultivace probíhala po dobu 24 a 48 hodin při teplotě 39°C a 5 % obsahu CO₂ v prostředí. Po kultivaci byly oocyty pomocí skleněné kapiláry zbaveny kumulárních buněk.

4.3. Lokalizace enzymů produkujících oxid uhelnatý

Pro detekci enzymu hemoxygenázy byly použity oocyty ve třech stádiích meiotického zrání. Rozdělení do těchto skupin proběhlo dle délky kultivace v médiu M199 a podmínkách uvedených výše. Tímto způsobem byly získány tři skupiny, rozdělené dle stádia meiotického zrání. Pokud kultivace neprobíhala, byly k experimentu získány oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV). Při 24 hodinové kultivaci byly získány oocyty v metafázi I (MI). Oocyty, jež byly kultivovány 48 hodin se nacházely v metafázi II (MII).

Před vlastní lokalizací HO – 1 a HO – 2 byla z důvodu umožnění penetrace specifických protilátek proti těmto enzymům do cytoplazmy oocytů odstraněna *zona pellucida*. Odstranění bylo provedeno pomocí 0,1% pronázy v médiu M199. Takto ošetřené oocyty byly opláchnuty ve třech kapkách 0,1% BSA v PBS při laboratorní teplotě. Opláchnutí trvalo 1 – 2 minuty. Poté byly oocyty fixovány v 2,5 % roztoku paraformaldehydu v PBS. Fixace probíhala při laboratorní teplotě a trvala jednu hodinu s tím, že po uplynutí 30 minut byl fixační roztok vyměněn.

Fixované oocyty byly dále vystaveny účinku média o složení: 10 ml PBS, 0,5 ml 10 % Triton X – 100 a 0,2 ml 5 % BSA. Roztok působil po dobu dvou hodin s tím, že byl po prvních 5 minutách a po uplynutí jedné hodiny vyměněn. Účinkem tohoto roztoku na oocyty je permeabilizace plazmatické membrány.

Po uplynutí 2 hodin byly oocyty krátce opláchnuty v médiu o složení: 10 ml PBS a 0,1 % Tween 20. Posléze probíhala první inkubace s monoklonální protilátkou anti – HO – 1 nebo anti – HO – 2 (Sigma-Aldrich). Protilátky byly naředěny v poměru 1 : 100. Inkubace probíhala v médiu o složení: 0,1% BSA, 0,01% Tween 20 v PBS a s příslušnou protilátkou. Tato inkubace probíhala přes noc (asi 14 – 16 hodin) ve vlhkém prostředí o teplotě 4 °C. Po této době byly nenavázané protilátky odstraněny promýváním oocytů v roztoku o složení: 0,1% Tweenu 20 v PBS. Proplach se při pokojové teplotě třikrát opakoval, přičemž délka jednotlivého omytí činila 10 minut.

Z důvodu zviditelnění navázané primární protilátky (anti – HO – 1, anti – HO – 2) posléze probíhala při laboratorní teplotě a v zatemněném prostředí inkubace se sekundární protilátkou anti – mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC) (Sigma – Aldrich). Protilátka byla zředěná v poměru 1 : 1000. Inkubace probíhala v roztoku 0,1% BSA a 0,01% Tween 20 v PBS a trvala jednu hodinu. Po inkubaci probíhalo opět promývání v roztoku 0,1% Tweenu 20 v PBS při laboratorní teplotě. Promývání se třikrát opakovalo a každý cyklus trval 10 minut.

Následně byly oocyty po dobu 15 minut ponechány v 0,1% roztoku BSA v PBS. Poté bylo provedeno značení chromatinu oocytů pomocí barviva Hoechst 33258 (Sigma – Aldrich). Značení chromatinu trvalo 10 minut a probíhalo v 0,1% roztoku BSA v PBS s daným barvivem. Po uplynutí doby barvení chromatinu byl opět proveden oplach 0,1% roztoku BSA v PBS. Následně byly oocyty opláchnuty v ekvilibračním pufru a v kapce glycerolu v PBS přeneseny na podložní sklíčko, na které bylo připevněno krycí sklíčko. Připravené preparáty byly hodnoceny pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu (Leica

SPE, Germany). Intenzita signálu byla měřena pomocí analýzy obrazu v programu NIS Elements.

4.4. Statistické hodnocení

Veškeré experimenty byly minimálně třikrát opakovány. Získaná data byla statisticky zpracována a vyhodnocena v programu STATISTICA v. 12. Pro vyhodnocení statisticky významných rozdílů byla použita statistická metoda ANOVA. Hodnocena byla relativní intenzita signálu v jednotlivých stádiích meiotického zrání, tj. v GV, MI a MII. Relativní intenzity signálu byly hodnoceny zvlášť pro HO – 1 a HO – 2. Relativní hodnoty byly porovnávány k hodnotám získaným z GV, které byly brány za 100 %. Za statisticky významný rozdíl byla považována hodnota na hladině významnosti $\alpha (H_0) < 0,05$.

4.5. Experimentální schéma

K jednotlivým experimentům byla vždy provedena kontrola průběhu meiotického zrání oocytů. Pro hodnocení byly použity pouze ty experimenty, ve kterých více než 85 % oocytů dosáhlo po 48 hodinách kultivace metafáze druhého meiotického dělení.

Experiment č. 1: Lokalizace a redistribuce enzymu hemoxygenáza – 1 během meiotického zrání prasečích oocytů.

První experiment byl zaměřen na zjištění intracelulární lokalizace a sledování redistribuce enzymu hemoxygenáza – 1 během meiotického zrání prasečích oocytů, tj. ve stádiu GV, MI a MII. Vlastní lokalizace a redistribuce hemoxygenázy – 1 byla provedena imunocytochemickou metodou (viz. Materiál a metodika 4.3.). Připravené preparáty byly snímány pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu (Leica SPE, Germany). Získané snímky byly následně vyhodnocovány analýzou obrazu v programu NIS Elements. Relativní intenzita signálu byla hodnocena v oblasti jádra (v případě GV oblast zárodečného váčku a v MI a MII v metafázní figuře), cytoplazmy a korové oblasti. Získané hodnoty relativní intenzity signálu z daných oblastí a v jednotlivých stádiích meiotického zrání byly mezi sebou porovnávány statistickou metodou ANOVA.

K experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy kontrolní skupina oocytů byla inkubována pouze se sekundární protilátkou za účelem vyloučení nespecifické vazby v oocytech. Pro hodnocení byly použity pouze ty experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál.

Experiment č. 2: Lokalizace a redistribuce enzymu hemoxygenáza – 2 během meiotického zrání prasečích oocytů.

Druhý experiment byl zaměřen na zjištění intracelulární lokalizace a sledování redistribuce enzymu hemoxygenáza – 2 během meiotického zrání prasečích oocytů, tj. ve stádiu GV, MI a MII. Stejně jako v případě hemoxygenázy – 1, byla i lokalizace a redistribuce hemoxygenázy – 2 provedena imunocytochemickou metodou (viz. Materiál a metodika 4.3.). Připravené preparáty byly snímány pomocí konfokálního skenovacího mikroskopu (Leica SPE, Germany). Získané snímky byly následně vyhodnocovány analýzou obrazu v programu NIS Elements. Relativní intenzita signálu byla hodnocena v oblasti jádra, cytoplazmy a korové oblasti. Získané hodnoty relativní intenzity signálu z daných oblastí a v jednotlivých stádiích meiotického zrání byly mezi sebou zhodnoceny statistickou metodou ANOVA.

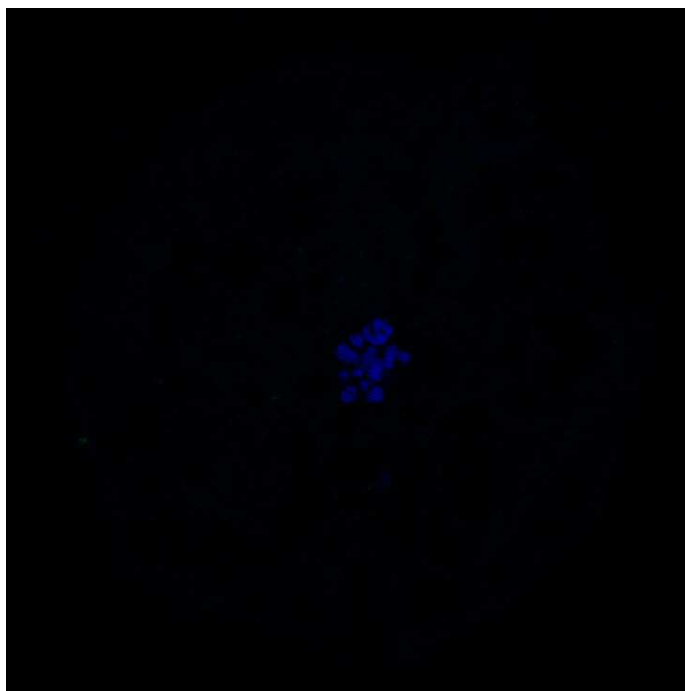
K experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy kontrolní skupina oocytů byla inkubována pouze se sekundární protilátkou za účelem vyloučení nespecifické vazby v oocytech. Pro hodnocení byly použity pouze ty experimenty, kde nebyl v negativní kontrole detekován žádný signál.

5. Výsledky

Experiment č. 1: Lokalizace a redistribuce enzymu hemoxygenáza – 1 během meiotického zrání prasečích oocytů.

Ke každému experimentu byla provedena negativní kontrola, kdy v kontrolní skupině byly oocyty inkubovány pouze se specifickou sekundární protilátkou anti – mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC). Tato kontrola sloužila k vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky v oocytech. Do konečného hodnocení byly zahrnuty jen ty experimentální skupiny oocytů, u jejichž negativní kontroly nebyl detekován žádný signál. Příklad negativní kontroly je uveden na obr. č. 1 (MI).

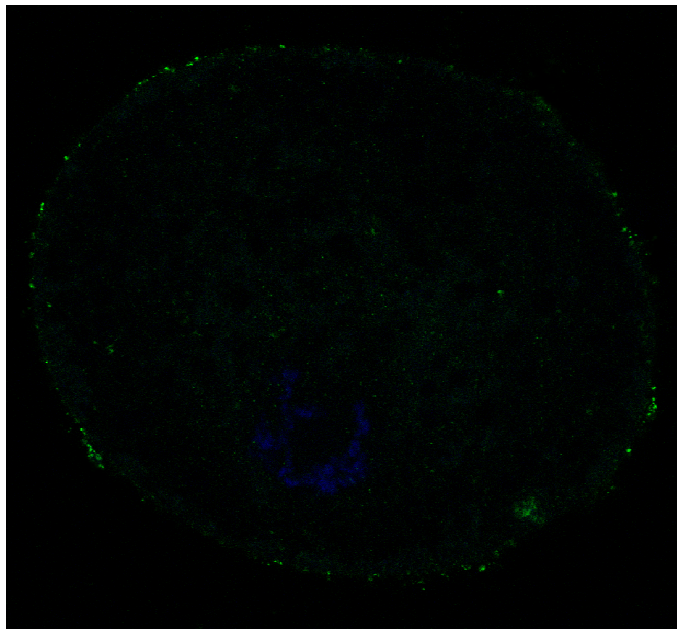
Obr. č. 1. Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti - mouse konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



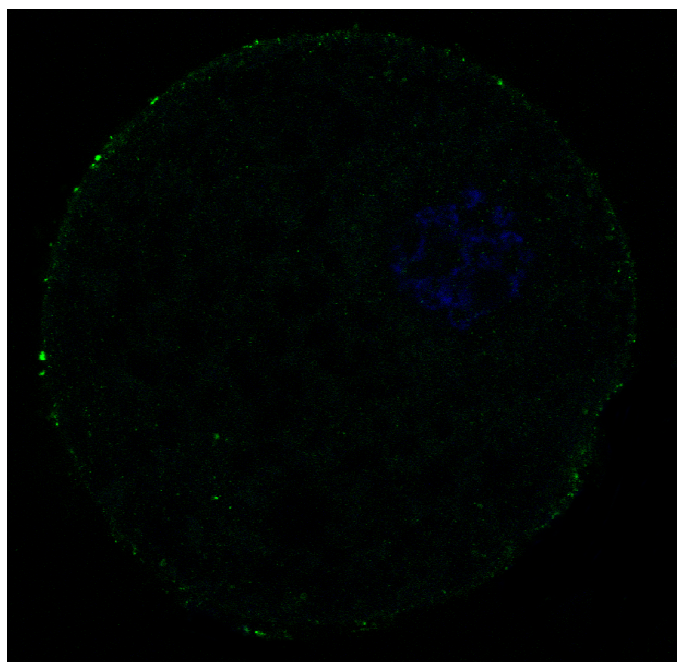
Detekce a intracelulární lokalizace hemoxygenázy – 1 během meiotického zrání prasečích oocytů.

