

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Úloha oxidu uhelnatého během stárnutí oocytu prasete

Diplomová práce

Autor práce: Nikola Strachová

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Úloha oxidu uhelnatého během stárnutí oocytu prasete“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a veškeré použité prameny a informace řádně cituji v seznamu použité literatury.

V Praze dne 13. dubna 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za cenné připomínky, za vstřícné a trpělivé vedení při zpracování této diplomové práce.

Velké díky patří i mé rodině, kteří mě podporovali během celého studia a věřili, že tato práce brzy vznikne.

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které je oxid uhelnatý zapojen do regulace procesu stárnutí oocyty prasete.

Pro ověření hypotézy byla sledována exprese dvou izoforem hemoxygenázy v oocyty prasete metodou Western blot a dále pak změny v buněčné lokalizaci izoforem hemoxygenázy během stárnutí prasečích oocytů pomocí imunohistochemické analýzy. U stárnoucích oocytů byl rovněž sledován účinek donorů oxidu uhelnatého a inhibitorů enzymů produkujících oxid uhelnatý.

Western blot prokázal v oocytech prasete přítomnost dvou izoforem enzymu produkujícího oxid uhelnatý, hemoxygenázy 1 (HO-1) a hemoxygenázy-2 (HO-2).

Imunohistochemická analýza potvrdila, že během procesu stárnutí oocyty prasete dochází ke změnám v buněčné lokalizaci hemoxygenázy, enzym HO-1 se přemísťuje z jaderné oblasti do cytoplazmy. Enzym HO-2 byl během stárnutí lokalizován pouze v cytoplazmě a k jeho relokizaci nedošlo. Provedené experimenty ukázaly, že oxid uhelnatý ovlivňuje životaschopnost stárnoucích oocytů prasete. Inhibice hemoxygenáz pomocí inhibitoru Zn-PP IX způsobila zvýšení poměru apoptotických oocytů. Pokud byly oocyty během procesu stárnutí vystaveny oxidu uhelnatému uvolňujícího se z donoru oxidu uhelnatého, CORM-2, došlo ke snížení procenta apoptotických oocytů, což prokázalo antiapoptotický vliv oxidu uhelnatého na stárnoucí oocyty.

Klíčová slova: prase, oocyt, stárnutí, apoptóza, hemoxygenáza, oxid uhelnatý

Summary

The aim of the master's thesis was to verify the hypothesis according to carbon monoxide is involved in the regulation of porcine oocyte aging process.

To verify this hypothesis, expression of two heme oxygenase isoforms was monitored in porcine oocyte using the Western blot method, and also the changes in cell localization of both heme oxygenase isoforms were observed during the aging process of porcine oocytes using the immunohistochemical analysis. Also, the effect of carbon monoxide donors and inhibitors of carbon monoxide producing enzymes was observed in aging porcine oocytes.

Western blot method showed a presence of both isoforms of carbon monoxide producing enzymes in porcine oocytes: heme oxygenase 1 (HO-1) and heme oxygenase 2 (HO-2).

Immunohistochemical analysis confirmed changes in heme oxygenase cell localization and relocalization of the HO-1 enzyme from nuclear area to cytoplasm during the porcine oocyte aging process. In the course of porcine oocyte aging process, the HO-2 enzyme was found exclusively in cytoplasm and its relocalization was not observed. This thesis confirmed the carbon monoxide's ability to affect the viability of aging of porcine oocytes. Heme oxygenase inhibition per the Zn-PP IX inhibitor increased the ratio of apoptotic oocytes. As long as the oocytes were exposed to carbon monoxide released from the CORM-2 carbon monoxide donor during their aging process, the ratio of apoptotic oocytes decreased, which proved the anti-apoptotic effect of carbon monoxide on porcine oocytes aging.