Ve všech stádiích meiotického zrání a ve všech hodnocených oblastech byl enzym HO – 1 detekován. Analýzou intenzity signálu bylo vyhodnoceno, že intracelulární lokalizace převládá v korové oblasti oocytů. Výsledky detekce a lokalizace HO – 1 jsou uvedeny na obr. č. 2. – 5.

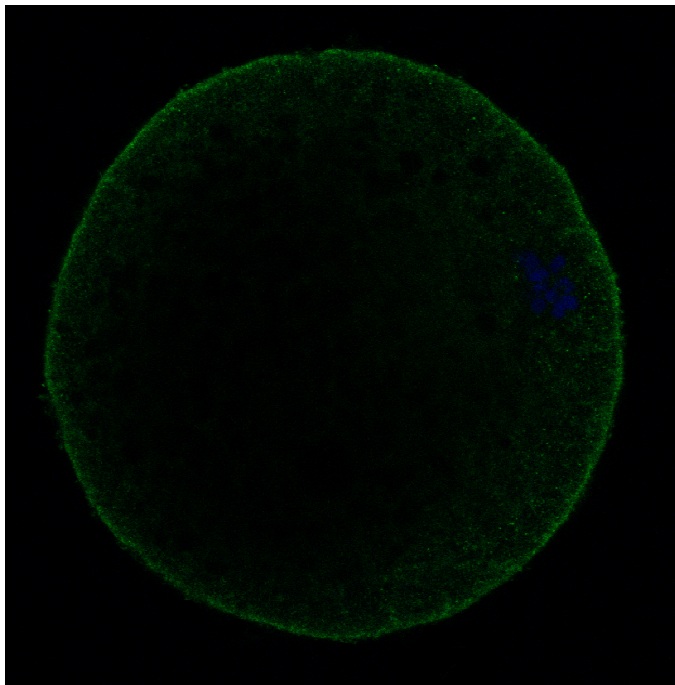
Obr. č. 2. Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 1 u oocytu ve stádiu zárodečného váčku, enzym HO – 1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



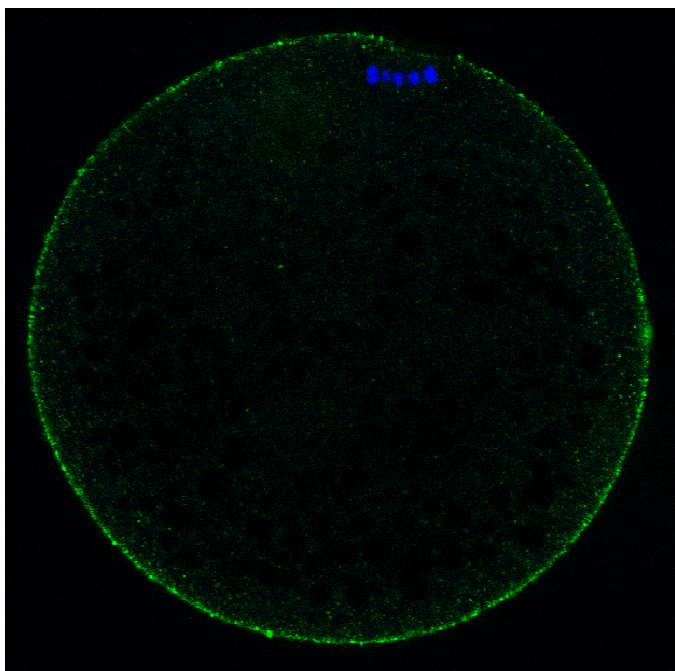
Obr. č. 3. Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 1 u oocytu ve stádiu zárodečného váčku, enzym HO – 1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



Obr. č. 4. Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 1 u oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení, enzym HO – 1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



Obr. č. 5. Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 1 u oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, enzym HO – 1 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.

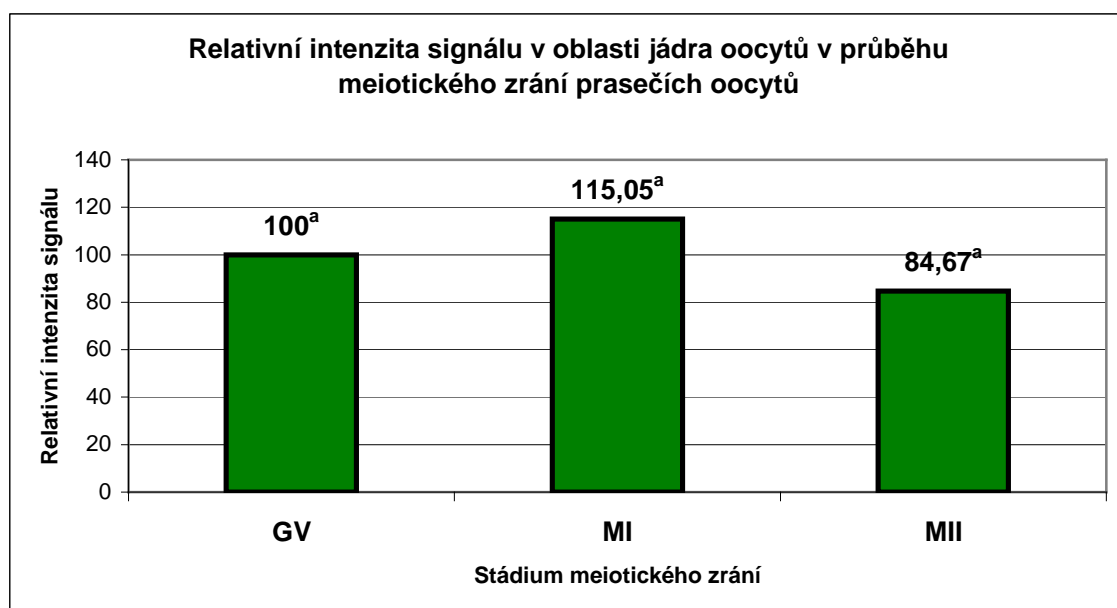


Statistické vyhodnocení lokalizace a redistribuce HO – 1 během meiotického zrání prasečích oocytů.

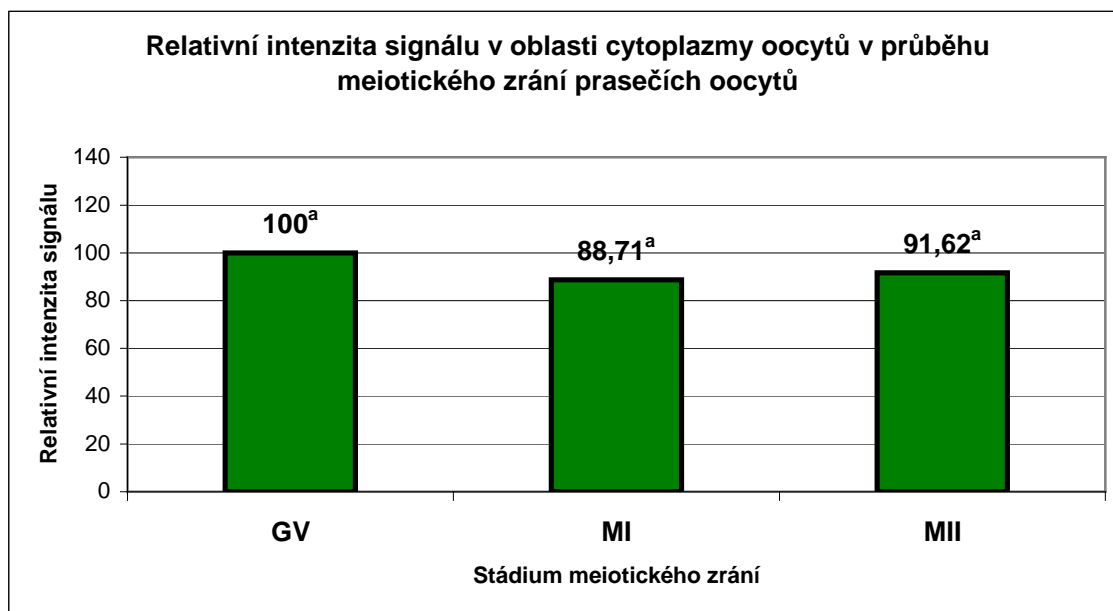
V žádné z hodnocených oblastí nebyly v průběhu meiotického zrání zjištěny statistické významné rozdíly v relativní intenzitě signálu (graf č. 1 – 3).

Graf č. 1: Relativní intenzita signálu HO – 1 v oblasti jádra oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu v oblasti jádra u skupiny oocytů v GV stádiu.

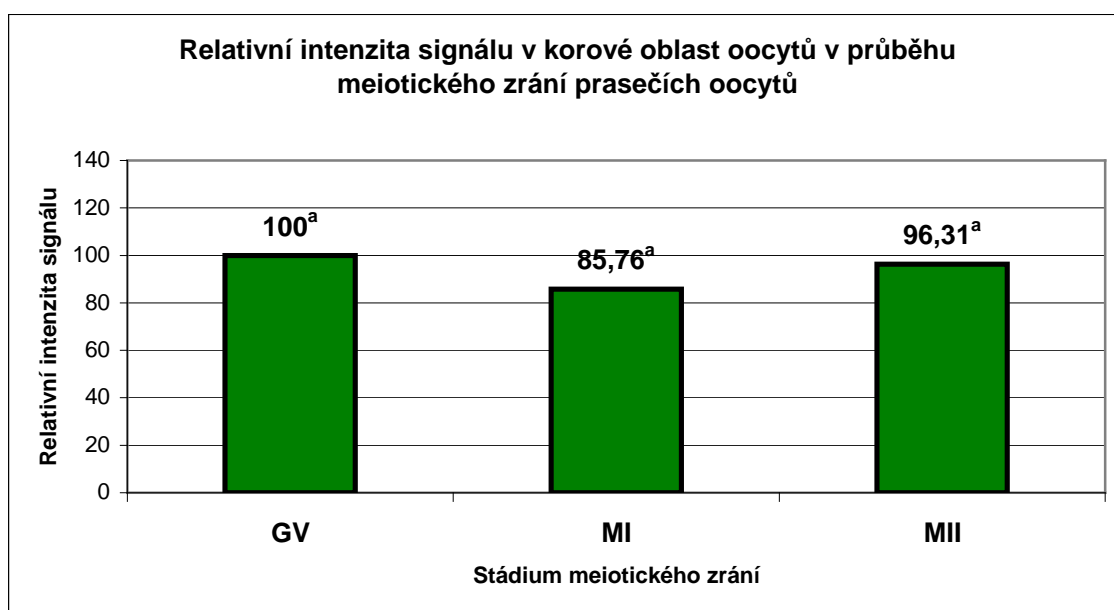
^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.



Graf č. 2: Relativní intenzita signálu HO – 1 v oblasti cytoplazmy oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu HO – 1 v oblasti cytoplazmy u skupiny oocytů v GV stádiu. ^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.

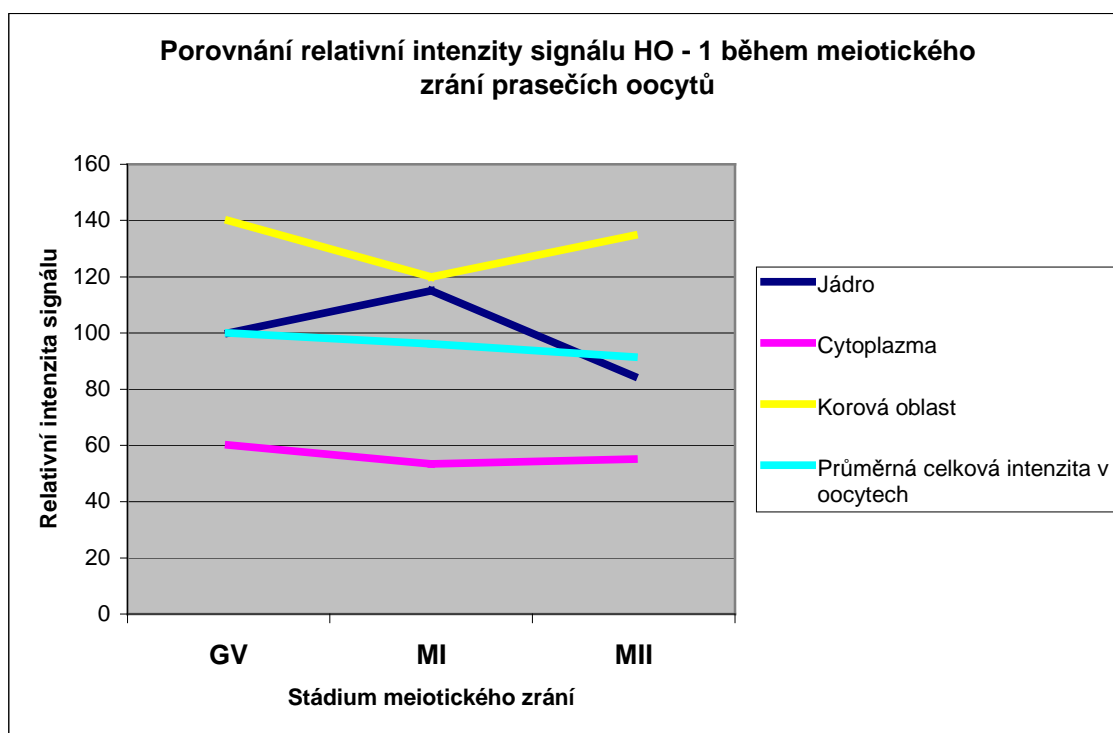


Graf č. 3: Relativní intenzita signálu HO – 1 v korové oblasti oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu HO – 1 v korové oblasti u skupiny oocytů v GV stádiu. ^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.



Při hodnocení celkové relativní intenzity signálu pro HO – 1 v oocytech během meiotického zrání byl patrný trend ve snížení relativní intenzity signálu, nicméně změny nejsou statisticky významné (graf č. 4).

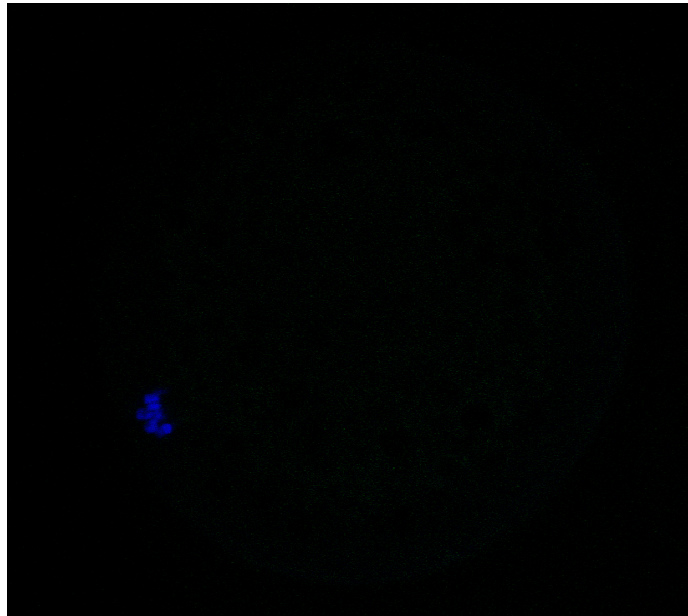
Graf č. 4: Porovnání relativní intenzity signálu HO – 1 v jádře, cytoplazmě, korové oblasti a v oocytech celkem během meiotického zrání prasečích oocytů. Hodnocené relativní hodnoty jsou vztaženy k průměrné relativní intenzitě signálu HO – 1 u oocytů ve stádiu GV.



Experiment č. 2: Lokalizace a redistribuce enzymu hemoxygenáza – 2 během meiotického zrání prasečích oocytů.

Stejně jako v případě prvního experimentu, byla rovněž provedena negativní kontrola, kdy v kontrolní skupině byly oocyty inkubovány pouze se specifickou sekundární protilátkou anti – mouse IgG konjugovanou s fluorescenčně značeným izothiokyanátem (FITC). Cílem negativní kontroly bylo vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky v oocytech. Do konečného hodnocení byly zahrnuty jen ty experimentální skupiny oocytů, u jejichž negativní kontroly nebyl detekován žádný signál. Příklad negativní kontroly je uveden na obr. č. 6 (MII).

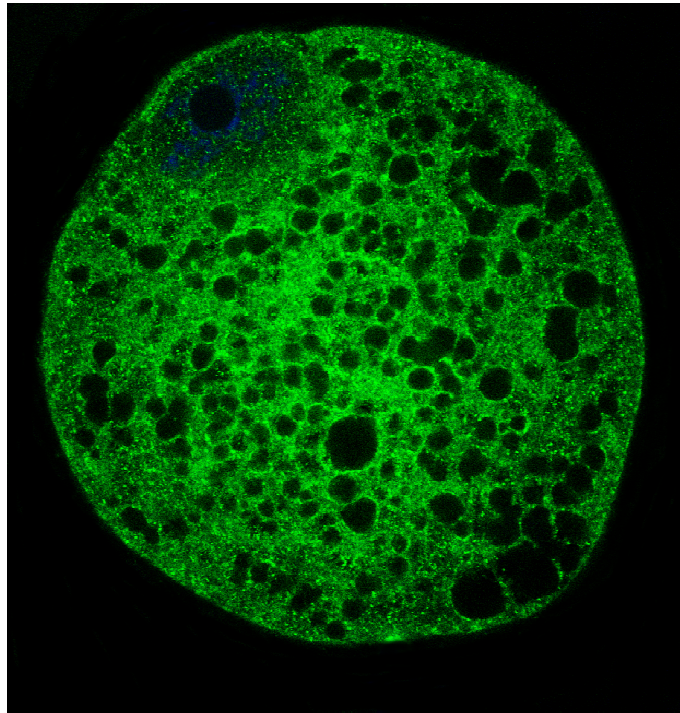
Obr. č. 6. Negativní kontrola: Oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, inkubovaný se sekundární protilátkou anti - mouse konjugovanou s FITC, chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



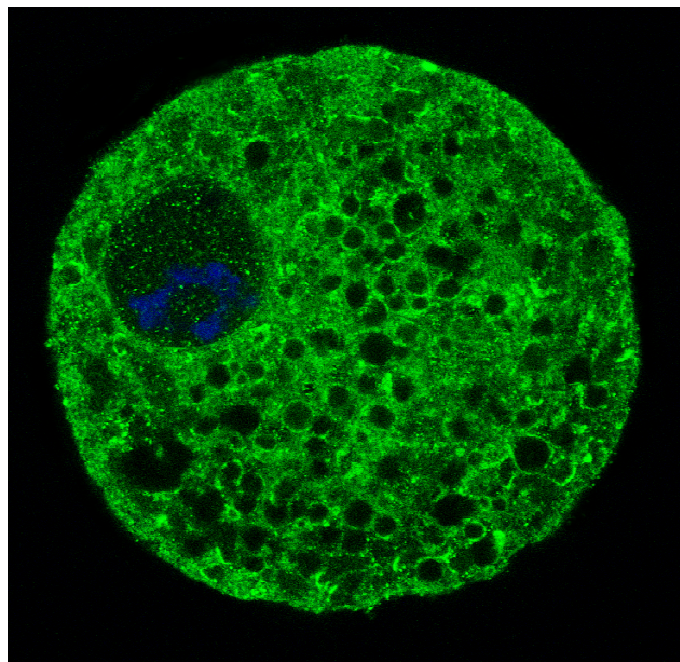
Detekce a intracelulární lokalizace hemoxygenázy – 2 během meiotického zrání prasečích oocytů.

Enzym hemoxygenáza – 2 byl lokalizován ve všech stádiích meiotického zrání a ve všech hodnocených oblastech. V porovnání s HO – 1 byl pro HO – 2 detekován výrazně silnější signál. Vyhodnocením intracelulární lokalizace byl získán nejsilnější signál v korové oblasti. Výsledky detekce a lokalizace HO – 2 jsou uvedeny na obr. 7. – 11.

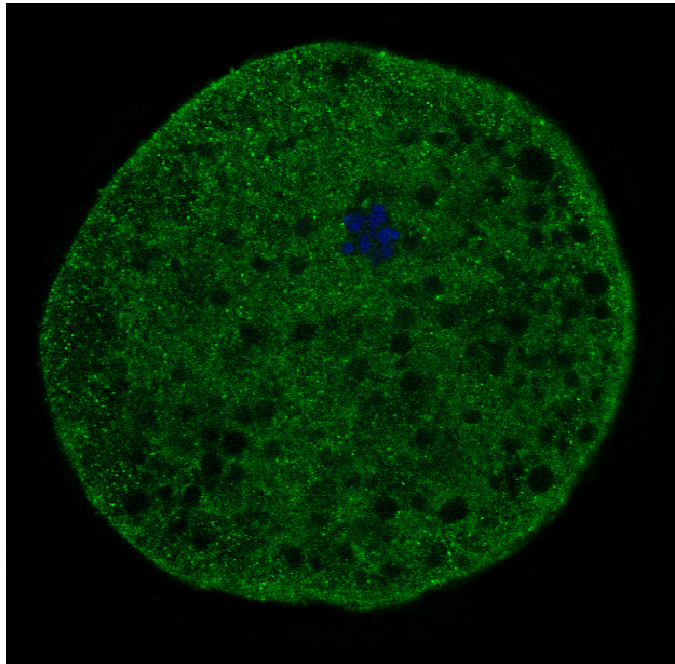
Obr. č. 7 Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 2 u oocytu ve stádiu zárodečného váčku, enzym HO – 2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



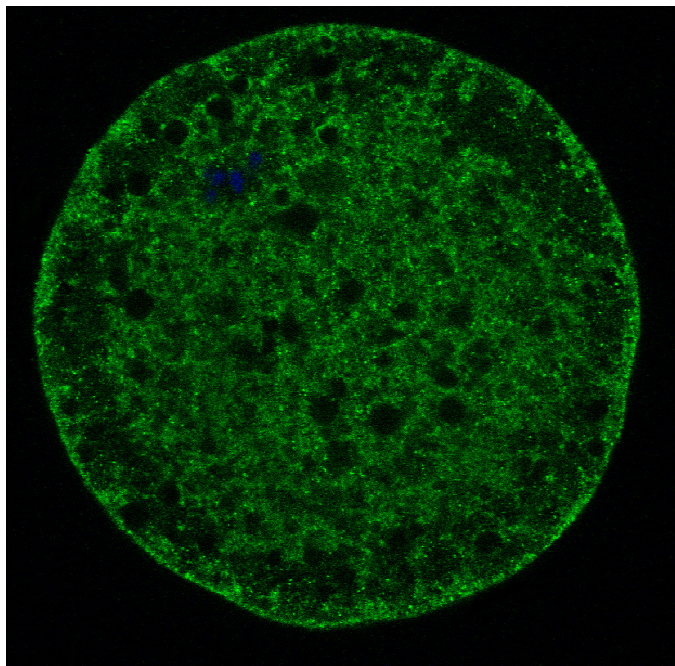
Obr. č. 8 Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 2 u oocytu ve stádiu zárodečného váčku, enzym HO – 2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



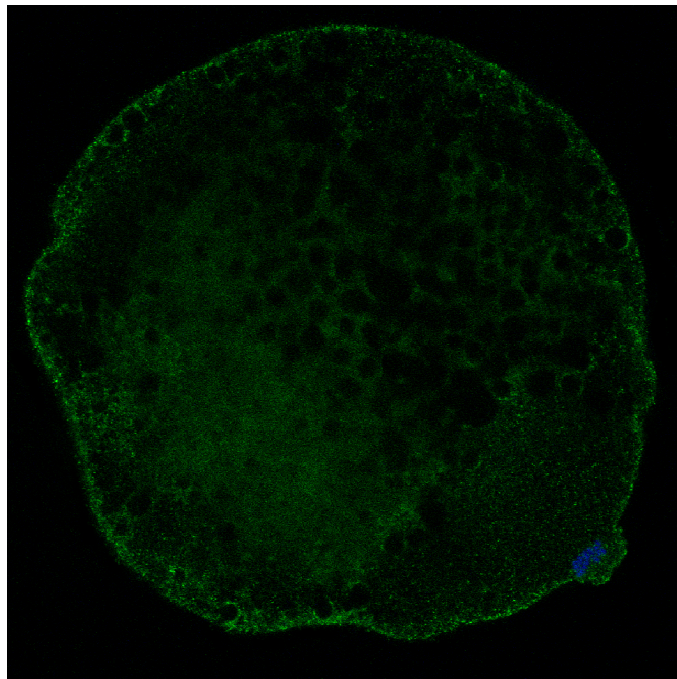
Obr. č. 9 Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 2 u oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení, enzym HO – 2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



Obr. č. 10 Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 2 u oocyty ve stádiu metafáze prvního meiotického dělení, enzym HO – 2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



Obr. č. 11. Detekce a lokalizace hemoxygenázy – 2 u oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení, enzym HO – 2 značen zeleně (FITC), chromatin značen modře (Hoechst 33258), snímáno na konfokálním mikroskopu (Leica SPE), zvětšeno 400x.