Key words: pig, oocyte, aging, apoptosis, heme oxygenase, carbon monoxide

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární rešerše.....	2
2.1. Oogeneze.....	2
2.1.1. Fáze množení.....	2
2.1.2. Fáze růstu a folikulární vývoj.....	6
2.1.3. Meiotická kompetence.....	10
2.1.4. Fáze zrání.....	11
2.1.5. Stárnutí oocyty.....	15
2.1.6. Faktory účastnící se oogeneze.....	16
2.2. Oxid uhelnatý (CO).....	25
2.2.1. Obecné vlastnosti a toxicita CO.....	25
2.2.2. Syntéza CO v živých organismech.....	26
2.2.3. Izoformy biosyntetických enzymů CO.....	26
2.2.4. Význam CO.....	27
3. Hypotéza a cíl práce.....	30
4. Materiál a metody.....	31
4.1. Získání a kultivace oocytů.....	31
4.2. Vyhodnocení stárnutí oocytů.....	31
4.3. Imunohistochemická detekce HO.....	31
4.4. Western blot.....	32
4.5. Kultivace stárnoucích oocytů s donorem CO a inhibítorem HO.....	32
4.6. Statistická analýza.....	33
5. Výsledky.....	34
5.1. HO izoformy jsou přítomny v prasečích oocytech během stárnutí <i>in vitro</i>	34
5.2. Inhibice HO zvyšuje stupeň apoptózy v prasečích oocytech během stárnutí <i>in vitro</i> ...36	
5.3. Donor CO potlačuje apoptózu v prasečích oocytech během stárnutí <i>in vitro</i>	37
6. Diskuze.....	39
7. Závěr.....	41
8. Seznam použité literatury.....	42

1. Úvod

Zrání oocytů je komplexní proces, kdy poovulační oocyt v MII fázi získá schopnost být oplozen a poté zahájit embryonální vývoj. Po ovulaci je vajíčko schopné oplození jen po určité době. Pokud k oplození nedojde, vajíčko podléhá procesům stárnutí, na jehož konci ho čeká buněčná smrt. V biotechnologiích je však kvalitních dozrálých oocytů nedostatek. Je jich třeba jak pro studium intraoocytárních mechanismů, tak pro využití v IVF centrech. Proces stárnutí závisí na mnoha mechanismech, které jsou pomalu odkrývány. Lze se tedy zaměřit na způsoby, jak prodloužit jejich životaschopnost. V poslední době se uvažuje nad tím, zda by jedním z těchto způsobů nemohl být vliv oxidu uhelnatého. Cílem této práce bylo zjistit, zda je oxid uhelnatý zapojen do regulace procesu stárnutí v prasečích oocytech.

2. Literární rešerše

2.1. Oogeneze

Oogeneze je proces, kdy vznikají samičí pohlavní buňky, oocyty (Reece, 2011). Každý oocyt podstupuje dvě fáze meiotického dělení, aby z něj vystoupil jako zralé vajíčko s haploidním počtem chromozomů a byl ve stádiu metafáze II ovulován do vejcovodu, kde by mohlo dojít k oplození (Jones et al., 2013). Oogeneze se rozděluje do tří fází: fáze množení, růstu a zrání.

Gamety vznikají z prvopohlavních buněk (primordial germ cells – PGC), které se mitoticky dělí. Vzniklé oocyty vstupují do 1. meiotického bloku, kde zůstávají měsíce až roky, což je druhově specifické. V té době oocyty dorůstají do své úplné velikosti. Fáze zrání trvá od znovu zahájení meiosis v době ovulace do metafáze II (Miyano, 2005). Oocyt zastavený v metafázi II s vyděleným 1. pólovým tělískem můžeme definovat jako zralý (Sun and Nagai, 2003).

2.1.1. Fáze množení

PGC se objevují v epiblastu blízko ústí allantoidu a posouvají se ke stěně žloutkového váčku. Z endodermy stěny žloutkového váčku embrya migrují k vyvíjejícím se gonádám. Během této cesty začínají PGC rozsáhlé nukleární přeprogramování (aktivaci genů pro pluripotenci a epigenetické změny genomu prostřednictvím DNA demethylace), aby získaly totipotenci a obnovily genomický imprinting. Po docestování do gonád (gonadálních lišt), jsou tyto procesy dokončeny (Sadler, 1963; De Felici, 2013). Pozorování Bielanske-Osuchowske (2006) ukázalo, že u prasečích embryí ve věku 24 dní jsou ovaria plodu v podobě gonadálních lišt, které kolonizují PGC a vyskytují se mezi mezenchymatickými buňkami. PGC mohou během migrace do gonadálních lišt reagovat na různé atraktanty (De Felici, 2013).