Statistické vyhodnocení lokalizace a redistribuce HO – 2 během meiotického zrání prasečích oocytů.

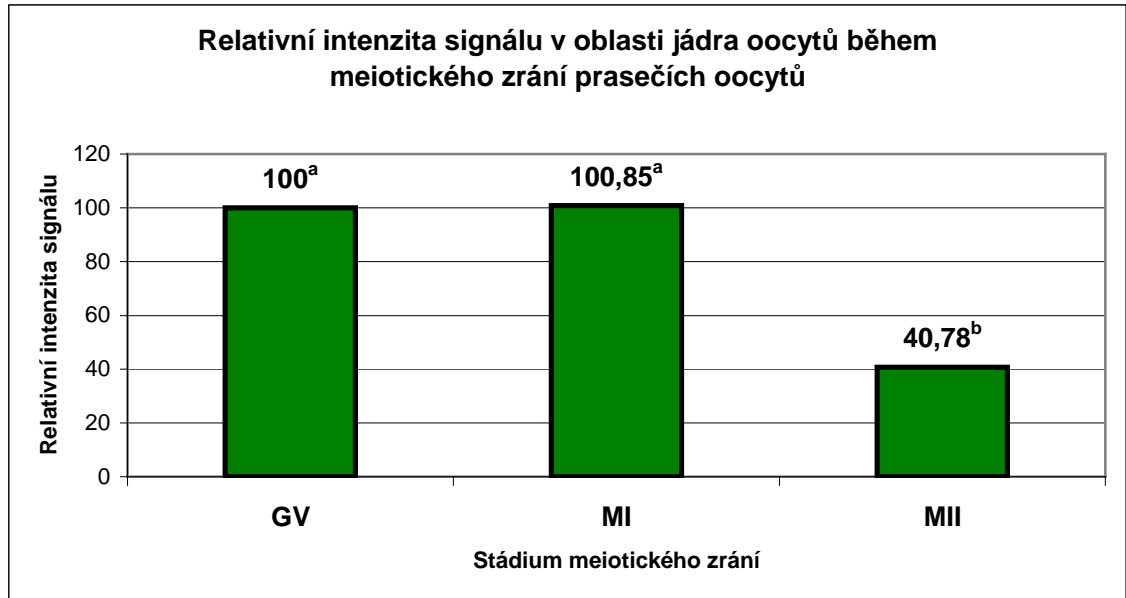
Vyhodnocením relativní intenzity signálu v oblasti jádra během meiotického zrání bylo zjištěno statisticky významné snížení relativní intenzity signálu při přechodu ze stádia MI do MII. Změna v relativní intenzitě signálu enzymu HO – 2 mezi GV a MI nebyla statisticky významná (graf č. 5).

V cytoplazmě bylo zjištěno statisticky významné snížení v relativní intenzitě signálu enzymu HO – 2 při přechodu ze stádia GV do MI. Mezi MI a MII nebyl vyhodnocen statisticky významný rozdíl (graf č. 6).

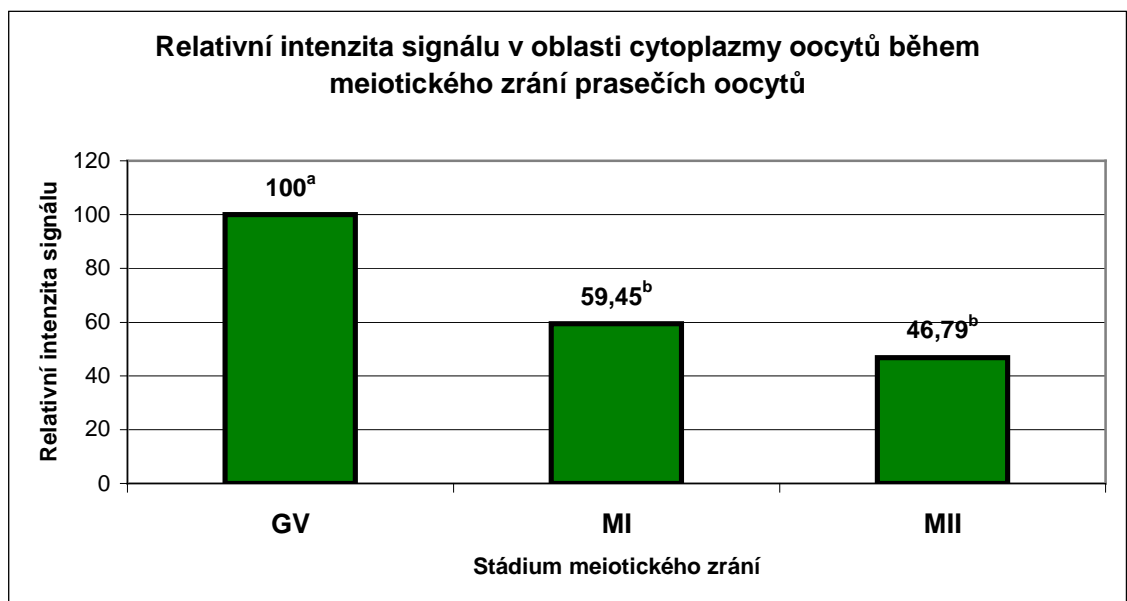
V korové oblasti bylo vyhodnoceno statisticky významné snížení v relativní intenzitě signálu enzymu HO – 2 ve všech stádiích meiotického zrání při přechodu ze stádia GV do stádia MI i MII (graf č. 7).

Při vyhodnocení celkové relativní intenzity signálu v oocytech během meiotického zrání bylo zjištěno statisticky významné snížení intenzity signálu enzymu HO – 2 (graf č. 8).

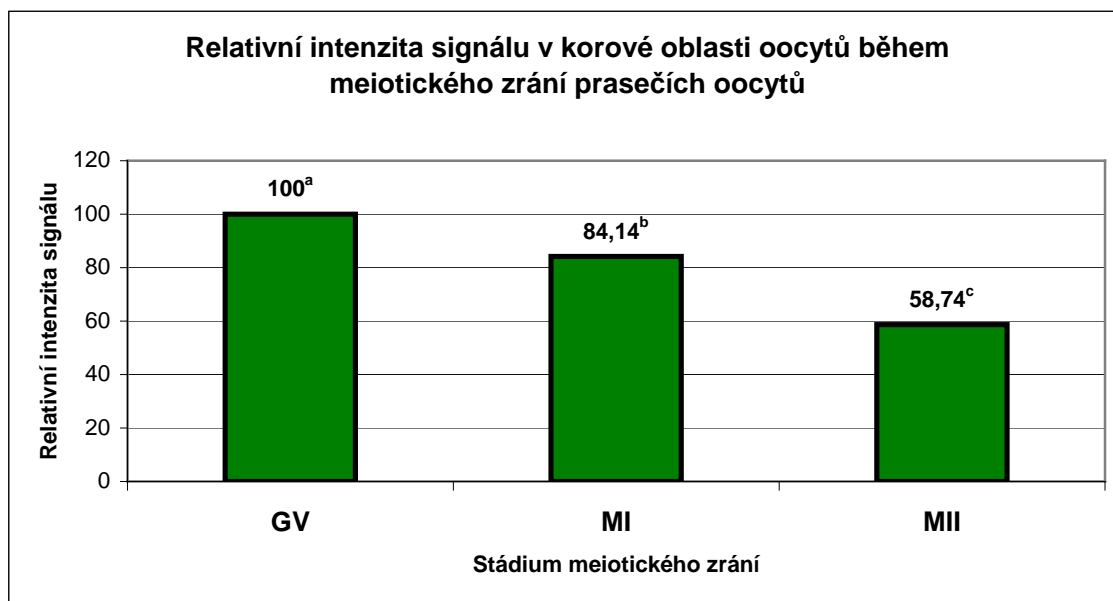
Graf č. 5: Relativní intenzita signálu HO – 2 v oblasti jádra oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu v oblasti jádra u skupiny oocytů v GV stádiu. ^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.



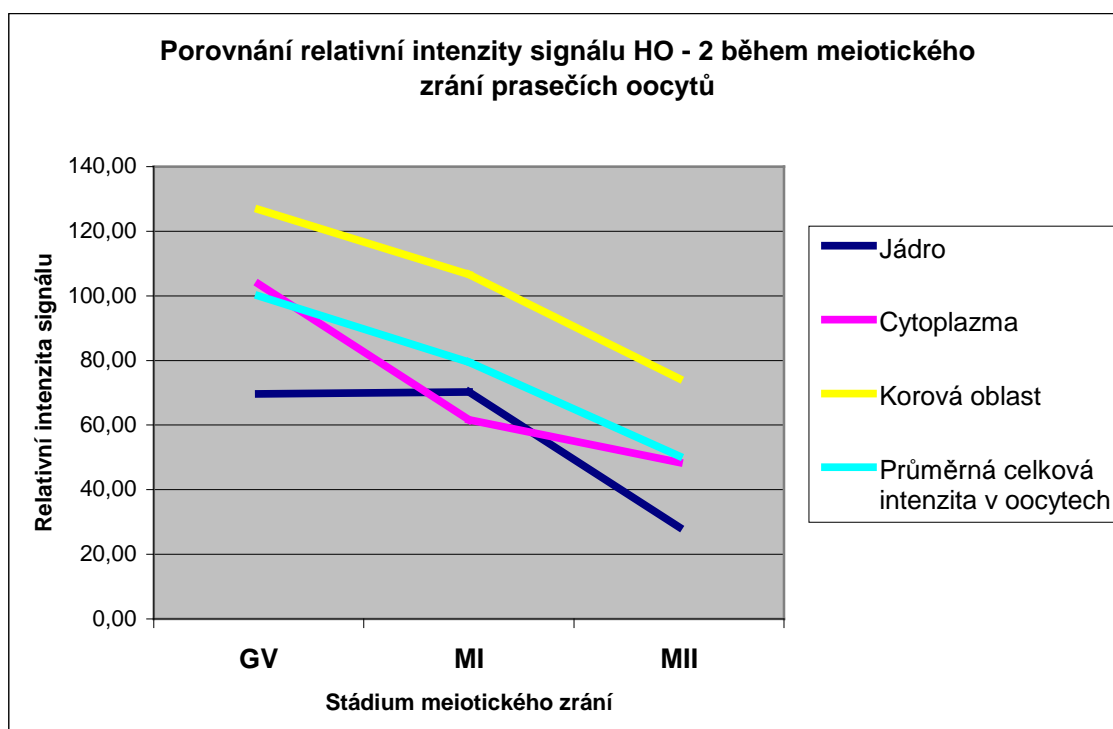
Graf č. 6: Relativní intenzita signálu HO – 2 v oblasti cytoplazmy oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu v oblasti cytoplazmy u skupiny oocytů v GV stádiu. ^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.