Gonády jsou v prasečím embryu poprvé pozorované 24-26 dní po páření, i když PGC jsou zaznamenány již 18 dní po páření v oblasti zárodečného hřbetu (Black and Erickson, 1968). Morfologická diferenciaci ovarii pokračuje asi do 40. dne, jakmile prvopohlavní buňky docestují do základu ovaria, diferencují se v oogonie a prochází řadou mitotických dělení. Některé zastaví své buněčné dělení v profázi meiosis I a mění se na primární oocyty (Sadler, 1963). První změny na ovarialních folikulech (primordiální folikuly) byly pozorovány v nejhlubší části kůry 56. den

vývoje plodu. Ve stáří 106, 112 a 113 dnů jsou již oocyty kompletně obklopeny vrstvou plochých granulózních buněk a dávají tak vzniku primordiálním folikulům (Bielanska-Osuchowska, 2006).

Jak již bylo uvedeno výše, některé PGC po dosažení gonád vstupují do meiosis I nezávisle na pohlaví, mnoho jich však podléhá řízené buněčné smrti, apoptóze (Pesce et al., 1993).

V oogoniích se blízko jádra nachází krátké profily endoplazmatického retikula (ER), volné polyribosomy a mitochondrie. Volné polyribosomy byly nalezeny ve všech stádiích oogeneze. Oogonie jsou od stáří 39 dnů propojeny mezibuněčnými spoji. Tyto spoje jsou charakterizovány jako válcovité kanály obklopené silnou membránou, která propojuje membrány oogonií (Bielanska-Osuchowska, 2006).

V cytoplazmě oocytů primordiálních folikulů se nachází úzké cisterny ER v okolí jádra, sporadicky pokryty ribosomy. Mitochondrie již mají typickou konformaci a jsou v kontaktu s ER jako u zralých prasečích oocytů. Desmozomy a mezerové spoje propojují folikulární buňky s oocytem. Oocyty starších primordiálních folikulů jsou 20x větší než oocyty oogonií. Tento nárůst objemu cytoplazmy je vyvolán zvýšením celkového objemu organel, například mitochondrií a ER, a inkluzí jako jsou lipidové kapénky a kompartmenty (Bielanska-Osuchowska, 2006).

V cytoplazmě oogonií se snižuje množství lipidových inkluzí a glykogenových granulí, zatímco roste počet mitochondrií (Motta and Makabe, 1986). Bylo zjištěno, že během migrace PGC obsahují méně než 10 mitochondrií, zatímco 100 mitochondrií je v PGC, které dosáhly gonád a 200 v oogoniích (Motta et al., 2000). De Felici (2013) předpokládá, že PGC během migrace převážně využívají anaerobní metabolismus, zatímco po dosažení gonadálních lišt přechází na energetický metabolismus.

Primordiální folikuly jsou kulovité útvary uložené v kůře vaječníku o velikosti 30-50 μm . Každý z nich se skládá z nezralého oocytu I. řádu a několika plochých granulózních buněk, které bývají označovány jako buňky pregranulózní (Adhikari and Liu, 2013). Tyto folikuly se zakládají již v embryonálním období, přičemž první jsou pozorovány 68. den po páření (Oxender et al., 1979), ale mohou vznikat i během života samice (Johnson et al., 2004).

Oogeneze probíhá asynchronně. To znamená, že se na ovarích plodu vyskytují společně mitoticky se dělící oogonie, oocyty v meiose i primordiální folikuly (Bielanska-Osuchowska, 2006). Přes 90 % folikulů na vaječníku bylo přisuzováno primordiálním folikulům a

předpokládalo se, že slouží jako zdroj vyvíjejících se folikulů a oocytů až do konce ženského reprodukčního období (Eppig, 2001), přičemž výzkum Johnsona et al. (2004) potvrdil, že tyto buňky mohou vznikat i postnatálně. Během této klidové fáze se velikost folikulů s věkem samice nemění (Adikari and Liu, 2013). Malá populace oocytů v primordiálních folikulech pak prochází dalším vývojem přes primární, sekundární a antrální folikuly (Miyano, 2003). Množství primordiálních folikulů, které zahájí svůj vývoj a množství vajíček, které jsou nakonec ovulovány, zcela závisí na druhu zvířete (Vanderhyden, 2002). Každý primordiální folikul má tři možné cesty: zůstat v klidovém stádiu, nebo se dál vyvíjet a ovulovat, nebo podlehnout atrezii (Greenwald, 1972; Hunter, 2000). Folikulární atrezie může nastat v jakémkoliv stádiu vývoje. Je vzácná v raném preantrálním stádiu, ale je častá v pozdním preantrálním a antrálním stádiu vývoje (Peters, 1976).

Celkový počet ovulovaných vajíček během reprodukčního období je mnohem menší, než počet původních primordiálních folikulů (Hirao et al., 1994). Redukce primordiálních folikulů je závislá na stupni vývoje folikulu, ale také na folikulárním prostředí každé buňky.

Oocyty v profázi prvního meiotického dělení byly na ovaríích nalezeny od 47. dne vývoje plodu (Bielanska-Osuchowska, 2006). Podle pozorování Blacka and Ericksona (1968) meióza začíná již 40. den a asi 35 dní po narození se všechny oogonie nachází v profázi I (stádiu zárodečného váčku). Podle Huntera (2000) jsou oogonie v profázi I zhruba 35 dní po narození a mají v průměru 30 μm .

Všechny primární oocyty dosáhnou před porodem profáze meiosis I, poté vstupují do klidového období, tzv. *diplotene* fáze, kterou charakterizuje síťové uspořádání chromatinu (Sadler, 1963). Toto stádium nastává po párování chromozomů a po crossing-overu mezi parentálními chromozomy (Verlhac and Terret, 2016). Nástup klidové fáze prvního meiotického bloku je doprovázen změnami v cytoplazmě oocytu. Zároveň v tomto období mnoho prasečích oocytů degeneruje. První známkou degenerace folikulu je zvýšení počtu vakuol v cytoplazmě oocytu (Bielanska-Osuchowska, 2006). Je také zdokumentováno, že primordiální folikuly s poškozenou DNA snadno podléhají apoptóze. Čím déle oocyty setrvávají v meiotickém bloku, tím je vyšší pravděpodobnost k akumulaci poškozené DNA (Collins and Jones, 2016). Kromě degradace DNA apoptózu charakterizuje také vysoká hladina tkáňové transglutaminázy (tTGázy), (Pesce et al., 1993). Redukci zárodečných buněk způsobují i pro-apoptické faktory, jakým je například Bax. Bax je gen, který způsobuje zánik zárodečných buněk během migrace a v pozdních fázích diferenciaci (Stallock et al., 2003).

V profázi I zůstávají oocyty měsíce, roky i desetiletí, závisle na živočišném druhu a až v období těsně před ovulací dokončují své první meiotické dělení (Miyano, 2005; Hirshfield, 1991). Podle Sadlera (1963) toto zablokování způsobuje „inhibitor zrání oocyty“ (OMI), což je nízkomolekulární peptid produkovaný folikulárními buňkami.

Zdá se, že Anti-Müllerový hormon (AMH) funguje také jako inhibitor a reguluje dynamiku vzniku primárních folikulů (Durlinger et al., 1999). Kromě toho může regulovat růst malých antrálních folikulů tak, že snižuje jejich citlivost na FSH (Durlinger et al., 2002). Za přítomnosti AMH však zůstalo o 40-50 % více folikulů v klidovém stadiu i na lidských vaječnicích (Carlsson et al., 2006).