Graf č. 7: Relativní intenzita signálu HO – 2 v korové oblasti oocytů během meiotického zrání prasečích oocytů, vztažená k intenzitě signálu v korové oblasti u skupiny oocytů v GV stádiu. ^{abc}Rozdílnými superskripty jsou označeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stádii meiotického zrání.



Graf č. 8: Porovnání relativní intenzity signálu HO – 2 v jádře, cytoplazmě, korové oblasti a v oocytech celkem během meiotického zrání prasečích oocytů. Hodnocené relativní hodnoty jsou vztaženy k průměrné relativní intenzitě signálu HO – 2 u oocytů ve stádiu GV.



6. Diskuze

Systém HO/CO hraje důležitou roli v reprodukční soustavě samců a samic. Podílí se na regulaci spermatogeneze a steroidogeneze ve varlatech, kde zároveň působí jako ochranný faktor před působením stresových faktorů (Maines and Ewing, 1996, Ozawa et al., 2002, Li et al., 2013). Tento systém má rovněž význam v semenné plazmě, kde hladina HO pozitivně koreluje s koncentrací spermií a jejich motilitou (Abdel Aziz et al., 2008). Jako důležitý fyziologický proces, kde se předpokládá efekt HO, je erekce penisu (Ushiyama et al., 2004).

V samičí reprodukční soustavě je prokázán vliv systému HO/CO na fyziologický průběh estrálního cyklu a laktace (Alexandreaanu and Lawson, 2002). Stejně jako v samčí reprodukční soustavě se předpokládá, že systém HO/CO ovlivňuje steroidogenezi i v samičí reprodukční soustavě (Alexandreaanu and Lawson, 2003). Důležitým efektem je ovlivnění míry ovulace, životnosti žlutého tělíska a oplození schopnosti oocytů (Zenclussen et al., 2011a). Systém HO/CO je také důležitým regulátorem buněčné smrti (Untereiner et al., 2012) a tento efekt se projevuje i v reprodukční soustavě samic (Harada et al., 2004). Význam systému HO/CO v období gravidity je nesporný. Pomáhá udržovat březost a podílí se na fyziologických funkcích placenty (Levytska et al., 2013), a pokud je narušen, dochází k restrikci intrauterinního růstu plodů, abortům a změnám v placentě v důsledku zvýšené míry apoptózy (Zhao et al., 2009).

Cílem této práce bylo prokázat přítomnost enzymů HO – 1 a HO – 2 produkujících CO přímo v oocytech v průběhu meiotického zrání. Vyhodnocením pokusů zaměřených na lokalizaci a redistribuci HO – 1 a HO – 2 bylo zjištěno, že oba izoenzymy se nacházejí v oocytech v průběhu meiotického zrání, a to ve všech hodnocených oblastech, tj. v oblasti jádra, cytoplazmy a korové oblasti. V případě HO – 1 byla získána nižší relativní intenzita signálu v porovnání s HO – 2. Kvůli tomu je možné říci, že izoenzym HO – 1 je v oocytech v průběhu meiotického zrání zastoupen v nižším množství oproti HO – 2. Buněčná lokalizace HO – 1 převažovala v korové oblasti. Výsledkem zhodnocení redistribuce HO – 1 je, že během meiotického zrání nedochází k žádným změnám v redistribuci HO – 1 v oocytech.

Podobně jako v případě HO – 1 bylo zjištěno i u HO – 2, že buněčná lokalizace převládá v korové oblasti. Na rozdíl od HO – 1 bylo u HO – 2 vyhodnoceno, že dochází ke změnám v redistribuci během meiotického zrání. Ve všech hodnocených oblastech docházelo ke snižování relativní intenzity signálu HO – 2.

Z výsledku lokalizace izoenzymů HO – 1 a HO – 2 v oocytech lze předpokládat, že se v oocytech nacházejí i produkty enzymatické činnosti HO. Z tohoto důvodu je možné CO

považovat jako další gasotransmitter nacházející se v oocytech. V oocytech již byla prokázána přítomnost NOS, produkujícího NO (Takesue et al., 2003) stejně jako enzymů produkujících H_2S , cystathionine - γ - lyase (CSE) a 3 - mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MPST) (Šmelcová and Tichovská, 2011). U NO bylo prokázáno, že se podílí na signalizaci v průběhu meiotického zrání. Autoři Bu et al. (2003) zkoumali vliv NO na meiotické zrání myších oocytů. Použitím různých koncentrací inhibitorů a substrátů pro NOS zjistili, že efekt NO na inhibici či stimulaci meiotického zrání závisí na jeho koncentraci. Nízké koncentrace NO stimulovaly a byly pro meiotické zrání nezbytné, naopak vysoké koncentrace meiotické zrání inhibovaly a zároveň oocyt poškozovaly kvůli vzniku toxických radikálů.

Rovněž v případě H_2S bylo prokázáno, že má vliv na meiotické zrání. V práci autorů Liang et al. (2007) bylo zjištěno, že inhibice enzymu produkujícího H_2S cystathionin - β - syntázy (CBS) v granulóznicích buňkách následně vede u myších oocytů k zabránění meiotickému zrání.

S ohledem na NO a H_2S je nutno zdůraznit provázanost účinků NO a CO, jakož i H_2S . NO zvyšuje expresi HO -1 a tím usnadňuje vznik CO (Motterlini et al., 2002). Na druhou stranu CO vazbou na hemovou skupinu iNOS oslabuje její aktivitu (Kim et al., 2008b). V případě H_2S bylo prokázáno, že H_2S stimuluje expresi HO - 1 (Qingyou et al., 2004) a zároveň inhibuje produkci NO (Oh et al., 2006). Z těchto prací je zřejmé, že i v oocytech bude docházet k vzájemným interakcím mezi těmito gasotransmitery.

Kvůli lokalizaci izoenzymů HO - 1 a HO - 2 v oocytech je možné předpokládat, že je CO zapojen do signalizačních dějů v oocytech. Nicméně způsob jakým CO v oocytech působí je neznámý.

Izoenzymy HO se nacházejí v různých částech samičí reprodukční soustavy. V ováriích je možné detekovat HO ve stromatu ovárií, v granulóznicích a thékálních buňkách folikulů, jakož i v CL (Alexandreaanu and Lawson, 2003). O lokalizaci HO v oocytech doposud nebyla publikována žádná vědecká práce. Díky tomuto faktu není známa funkce a přesný význam HO v oocytech. Doklad o významnosti HO - 1 v oocytech, jakož i celkově v ováriích, uvádí autoři Zenclussen et al. (2011a). Autoři prokázali, že u myší deficientních pro HO - 1 docházelo ke snížení počtu ovulovaných oocytů, přičemž množství folikulů nacházejících se v ováriích bylo srovnatelné s počtem folikulů u myší s fyziologickým množstvím HO - 1. Autoři dále prokázali horší kvalitu oocytů ve smyslu snížené oplozeníschopnosti oocytů získaných od HO - 1 deficientních myší. Nicméně není jasné, zda tato snížená kvalita oocytů je způsobená přímo nedostatkem HO - 1 v oocytech nebo zda je zapříčiněna spíše nedostatkem HO - 1 v buňkách folikulu. Význam HO - 1 na

oplozeníschopnost oocytů byl rovněž zkoumán autory Loredana et al. (2014). Autoři zkoumali využití míry exprese enzymů iNOS a HO – 1 jako biomarkeru kompetence lidských oocytů k podstoupení fertilizace a následnému zdárnému embryonálnímu vývoji. Autoři zjišťovali míru exprese a zastoupení proteinů iNOS a HO – 1 v kumulárních buňkách oocytů. Výsledkem jejich práce je zjištění, že zvýšení exprese iNOS a HO – 1 negativně koreluje s oplozeníschopností oocytů. Tato skutečnost může být způsobená zapojením iNOS a HO – 1 v regulaci oxidativního stresu. Při zvýšené syntéze NO může docházet ke vzniku toxických radikálů, které mohou poškozovat buňky (Kröncke et al., 1991). HO – 1 může být oxidativním stresem indukována (Ryter and Choi, 2013) a může působit jako ochranný faktor (Untereiner et al., 2012). Zároveň NO zvyšuje expresi HO – 1 (Motterlini et al., 2002). Nicméně, pokud by se uvažoval proapoptotický efekt HO (Peyton et al., 2002, Zhou et al., 2005, Mustafa et al., 2009, Untereiner et al., 2012), potom by i samotný enzym HO mohl působit jako faktor, který by mohl snižovat kvalitu oocytu. Poznání skutečného významu HO by mělo být cílem dalších výzkumů.

Z práce autorů Loredana et al. (2014) a Zenclussen et al. (2011a) je možné soudit, že exprese HO – 1 v oocytech, podobně jako v jiných typech buněk (Applegate et al., 1991), reaguje na působení stresových faktorů a pokud je exprese snižena, dochází v důsledku jejich působení ke snížení kvality oocytů. K tomuto snížení kvality by mohlo dojít v důsledku ztráty ochranné funkce HO (Untereiner et al., 2012).

V práci autorů Harada et al. (2004) je uveden vztah mezi mírou exprese HO – 1 a kvalitou folikulu. Autoři porovnávali vliv izoenzymů HO – 1 a HO – 2 na apoptózu granulózních buněk folikulů prasete. V případě granulózních buněk získaných z atretických folikulů prasete byla pozorována vysoká míra exprese v porovnání s granulózními buňkami získanými z kvalitních folikulů. Ve spojitosti s výsledky autorů Loredana et al. (2014) lze i z práce autorů Harada et al. (2004) soudit, že by oplozeníschopnost oocytů pocházejících z folikulů se zvýšenu mírou exprese HO – 1 mohla být snižena. Nicméně přímý efekt změny exprese HO – 1 přímo v oocytu je třeba teprve zjistit.

V porovnání s HO – 1 je prací zabývajících se významem HO – 2 v reprodukční soustavě méně. Předpokládá se, že HO – 2 zaujímá důležitou roli ve vývoji zárodečných buněk (Abraham and Kappas, 2008). V práci autorů Ewing and Maines (1995) jsou popsány změny v mRNA pro HO – 2 a proteinů HO – 2 v průběhu spermatogeneze. Autoři popisují, že HO – 2 se nenachází ve spermatogóniích, ale v malém množství je detekovatelná ve spermatocytech a spermatidách. Naproti tomu mRNA pro HO – 2 je detekována nejen ve spermatocytech a spermatidách, nýbrž i v spermatogóniích. Rozdíl v zastoupení mRNA a

proteinů souvisí s rozdílnou mírou translace mRNA pro HO – 2 v různých buněčných stádiích spermatogeneze. Translace mRNA pro HO – 2 je spojená vývojem samčích pohlavních buněk. Z práce autorů Ewing and Maines (1995) vyplývá fakt, že se HO – 2 může podílet na vývoji samčích pohlavních buněk. Zda se HO – 2 podílí i na vývoji samičích pohlavních buněk prozatím není známo.

Autoři Harada et al. (2004) prokázali nejen změny v zastoupení HO – 1 u granulózních buněk z kvalitních a atretických folikulů prasete, nýbrž i změny v zastoupení HO – 2. V porovnání s HO – 1 je trend změn HO – 2 opačný. V granulózních buňkách pocházejících z kvalitních folikulů lze detekovat HO – 2 a v případě atretických folikulů dochází ke snížení v zastoupení HO – 2 v granulózních buňkách.

Z výsledků změn v relativní intenzitě signálu pro HO – 2 během meiotického zrání je pozorováno snižování relativní intenzity signálu. Z tohoto důvodu lze tvrdit, že během meiotického zrání dochází ke snižování množství izoenzymu HO – 2 v prasečích oocytech. Zároveň je možné uvažovat, že HO – 2 je určitým způsobem zapojen do procesu meiotického zrání. Tuto úvahu je nutné potvrdit dalším výzkumem. Zároveň je potřeba určit případný mechanismus účinku HO – 2 během meiotického zrání.