Transkripční faktor Foxo3a udržuje primordiální folikuly v klidovém stadiu. Bylo zjištěno, že se u myší za jeho nepřítomnosti vyčerpá rezerva primordiálních folikulů během 2 týdnů po narození (Castrillon et al., 2003). Tato intracelulární signální molekula je exprimována hlavně v jádře oocytů primordiálních folikulů a raných stádiích primárních folikulů, ale jeho exprese dramaticky klesá v pozdějších vývojových stádiích (Liu et al., 2007).

Figla (také známý jako Fig- α) je gen pro transkripční faktor, který řídí expresi strukturních genů pro komponenty zony pellucidy. Exprese tohoto genu začíná již 13. den embryonálního vývoje u myší. Zdá se, že tento gen reguluje v oocytech dvě důležité dráhy. Jedna z drah reguluje produkci proteinů zony pellucidy a druhá řídí produkci jednoho nebo více oocytárních faktorů nezbytných pro počáteční uspořádání primordiálních folikulů (Eppig, 2001). V preantrálním stadiu zony pellucidy jsou známy proteiny 1, 2 a 3 (Heikinheimo and Gibbons, 1998).

V roce 2004 padlo základní dogma reprodukční biologie, které říkalo, že během fetálního období vznikne obrovské množství vajíček a z této konečné zásobárny už se během života jen ubírá. Výzkum Johnsona et al. (2004) však potvrdil existenci proliferujících zárodečných buněk, které udržují produkci oocytů na vaječniku i v postnatálním období života. Později dokonce dokázal identifikovat kostní dřev jako zdroj buněk, které dokáží produkovat oocyty u dospělých (Johnson et al., 2005b). To je v souladu s nezávislým výzkumem, který tvrdí, že u myších i bovinních embryí byly pozorované PGC vstupující nebo cirkulující v krevním řečišti. Vzhledem k jejich vlastní pluripotenci se mohou za určitých okolností účastnit normální diferenciací tkání, nebo vstoupit do klidového stadia, aby později vyvolaly nádory (Wartenberg, 1983). Předpokládaná zásobárna kmenových buněk, která podporuje postnatálně oogenezi, se nachází v

kostní dřeni, odtud se PGC uvolňují do krevního oběhu a putují do vaječníku, kde dávají vzniknout funkčním oocytům (Johnson et al., 2005a).

2.1.2. Fáze růstu a folikulární vývoj

V době růstové fáze oocyty zvětšují svůj objem. U skotu a prasnic rostou z 30 μm na 120 μm . Délka období růstu folikulu je u myši kolem tří týdnů a u skotu kolem 6 měsíců od primordiálního do preovulačního folikulu. Prvním znakem, že oocyt vstoupil do růstové fáze, je morfologická změna vrstvy granulózních buněk, které se mění na kubické. V tomto bodě jsou folikuly nazývané jako primární. Tyto primární folikuly aktivně prolifерují granulózní buňky (Miyano, 2005). Jedním z faktorů, které hrají důležitou roli při diferenciaci pregranulózních buněk na buňky granulózní, je transkripční faktor Foxl2. Za jeho nepřítomnosti tak nedochází k vzniku sekundárního folikulu (Oktem and Urman, 2010).

Granulózní buňky přisedají na bazální membránu a tvoří *theca folliculi*. Oocyt spolu s granulózními buňkami produkují na povrch oocytu glykoproteinovou vrstvu a tvoří tak vrstvu *zona pellucida*. Během folikulárního růstu se buňky *theca folliculi* organizují do vnitřní vrstvy sekrečních buněk – *theca folliculi interna* a do vnějšího vazivového obalu – *theca folliculi externa*. Poté folikulární buňky zanořují své výběžky přes vrstvu *zona pellucida* do plazmatické membrány oocytu a zajišťují tak transport látek (Sadler, 1963). Thékální buňky jsou hlavním zdrojem syntézy androgenu a poskytují tak steroidogenní prekurzory pro syntézu estrogenu v granulózních buňkách (Oktem and Urman, 2010).

V případě, že je rostoucí oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulózních buněk, vzniká sekundární folikul (Eppig, 2001), přičemž rychlost folikulárního růstu se přímo vztahuje k počtu granulózních buněk, protože zvětšují plochu oocytu (Herlands and Schultz, 1984). Později vzniká antrum již terciálního folikulu, což je dutinka naplněná tekutinou (Miyano, 2005). Zpočátku je antrum srpkovité a rozšiřuje se. Buňky obklopující oocyt však zůstávají nedotčené a vytváří *cumulus oophorus* (Sadler, 1963). Vznik antrálního folikulu je dále doprovázen další proliferací granulózních a thékálních buněk a zvýšenou vaskularizací (Oktem and Urman, 2010).

Antrum je u prasat plně diferencované ve folikulech o průměru 0,4 – 0,8 mm (Motlik et al., 1984). Prasečí rané antrální folikuly (0,5 – 1 mm) obsahují oocyty přibližně o průměru 100 μm s limitující kompetencí pro obnovu meiosis (Miyano, 2003). Pokud jsou oocyty o průměru 100 μm nemůže dojít ke kompletnímu rozpadu zárodečného váčku, ale oocyty o průměru 115 μm v

1,8 mm folikulech jsou plně dorostlé a vypadá to, že jsou schopné dokončit meiotické zrání (Motlik et al., 1984). První antrální folikuly jsou pozorovány cca 70 dní po narození (Oxender et al., 1979). Během růstového období antrálního folikulu je zvětšování průměru oocyty relativně malé, naproti tomu je však významné zvětšení jeho objemu nebo hmotnosti (Eppig, 2001). Oocyty skotu a prasete se rozvíjí až do pozdního antrálního folikulárního stádia (Miyano, 2005). Zároveň platí, že folikuly podobné velikosti vykazují rozdíly v koncentraci steroidů folikulární tekutiny, počtu granulózních buněk a LH receptorů (Hunter, 2000).

Během růstové fáze, kdy se formuje antrum v prasečích folikulech o průměru 0,5 mm, oocyty intenzivně syntetizují RNA (Motlik et al., 1984). Oocyty akumulují specifické proteiny a požadovanou RNA (hnRNA, mRNA, rRNA) pro obnovení meiosis a následné zrání (Miyano, 2005; Tesfaye et al., 2018; Fulka et al., 1998; Motlik et al., 1984).

Granulózní buňky udržují kontakt s oocytem přes specializované mezerové spoje. Tyto mezerové spoje účinně přemísťují malé molekuly jako energetické substráty, nukleotidy a aminokyseliny do oocyty (Miyano, 2003). Kompartmenty somatických buněk kromě přemísťování nukleosidů, aminokyselin a fosfolipidů, udržují iontovou rovnováhu a stabilitu mRNA v rostoucím oocyty (Herlands and Schultz, 1984; Hunter, 2000). Významné jsou spoje popisované jako „transzonální projekce“ (TZP), což jsou mikrotubuly zajišťující výměnu signálních molekul mezi oocyty a granulózními buňkami přes stěnu *zona pellucida*. Bylo zjištěno, že tyto struktury vznikají a udržují se pod vlivem FSH s receptory na granulózních buňkách během folikulárního vývoje (Albertini et al., 2001; Combelles et al., 2004), z toho vyplývá, že jsou to velice dynamické struktury (Guglielmo and Albertini, 2013).

Albertini et al. (2001) popisuje způsoby komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami přes vrstvu *zona pellucida*: 1.) Příjem oocytárních faktorů jako je GDF-9 pomocí endocytózy přes mikrotubuly TZP do granulózní buňky. 2.) Kontaktní místa mezi granulózní vrstvou a vrstvou *zona pellucida* mohou hrát signální roli pro oocyty a granulózní buňky. Změny adheze mohou způsobit změny kompozice vrstvy *zona pellucida*. 3.) Mezerové spoje umožňují přímou komunikaci mezi oocytem a granulózní buňkou.