Zhodnocením výsledků relativní intenzity signálů HO – 1 během meiotického zrání nebylo pozorováno, že by docházelo k statisticky významným změnám. Díky přítomnosti tohoto izoenzymu v oocytech i v průběhu meiotického zrání lze očekávat, že HO – 1 může mít určitou roli v regulaci tohoto důležitého procesu. Přesnou roli HO – 1 v průběhu meiotického zrání je nutné zjistit dalším výzkumem např. inhibicí HO – 1 během meiotického zrání.

7. Závěr

Meiotické zrání je klíčovým dějem ve vzniku oplozeníšchopných oocytů a z vyhodnocení redistribuce enzymu hemoxygenázy během meiotického zrání lze usuzovat na možnost jeho zapojení do tohoto procesu. Hemoxygenáza (HO) je enzymem katalizujícím rozpad hemu na biliverdin, Fe^{2+} a oxid uhelnatý (CO). CO je důležitým gasotransmiterem, který má vliv i na reprodukční soustavu samic. Význam CO přímo v oocytech je dosud neznámý. Proto prvním krokem k určení jeho možného významu je zjištění, zda se enzym hemoxygenáza v oocytech nachází. Z tohoto důvodu bylo cílem této práce určení lokalizace a redistribuce izoenzymů hemoxygenázy během meiotického zrání prasečích oocytů.

V experimentu byla sledována lokalizace a redistribuce izoenzymů HO – 1 a HO – 2 ve třech stádiích meiotického zrání, tj. ve stádiu GV, MI a MII. Hodnoceny byly tři oblasti oocytů, tj. oblast jádra, cytoplazmy a korové oblasti. Díky výsledkům experimentu se podařilo potvrdit vědeckou hypotézu, neboť oba izoenzymy byly v oocytech lokalizovány ve všech stádiích meiotického zrání. Vyhodnocením změn relativní intenzity signálu pro HO bylo zjištěno, že v případě HO – 1 nedochází během meiotického zrání ke statisticky významným změnám v redistribuci tohoto izoenzymu. Posouzením HO – 2 během meiotického zrání byl zjištěn statisticky významný pokles relativní intenzity signálu HO – 2 s nejvyšší hodnotou ve stádiu GV a nejnižší ve stádiu MII.

Díky výsledkům této práce lze usuzovat na přítomnost CO v oocytech jakož i na možné zapojení HO – 2 a HO – 1 do procesu meiotického zrání. Nicméně význam obou izoenzymů v oocytech je třeba prokázat dalším výzkumem.

Zjištění významu HO v oocytech by mohlo pomoci lépe pochopit proces regulace vzniku oplozeníšchopných oocytů. Rovněž by tyto poznatky mohly být aplikovatelné do lidské asistované reprodukce a do reprodukční biotechnologie zvířat.

8. Seznam literatury

Abdel Aziz, M. T., Mostafa, T., Roshdy, N., Hosni, H., Rashed, L., Sabry, D., Abdel Nasser, T., Abdel Azim, O., Abdel Gawad, O. 2008. Heme oxygenase enzyme activity in human seminal plasma of fertile and infertile males. *Andrologia*. 40 (5). 292 – 297.

Abraham, N. G., Kappas, A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*. 60 (1). 79 – 127.

Acevedo, C. H., Ahmed, A. 1998. Heme oxygenase – 1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone. *The Journal of Clinical Investigation*. 101 (5). 949 – 955.

Adhikari, D., Liu, K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*. 30 (5). 438 – 464.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2007. *Molecular biology of the cell*. Garland Science. New York. p. 1392. ISBN: 9780815341055.

Alexandreaanu, I. C., Lawson, D. M. 2002. Effects of chronic administration of heme oxygenase substrate or inhibitor on progression of the estrous cycle, pregnancy and lactation of Sprague – Dawley rats. *Life Sciences*. 72 (2). 153 – 162.

Alexandreaanu, I. C., Lawson, D. M. 2003. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. 228 (1). 59 – 63.

Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. E., Lindner, H. R. 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *The Journal of Cell Biology*. 67 (3). 894 – 900.

André, L., Gouzi, F., Thireau, J., Meyer, G., Boissiere, J., Delage, M., Abdellaoui, A., Feillet – Coudray, C., Fouret, G., Cristol, J. P., Lacampagne, A., Obert, P., Reboul, C., Fauconnier, J., Hayot, M., Richard, S., Cazorla, O. 2011. Carbon monoxide exposure

enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Research in Cardiology*. 106 (6). 1235 – 1246.

Applegate, L. A., Luscher, P., Tyrrell, R. M. 1991. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Research*. 51 (3). 974 – 978.

Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., Tsafiriri, A. 2005. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 146 (1). 77 – 84.

Beg, M. A., Ginther, O. J. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*. 132 (3). 365 – 377.

Ben – Ami, I., Fremann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., Raziel, A., Seger, R., Ron – El, R., Amsterdam, A. 2006. PGE₂ up – regulates EGF – like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE₂ and LH in ovulation. *Molecular Human Reproduction*. 12 (10). 593 – 599.

Bergeron, L., Perez, G. I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K. E., Flaws, J. A., Salter, J. C., Hara, H., Moskowitz, M. A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J. L., Yuan, J. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase – 2 – deficient mice. *Genes and Development*. 12 (9). 1304 – 1314.

Bielanska – Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6 (2). 161 – 193.

Bilban, M., Bach, F., Otterbein, S., Ifedigboe, E., de Costa d´Avila, J., Esterbauer, H., Chin, B., Usheva, A., Robson, S., Wagner, O., Otterbein, L. E. 2006. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPAR γ . *Immunity*. 24 (5). 601 – 610.

Boehning, D., Moon, C., Sharma, S., Hurt, K. J., Hester, L. D., Ronnett, G. V., Shungar, D., Snyder, S. H. 2003. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase – 2. *Neuron*. 40 (1). 129 – 137.

Boehning, D., Sedaghat, L., Sedlak, T. W., Snyder, S. H. 2004. Heme oxygenase – 2 is activated by calcium – calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (30). 30927 – 30930.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*. 312 (5773). 596 – 600.

Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M., Soares, M. P. 2000. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 192 (7). 1015 – 1026.

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 (1 – 2). 21 – 30.

Buccione, R., Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., Eppig, J. J. 1990. FSH induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factors secreted by the oocyte. *Developmental Biology*. 138 (1). 16 – 25.

Bukovski, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Upadhyaya, N. B. 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2 (20). 1 – 30.

Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., Nasmyth, K. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell*. 103 (3). 387 – 398.

Burnett, A. L., Johns, D. G., Kriegsfeld, L. J., Klein, S. L., Calvin, D. C., Demas, G. E., Schramm, L. P., Tonegawa, S., Nelson, R. J., Snyder, S. H., Poss, K. D. 1998. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase – 2. *Nature Medicine*. 4 (1). 84 – 87.

Buszczak, M., Cooley, L. 2000. Eggs to die for: cell death during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death and Differentiation*. 7 (11). 1071 – 1074.

Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbé, J. C., Lorca, T. 2005. The anaphase – promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene*. 24 (3). 314 – 325.

Cella, M., Farina, M. G., Keller Sarmiento, M. I., Chianelli, M., Rosenstein, R. E., Franchi, A. M. 2006. Heme oxygenase – carbon monoxide (HO – CO) system in rat uterus: effect of sexual steroids and prostaglandins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 99 (1). 59 – 66.

Clark, J. E., Naughton, P., Shurey, S., Green, C. J., Johnson, T. R., Mann, B. E., Foresti, R., Motterlini, R. 2003. Cardioprotective actions by water – soluble carbon monoxide – releasing molecule. *Circulation Research*. 93 (2). 2 – 8.

Cudmore, M., Ahmad, S., Al – Ani, B., Fujisawa, T., Coxall, H., Chudasama, K., Deev, L. R., Wigmore, S. J., Abbas, A., Hewett, P. W., Ahmed, A. 2007. Negative regulation of soluble Flt – 1 and soluble endoglin release by heme oxygenase – 1. *Circulation*. 115 (13). 1789 – 1797.

De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaïskou, A., Jesus, C., Ozon, R. 2002. Thr – 161 phosphorylation of monomeric cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (32). 28592 – 28600.

Downs, S. M., Daniel, S. A., Bornslaeger, E. A., Hoppe, P. C., Eppig, J. J. 1989. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Research*. 23 (3). 323 – 334.

Downs, S. M., Cottom, J., Hunzicker – Dunn, M. 2001. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58 (1). 101 – 115.

Dolci, S., Pesce, M., De Felici, M. 1993. Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on *in vitro* proliferation of mouse primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*. 35 (2). 134 – 139.

Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Thompson, J. G., Armstrong, D. T., Gilchrist, R. B., 2007. Oocyte – secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. *Biology of Reproduction*. 76 (5). 848 – 857.

Driancourt, M. A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*. 35 (1). 55 – 68.

Driancourt, M. A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55 (6). 1211 – 1239.

Driancourt, M. A., Locatelli, A., Prunier, A. 1995. Effects of gonadotropin deprivation on follicular growth in gilts. *Reproduction, Nutrition, Development*. 35 (6). 663 – 673.

Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. 2000. Roles of Kit and Kit ligand in ovarian function. *Reviews of Reproduction*. 5 (3). 143 – 152.

Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen, A. P. 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti – Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 140 (12). 5789 – 5796.

Durlinger, A. I., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen, A. P. 2001. Anti – Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 142 (11). 4891 – 4899.

Edwards, R. G. 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 208 (5008). 349 – 351.

Eichenlaub – Ritter, U. 2012. Oocyte aging and its cellular basis. *The International Journal of Developmental Biology*. 56 (10 – 12). 841 – 852.

Eichenlaub – Ritter, U., Peschke, M. 2002. Expression in *in vivo* and *in vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*. 8 (1). 21 – 41.

Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., Matzuk, M. M. 1999a. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9 deficient ovary. *Molecular Endocrinology*. 13 (6). 1018 – 1034.

Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, M. M. 1999b. Paracrine actions of growth differentiation factor 9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*. 13 (6). 1035 – 1048.

Erickson, G. F., Magoffin, D. A., Dyer, C. A., Hofeditz, C. 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrinology Review*. 6 (3). 371 – 399.

Ewing, J. F., Maines, M. D. 1995. Distribution of constitutive (HO – 2) and heat – inducible (HO – 1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO – 2 displays stage specific expression in germ cells. *Endocrinology*. 136 (5). 2294 – 2302.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3). 203 – 216.

Ferrell, J. Jr., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} and a microtubule – associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (4). 1965 – 1971.

Findlay, J. K., Drummond, A. E., Britt, K. L., Dyson, M., Wreford, N. G., Robertson, D. M., Groome, N. P., Jones, M. E., Simpson, E. R. 2000. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163 (2). 81 – 87.

Fortune, J. E., Eppig, J. J. 1979. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries *in vitro*. *Endocrinology*. 105 (3). 760 – 768.

Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288 (5789). 373 – 376.

Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., Ritvos, O. 2000. Mutations in an oocyte – derived growth factor gene (BMP – 15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage – sensitive manner. *Nature Genetics*. 25 (3). 279 – 283.

Garrido, C., Saule, S., Gospodarowicz, D. 1993. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in bovine granulosa cells. *Growth factors*. 8 (2). 109 – 117.

Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S., Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (1). 106 – 114.

Gorman, D., Drewry, A., Huang, Y. L., Sames, C. 2003. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology*. 187 (1). 25 – 38.

Greenfeeld, C. R., Pepling, M. E., Babus, J. K., Furth, P. A., Flaws, J. A. 2007. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*. 133 (5). 865 – 876.

Guthrie, H. D., Grimes, R. W., Cooper, B. S., Hammond, J. M. 1995. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *Journal of Animal Science*. 73 (9). 2834 – 2844.

Han, S. J., Conti, M. 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*. 5 (3). 227 – 231.

Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., Conti, M. 2005. Wee1B is an oocyte – specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology*. 15 (18). 1670 – 1676.