Zatímco oocyt byl dříve považován pouze za pasivního příjemce signálů z granulózních buněk spojených s oocyty, je nyní zřejmé, že komunikace mezi oocyty a granulózními buňkami je obousměrná. Komplexní souhra růstových faktorů upravuje vývoj obou typů buněk. Zabezpečuje jak vývoj oocyty a folikulu, tak folikulární diferenciaci a produkci kompetentních

oocytů schopných fertilizace a embryogeneze. Přesto je ale oocyt pravděpodobně dominantním faktorem, který určuje směr diferenciaci a funkce granulóznic buněk (Eppig, 2001).

U savců je folikulární vývoj a proces atrezie regulován gonadotropiny a intraovariálními regulátory, které spolupracují, aby řídily aktivaci primordiálních folikulů, proliferaci, selekci folikulů a buněčnou diferenciaci (Guglielmo and Albertini, 2013).

Expresí ligandu c-kit (stem cell factor) produkovaného granulózními buňkami primordiálních folikulů u myši a ovcí vede oocyty s c-kit receptory do růstové fáze a podporuje vznik primárních folikulů (Miyano, 2003; Vanderhyden, 2002; Eppig, 2001). Receptory kit ligandu se nachází na oocytech a thékálních buňkách (Nilsson and Skinner, 2004). Studie Packer et al. (1994) ukázala, že receptor c-kit i jeho ligand jsou potřební pro udržení růstu oocytů *in vitro*.

Existuje celá řada růstových faktorů, které mohou zlepšit aktivaci růstu primordiálních folikulů: bFGF (basic fibroblast growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), GDNF (glial-derived neurotrophic factor), LIF (leukemia inhibitory factor), BMP-7, BMP-4 (bone morphogenic protein) a GDF-9 (Adhikari and Liu, 2013).

Miyano (2003) uvádí, že růstové faktory GDF-9 a BMP-15, které jsou sekretovány oocyty TGF β rodiny, podporují proliferaci (Otsuka et al., 2000) a diferenciaci granulóznic buněk (Otsuka et al., 2001). Expresí těchto oocytárních faktorů začíná již v primordiálních nebo primárních folikulech na ováriích myši, ovcí a krav.

Konkrétně BMP-15 stimuluje mitózu granulóznic buněk ve folikulech, ještě nezávislých na FSH v době časného folikulárního růstu (Oktem and Urman, 2010). Podle Otsuka et al. (2000) může BMP-15 inhibovat expresi FSH receptorů.

Proteiny typu GDF-9, jsou produkovány oocyty během velmi raných stadií folikulogeneze, podporují růst folikulů a diferenciaci (Li et al., 2000), stejně jako FSH (Hayashi et al., 1999). Bylo zjištěno, že se jeho receptory nachází na granulózních buňkách a proto hraje multifunkční roli v komunikaci mezi oocytem a okolními buňkami (Elvin et al., 1999). Tento protein je u potkanů, myši a člověka vysoce konzervativní (> 92 %) z hlediska sekvence aminokyselin (Hayashi et al., 1999). Výzkum Albertini et al. (1996) a Elvin et al. (1999) ukázal, že zvířatům s absencí GDF-9 se zastavil vývoj folikulů v primárním stadiu s jednou vrstvou granulóznic buněk. Knockout tohoto genu vede třeba i k defektům meiotické kompetence. Expresí proteinu GDF-9 byla nalezena v primárním, sekundárním i antrálním stadiu, už ale ne v primordiálním

folikulu. Zároveň je jeho exprese značně heterogenní u větších preantrálních folikulů, ne-li nižší (Hayashi et al., 1999).