Han, S. J., Vaccari, S., Nedachi, T., Andersen, C. B., Kovacina, K. S., Roth, R. A., Conti, M. 2006. Protein kinase/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *The EMBO Journal*. 25 (24). 5716 – 5725.

Harada, T., Koi, H., Kubota, T., Aso, T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis *in vitro*. *The Journal of Endocrinology*. 181 (1). 191 – 205.

Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., Noguchi, M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase – 3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase – 2 gene. *Gene*. 336 (2). 241 – 250.

Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., Smyth, C. D. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the two – cell, two – gonadotrophin model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 100 (1). 51 – 54.

Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyaki, M., Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100 (2). 333 – 339.

Hirshfield, A. N. 1991a. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction*. 44 (6). 1157 – 1162.

Hirshfield, A. N. 1991b. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124. 43 – 101.

Holt, J. E., Lane, S. I. R., Jones, K. T. 2013. The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Current Topics in Developmental Biology*. 102. 207 – 226.

Hoyt, M. A. 2001. A new view of the spindle checkpoint. *The Journal of Cell Biology*. 154 (5). 909 – 911.

Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (1). 122 – 134.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W., Conti, M. 2007. Luteinizing hormone – dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*. 27 (5). 1914 – 1924.

Hu, Y. C., Wang, P. H., Yeh, S., Wang, R. S., Xie, C., Xu, Q., Zhou, X., Chao, H. T., Tsai, M. Y., Chang, C. 2004. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (31). 11209 – 11214.

Hunt, P. A., Hassold, T. J. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics*. 24 (2). 86 – 93.

Hunter, M. G. 2000. oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 – 130.

Chesnel, F., Eppig, J. J. 1995. Synthesis and accumulation of p34^{cdc2} and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (4). 503 – 508.

Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T., Sagata, N. 2007. A direct link of the Mos – MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446 (7139). 1100 – 1104.

Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*. 83 (10). 669 – 682.

Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T. M., Sawada, W., Kishimoto, T. 2000. Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M – M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *The EMBO Journals*. 19 (17). 4513 – 4523.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145 – 150.

Johnson, 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., Lacomini, L., 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 – 315.

Jones, K. T. 2011. Anaphase – promoting complex control in female mouse meiosis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 53. 343 – 363.

Kawamura, K., Ye, Y., Liang, C. G., Kawamura, N., Gelpke, N. S., Rauch, R., Tanaka, T., Hsueh, A. J. 2009. Paracrine regulation of the resumption of oocyte meiosis by endothelin – 1. *Developmental Biology*. 327 (1). 62 – 70.

Kawamura, K., Cheng, Y., Kawamura, N., Takae, S., Okada, A., Kawagoe, Y., Mulders, S., Terada, Y., Hsueh, A. J. 2011. Pre – ovulatory LH/hCG surge decreases C – type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of the pre – ovulatory oocytes. *Human Reproduction*. 26 (11). 3094 – 3101.

Kerr, B., Garcia – Rudaz, C., Dorfman, M., Paredes, A., Ojeda, S. R. 2009. NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*. 138 (1). 131 – 140.

Keyse, S. M., Tyrrell, R. M. 1989. Heme oxygenase is the major 32 – kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (1). 99 – 103.

Kim, J. M., Yoon, Y. D., Tsang, B. K. 1999. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53 – mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*. 140 (5). 2307 – 2317.

Kim, K. M., Pae, H. O., Zheng, M., Park, R., Kim, Y. M., Chung, H. T. 2007. Carbon monoxide induces heme oxygenase – 1 via activation of protein kinase R – like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circulation research*. 101 (9). 919 – 927.

Kim, H. S., Loughran, P. A., Rao, T. R., Zuckerbraun, B. S. 2008a. Carbon monoxide activates NF – kappa B via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 295 (1). 146 – 152.

Kim, H. S., Loughran, P. A., Billiar, T. R. 2008b. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL – 1 beta – stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide*. 18 (4). 256 – 265.

Knox, R. V., Vatzias, G., Naber, C. H., Zimmermann, D. R. 2003. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. *Journal of Animal Science*. 81 (1). 249 – 260.

Knox, R. V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. 29 (2). 385 – 397.

Kol, S., Adashi, E. Y. 1995. Intraovarian factors regulating ovarian function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 7 (3). 209 – 213.

Kovo, M., Kandli – Cohen, M., Ben – Haim, M., Galiani, D., Carr, D. W., Dekel, N. 2006. An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*. 132 (1). 33 – 43.

Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., Peters, J. M. 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular Biology of the Cell*. 11 (5). 1555 – 1569.

Kreck, T. C., Shade, E. D., Lamm, W. J., McKinney, S. E., Hlastala, M. P. 2001. Isocapnic hyperventilation increases carbon monoxide elimination and oxygen delivery. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 163 (2). 458 – 462.

Kröncke, K. D., Kolb – Bachofen, V., Berschick, B., Burkart, V., Kolb, H. 1991. Activated macrophages kill pancreatic islet cells via arginine – dependent nitric oxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 175 (3). 752 – 758.

Kudo, N. R., Anger, M., Peters, A. H., Stemmann, O., Theussl, H. C., Helmhart, W., Kudo, H., Heyting, C., Nasmyth, K. 2009. Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *Journal of Cell Science*. 122 (15). 2686 – 2698.

Lamar, C. A., Bhat, K. G., Mahesh, B. V. 1996. Regulation of gonadotropin releasing hormone secretion by heme molecules: a regulatory role for carbon monoxide? *Endocrinology*. 137 (2). 790 – 793.

Lamon, B. D., Zhang, F. F., Puri, N., Brodsky, S. V., Goligorsky, M. S., Nasjletti, A. 2009. Dual pathways of carbon monoxide – mediated vasoregulation: modulation by redox mechanism. *Circulation Research*. 105 (8). 775 – 783.

Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K., Shimasaki, S. Effect of bone morphogenetic protein – 7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*. 65 (4). 994 – 999.

Lee, P. S., Buchan, A. M., Hsueh, A. J., Yuen, B. H., Leung, P. C. 2002. Intracellular calcium mobilization in response to the activation of human wild – type and chimeric gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 143 (5). 1732 – 1740.

Levytska, K., Kingdom, J., Baczyk, D., Drewlo, S. 2013. Heme oxygenase – 1 in placental development and pathology. *Placenta*. 34 (4). 291 – 298.

Li, A., Xi, Q., Umstot, E. S., Bellner, L., Schwartzman, M. L., Jaggar, J. H., Leffler, C. W. 2008. Astrocyte derived CO is a diffusible messenger that mediates glutamate –

induced cerebral arteriolar dilation by activating smooth muscle cell K_{Ca} channels. *Circulation Research*. 102 (2). 234 – 241.

Li, L., Han, Z. Y., Li, C. M., Jiang, X. Q., Wang, G. L. 2013. Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock – induced apoptosis in mouse testis. *Cell Stress and Chaperones*. 18 (3). 333 – 351.

Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Shang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 24 (1). 89 – 96.

Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2 deficient mice. *Cell*. 91 (2). 197 – 208.

Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., Donovan, P. J. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30 (4). 446 – 449.

Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K., Selstam, G., Reddy, P. 2006. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Developmental Biology*. 299 (1). 1 – 11.

Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Mery, J., Means, A., Dorée, M. 1993. Calmodulin – dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366 (6452). 270 – 273.

Lorca, T., Castro, A. 2010. Mechanism controlling maintenance and exit of the CSF arrest. In: Verlhac, M. H., Villeneuve, A. (eds.). *Oogenesis: The universal process*. Wiley – Blackwell. Chippenham. p. 343 – 355. ISBN: 978-0-470-69682-8.

Loredana, B., Gemma, B., Francesca, E., Stefano, C., Paola, D., Elisabetta, A., Alberto, R., Chiara, B., Dario, G. 2014. Inducible nitric oxide synthase and heme oxygenase –

1 are expressed in human cumulus cells and may be used as biomarkers of oocyte competence. *Reproductive Sciences*. doi: 10.1177/1933719114525268.

Lucy, M. C., Liu, J., Boyd, C. K., Bracken, C. J. 2001. Ovarian follicular growth in sows. *Reproduction Supplement*. 58. 31 – 45.

Maines, M. D., Ewing, J. F. 1996. Stress response of the rat testis: *in situ* hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase – 1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biology of Reproduction*. 54 (5). 1070 – 1079.

Maines, M. D. 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 37. 517 – 554.

Marangos, P., Carroll, J. 2004. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction*. 128 (2). 153 – 162.

Martins da Silva, S. J., Bayne, R. A., Cambray, N., Hartley, P. S., McNeilly, A. S., Anderson, R. A. 2004. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Developmental Biology*. 266 (2). 334 – 345.

Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., Eppig, J. J. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 5576 (296). 2178 – 2190.

McGee, E. A., Hsueh, A. J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Review*. 21 (2). 200 – 214.

McNatty, K. P., Heath, D. A., Lundy, T., Fidler, A. E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N., Tisdall, D. J. 1999. Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54. 3 – 16.

Meduri, G., Charnaux, N., Driancourt, M. A., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H., Milgrom, E. 2002. Follicle – stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87 (5). 2266 – 2276.

Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170 (2). 607 – 615.

Middendorff, R., Kumm, M., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., Muller, D. 2000. Generation of cyclic guanosine monophosphate by heme oxygenases in the human testis – a regulatory role for carbon monoxide in Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 63 (2). 651 – 657.

Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* eggs extracts form meiotic M phase. *Nature*. 449 (7160). 336 – 340.

Montro, B., Bernstein, A. 1993. Dynamic changes in ovarian c – kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. *Developmental Dynamics*. 197 (1). 69 – 79.

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 (3). 485 – 491.

Motterlini, R., Green, C. J., Foresti, R. 2002. Regulation of heme oxygenase – 1 by redox signals involving nitric oxid. *Antioxidants & Redox Signaling*. 4 (4). 615 – 624.

Motterlini, R., Otterbein, L. E. 2010. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature Reviews: Drug discovery*. 9 (9). 728 – 743.

Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1995. Myt1: a membrane – associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine – 14 and tyrosine – 15. *Science*. 270 (5233). 86 – 90.

Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Snyder, S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Science Signaling*. 2 (68). doi:10.1126/scisignal.268re2.

Nasmyth, K. 2001. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annual Review of Genetics*. 35. 673 – 745.

Nebreda, A. R., Hunt, T. 1993. The c – mos proto – oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell – free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *The EMBO Journals*. 12 (5). 1979 – 1986.

Newhall, K. J., Criniti, A. R., Cheah, C. S., Smith, K. C., Kafer, K. E., Burkart, A. D., McKnight, G. S. 2006. Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Current Biology*. 16 (3). 321 – 327.

Nilsson, E. E., Skinner, M. K. 2002. Growth and differentiation factor – 9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of Reproduction*. 67 (3). 1018 – 1024.

Nilsson, E. E., Skinner, M. K. 2004. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 214 (2). 19 – 25.

Nishiyama, T., Tachibana, K., Kishimoto, T. 2010. Cytostatic arrest: post – ovulation arrest until fertilization in metazoan oocytes. In: Verlhac, M. H., Villeneuve, A. (eds.). *Oogenesis: The universal process*. Wiley – Blackwell. Chippingham. p. 357 – 384. ISBN: 978-0-470-69682-8.

Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L., Lampe, P. D., Jaffe, L. A. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase – dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*. 135 (19). 3229 – 3238.

Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136 (11). 1869 – 1878.

Oh, G. S., Pae, H. O., Lee, B. S., Kim, J. M., Kim, H. R., Jeon, S. B., Jeon, W. K., Chae, H. J., Chung, H. T. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor kappa B via heme oxygenase – 1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology & Medicine*. 41 (1). 106 – 119.

Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of Cell Biology*. 188 (2). 199 – 207.

Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G. F., Shimasaki, S. 2000. Bone morphogenetic protein – 15. Identification of target cell and biological functions. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (50). 39523 – 39528.

Otsuka, F., Shimasaki, S. 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (12). 8060 – 8065.

Ozawa, N., Goda, N., Makino, N., Yamaguchi, T., Yoshimura, Y., Suematsu, M. 2002. Leydig cell – derived heme oxygenase – 1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *The Journal of Clinical Investigation*. 109 (4). 457 – 467.

Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34^{cdc2}/cyclin B during oocyte maturation: p90^{msk} phosphorylates and inactivates the p34^{cdc2} inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17 (17). 5037 – 5047.

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., Conti, M. 2008. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Molecular Endocrinology*. 22 (4). 924 – 936.

Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M. 2004. EGF – like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 303 (5658). 682 – 684.

Peyton, K. J., Reyna, S. V., Chapman, G. B., Ensenat, D., Liu, X. M., Wang, H., Schafer, A. I., Durante, W. 2002. Heme oxygenase – 1 derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood*. 99 (12). 4443 – 4448.

Peng, X. R., Hsueh, A. J., La Polt, P. S., Bjersing, L., Ny, T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 129 (6). 3200 – 3207.

Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J. A., Korsmeyer, S. J., Tilly, J. L. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax – deficiency. *Nature Genetics*. 21 (2). 200 – 203.

Pepling, M. E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 44 (12). 622 – 632.

Pepling, M. E., Spradling, A. C. 1998. Female mouse germ cells from synchronously dividing cysts. *Development*. 125 (17). 3323 – 3328.

Pepling, M. E., Spradling, A. C. 2001. The mouse ovary contains germ cell cysts that undergo programmed breakdown to form follicles. *Developmental Biology*. 234 (2). 339 – 351.

Peter, M., Labbe, J. C., Dorée, M., Mandart, E. 2002. A new role for mos in *Xenopus* oocyte maturation: targeting Myt1 independently of MAPK. *Development*. 129 (9). 2129 – 2139.

Peters, J. M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 7 (9). 644 – 656.

Piantadosi, C. A. 2002. Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxidants and Redox Signaling*. 4 (2). 259 – 270.

Picard, A., Peaucellier, G., Le Bouffant, F., Le Peuch, C., Dorée, M. 1985. Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation – promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes. *Developmental Biology*. 109 (2). 311 – 320.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145 (1). 27 – 37.

Piotrkowski, B., Monzo, C. M., Pagotto, R. M., Reche, C. G., Besio, M., Cymeryng, C. B., Pignataro, O. P. 2009. Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis. *The Journal of Endocrinology*. 203 (1). 155 – 165.

Poon, R. Y., Yamashita, K., Adamczewski, J. P., Hunt, T., Shuttleworth, J. 1993. The *cdc2* – related protein p40^{MO15} is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33^{cdk2} and p34^{cdc2}. *The EMBO Journal*. 12 (8). 3123 – 3132.

Procházka, R., Nagyová, E., Rimkevicová, Z., Nagai, T., Kikuchi, K., Motlík, J. 1991. Lack of effect of oocyectomy on expansion of the porcine cumulus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93 (2). 569 – 576.

Prunier, A., Chopineau, M., Mounier, A. M., Mormede, P. 1993. Patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and corticosteroids from birth to the first oestrous cycle in Meishan gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 98 (2). 313 – 319.

Qingyou, Z., Junbao, D., Weijin, Z., Hui, Y., Chaoshu, T., Chunyu, Z. 2004. Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317 (1). 30 – 37.

Queiroga, C. S., Almeida, A. S., Alves, P. M., Brenner, C., Vieira, H. L. 2011. Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization. *BMC Cell Biology*. 12 (10). 1 – 8.

Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., Lindgren, P., Liu, Y. X., Sun, Q. Y., Liu, K. 2005. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*. 281 (2). 160 – 170.

Reimann, J. D., Jackson, P. K. 2002. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature*. 416 (6883). 850 – 854.

Reis, A., Madgwick, S., Chang, H. Y., Nabti, I., Levasseur, M., Jones, K. T. 2007. Prometaphase APC^{cdh1} activity prevents non – disjunction in mammalian oocytes. *Nature Cell Biology*. 9 (10). 1192 – 1198.

Richard, F. J., Tsafirri, A., Conti, M. 2001. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 65 (5). 1444 – 1451.

Richards, A. J., Enders, G. C., Resnick, J. L. 1999. Activin and TGF β limit murine primordial germ cell proliferation. *Developmental Biology*. 207 (2). 470 – 475.

Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., Sharma, S. C. 2002. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*. 57. 195 – 220.

Richards, J. S. 2005. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234 (1 – 2). 75 – 79.

Ryter, S. W., Choi, A. M. K. 2013. Carbon monoxide: present and future indications for a medical gas. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 28 (2). 123 – 140.

Rochette, L., Cottin, Y., Zeller, M., Vergel, C. 2013. Carbon monoxide: mechanisms of actions and potential implications. *Pharmacology and Therapeutics*. 137 (2). 133 – 152.

Rucker, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garret, L., Wynshaw – Boris, A., Flaws, J. A., Hennighausen, L. 2000. Bcl – x and BAX regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*. 14 (7). 1038 – 1052.

Rudra, C. B., Williams, M. A., Sheppard, L., Koenig, J. Q., Schiff, M. A., Frederick, I. O., Dills, R. 2010. Relation of whole blood carboxyhemoglobin concentration to ambient carbon monoxide exposure estimated using regression. *American Journal of Epidemiology*. 171 (8). 942 – 951.

Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing. Praha. s. 432. ISBN: 978 – 80 – 247 – 2640 – 3.

Sagata, N., Daar, I., Oskarsson, M., Showalter, S. D., Vande Woude, G. F. 1989a. The product of the mos proto – oncogene as a candidate initiator for oocyte maturation. *Science*. 245 (4918). 643 – 646.

Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y. 1989b. The c – mos proto – oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*. 342 (6249). 512 – 518.

Sánchez, F., Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1822 (12). 1896 – 1912.

Sawyer, H. T., Smith, P., Heath, D. A., Juengel, J. L., Wakefield, S. J., McNatty, K. P. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*. 66 (4). 1134 – 1150.

Sela – Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., Dekel, N. 2005. Mitogen – activated protein kinase mediates luteinizing hormone – induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146 (3). 1236 – 1244.

Sela – Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147 (5). 2280 – 2286.

Sela – Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*. 78 (6). 1111 – 1118.

Schmidt, K. L., Kryger – Baggesen, N., Byskob, A. G., Andersen, C. Y. 2005. Anti – Mullerian hormone initiates growth of human primordial follicles *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234 (2). 87 – 93.

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 (7). 1213 – 1218.

Schuh, M., Ellenberg, J. 2007. Self – organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 130 (3). 483 – 498.

Silvestre, F., Boni, R., Fissore, R. A., Tosti, E. 2011. Ca²⁺ signaling during maturation of cumulus – oocyte complex in mammals. *Molecular Reproduction and Development*. 78 (10 – 11). 744 – 756.

Sjostrand, T. 1952. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin *in vivo*. *Acta Physiologica Scandinavica*. 26 (4). 338 – 344.

Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. Fig α , a germ cell – specific transcription factor required for ovarian follicle development. *Development*. 127 (21). 4645 – 4655.

Šmelcová, M., Tichovská, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 42 (4). 188 – 198.

Takesue, K., Tabate, S., Sato, F., Hattori, M. A. 2003. Expression of nitric oxide synthase – 3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *The Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 135 – 140.

Talbot, P., Shur, B. D., Myles, D. G. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm – *zona pellucida* interactions and sperm – egg fusion. *Biology of reproduction*. 68 (1). 1 – 9.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 61 (2). 748 – 755.

Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase: characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (23). 6388 – 6394.

Tenhunen, R., Ross, M. E., Marver, H. S., Schmid, R. 1970. Reduced nicotinamide – adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry*. 9 (2). 298 – 303.

Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytotstatic factor (CSF) – mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development*. 17 (6). 683 – 710.

Untereiner, A. A., Wu, L., Wang, R. 2012. The role of carbon monoxide as a gasotransmitter in cardiovascular and metabolic regulation. In: Hermann, A., Sitdikova, G. F., Weiger, T. M. (eds.). *Gasotransmitters: physiology and pathophysiology*. Springer. Heidelberg. p. 37 – 70. ISBN: 978 – 3 – 642 – 30337 – 1.

Ushiyama, M., Morita, T., Kuramochi, T., Yagi, S., Katayama, S. 2004. Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. *Hypertension Research*. 27 (4). 253 – 261.

Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., Conti, M. 2008. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 316 (1). 124 – 134.

Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone – dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595 – 604.

- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.
- Von Burg, R. 1999. Carbon monoxide. *Journal of Applied Toxicology*. 19 (5). 379 – 389.
- Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology*. 58. 53 – 110.
- Wagner, C. T., Durante, W., Christodoulides, N., Hellums, J. D., Schafer, A. I. 1997. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 100 (3). 589 – 596.
- Wang, R., Wang, Z., Wu, L., Hanna, S. T., Peterson – Wakeman, R. 2001. Reduced vasorelaxant effect of carbon monoxide in diabetes and the underlying mechanisms. *Diabetes*. 50 (1). 166 – 174.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB Journal*. 16 (13). 1792 – 1798.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. Raven Press. New York. p. 79 – 122. ISBN: 978 – 0781700863.
- Wright, C., Becker, D. L., Lin, J. S., Warner, A. E. K. H. 2001. Stage – specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin – specific roles in follicular regulation. *Reproduction*. 12 (1). 77 – 88.
- Wu, L., Wang, R. 2005. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*. 57 (4). 585 – 630.
- Wylie, C. C. 1993. The biology of primordial germ cells. *European Urology*. 23 (1). 62 – 66.

Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J., Matzuk, M. M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*. 15 (6). 854 – 866.

Yen, H. W., Ford, J. J., Zimmerman, D. R., Johnson, R. K. 2005. Follicular development and maturation in gilts selected for an index of high ovulation rate and high prenatal survival. *Journal of Animal Science*. 83 (1). 130 – 135.

Yoshiki, N., Kubota, T., Aso, T. 2000. Expression and localization of heme oxygenase in human placental villi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276 (3). 1136 – 1142.

Zenclussen, A. C., Sollwedel, A., Bertoja, A. Z., Gerlof, K., Zenclussen, M. L., Woiciechowsky, C., Volk, H. D. 2005. Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. *International Immunopharmacology*. 5 (1). 41 – 51.

Zenclussen, M. L., Jensen, F., Rebelo, S., El – Mousleh, T., Casalis, P. A., Zenclussen, A. C. 2011a. Heme oxygenase – 1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology*. 67 (5). 376 – 382.

Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., El – Mousleh, T., Rebelo, S., Langwisch, S., Linzke, N., Volk, H. D., Fest, S., Soares, M. P., Zenclussen, A. C. 2011b. Haem oxygenase – 1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The Journal of Pathology*. 225 (2). 193 – 304.

Zhang, Y., Zhang, Z., Xu, X. Y., Li, X. S., Yu, M., Yu, A. M., Zong, Z. H., Yu, B. Z. 2008. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Developmental Dynamics*. 237 (12). 3777 – 3786.

Zhang M., Su Y. Q., Sugaira K., Xia G., Eppig J. J. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*. 330 (6002). 366 – 369.

Zhao, H., Wong, R. J., Kalish, F. S., Nayak, N. R., Stevenson, D. K. 2009. Effect of heme oxygenase – 1 deficiency on placental development. *Placenta*. 30 (10). 861 – 868.

Zhao, H., Azuma, J., Kalish, F., Wong, R. J., Stevenson, D. K. 2011. Maternal heme oxygenase 1 regulates placental vasculature development via angiogenic factors in mice. *Biology of Reproduction*. 85 (5). 1005 – 10012.

Zhou, J., Kumar, T. H., Matzuk, M. M., Bondy, C. 1997. Insulin – like growth factor 1 regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Molecular Endocrinology*. 11 (13). 1924 – 1933.

Zhou, Z., Song, R., Fattman, C. L., Greenhill, S., Alber, S., Oury, T. D., Choi, A. M., Morse, D. 2005. Carbon monoxide suppresses bleomycin – induced lung fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 166 (1). 27 – 37.

Zhou, Q., Li, Y., Nie, R., Friel, P., Mitchell, D., Evanoff, R. M., Pouchnik, D., Banasik, B., McCarrey, J. R., Small, C., Griswold, M. D. 2008. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 78 (3). 537 – 545.

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