V časných stádiích primordiálních folikulů se neexprimují receptory pro FSH. Expese receptorů FSH se spouští až po vstupu do růstové fáze, kdy se mění morfologie granulózních buněk (Oktay et al., 1997). Vzrůst FSH udržuje růst granulózních buněk v časném antrálním folikulu, který stimuluje produkci estrogenu (Peters, 1976). FSH také stimuluje expresi LH receptorů na granulózních buňkách (Mehlmann, 2013). Výzkum Eppiga (2001) ukázal, že přestože vývoj primárního a sekundárního folikulu probíhá za absence gonadotropinů, *in vitro* tyto folikuly na gonadotropiny reagují. Vývoj po raném antrálním folikulu je však na gonadotropinech zcela závislý. Studie Nilssona and Skinnera (2001) ukázala, že FSH a hCG přímo stimuluje expresi ligandu c-kit v granulózních buňkách, tím způsobem podporují folikulární růst *in vivo*. Výzkum Wu et al. (2001) zjistil, že preantrální folikuly s optimální koncentrací FSH efektivně rostou *in vitro*, to naznačuje nezbytnost FSH v tomto období vývoje. Receptory pro FSH jsou exprimovány na granulózních buňkách preantrálních a antrálních folikulů a v thékální vrstvě. FSH v těchto buňkách údajně stimuluje expresi růstových faktorů a aktivuje proliferaci granulózních buněk.

Správné formování folikulární dutiny je založeno na uspořádání dvou skupin buněk: kumulární buňky v kontaktu s oocytem a granulózní buňky u folikulární stěny (také nazývané jako periantrální), (Eppig, 2001). Kromě anatomických rozdílů jsou buňky odlišné i funkčně. Kumulární buňky (*cumulus oophorus*) hrají zásadní roli v normálním růstu a vývoji oocytu, zatímco buňky granulózní stěny mají primárně funkci endokrinní a podporují růst folikulu. Podle Elvin et al. (1999) syntetizují proteázy potřebné pro narušení folikulu při ovulaci. Po ovulaci tyto granulózní buňky diferencují na buňky luteální (Li et al., 2000). Eppig (2001) dále uvádí, že kumulární buňky například obsahují velmi málo LH receptorů. Na rozdíl od granulózních buněk, které tyto receptory mají a jejich nejvyšší exprese je pozorována v blízkosti bazální laminy. Peng et al. (1991) upřesňuje, že LH receptory nejsou exprimovány ani na kumulárních buňkách, ani na oocytu.

Konečným procesem diferenciací je luteinizace granulózních buněk na periférii folikulu, ke které dochází během preovulační periody (Eppig, 2001). Dochází k ní u potkanů, králíků i prasat. Luteinizaci způsobují folikulární buňky produkcí progesteronu. Během vlastního vývoje

však oocyt vylučuje do folikulární tekutiny „luteostatický faktor“, který inhibuje luteinizaci a zabraňuje tak předčasnému ukončení diferenciaci (Nekola a Nalbandov, 1971). BMP-6, BMP-15 a GDF-9 působí uvnitř folikulu a inhibují předčasnou luteinizaci a omezují biosyntézu progesteronu indukovanou FSH (Otsuka et al., 2000), na základě mechanismu vytvoření vazby BMP-15 s folistatinem (Otsuka et al., 2001).

2.1.3. Meiotická kompetence

Meiotická kompetence je definována jako schopnost oocyty podstoupit a dokončit meiotické zrání do metafáze II. Tuto schopnost oocyt získává během fáze růstu (Kanatsu-Shinohara et al., 2000; Wickramasinghe et al., 1991).

Meiotická kompetence je způsobena hlavně hypertrofií a růstem oocytů na téměř úplnou velikost, která u hlodavců dosahuje v průměru 70 – 80 μm , zatímco u jiných druhů, jako je člověk, až 100 μm . Během preantrální růstové fáze, když ještě nejsou granulózní buňky citlivé na FSH, udržují spojení pomocí struktur TZP (Combelles et al., 2004).

Pokud je oocyt ještě příliš malý, zůstává ve stádiu GV a je zcela meioticky nekompetentní (Wickramasinghe et al., 1991). Během formování antra ještě oocyty nezískávají meiotickou kompetenci (Motlik et al., 1984). Oocyty, které podstoupí GVBD a dosáhnou metafáze I, jsou částečně meioticky kompetentní (Mitra and Schultz, 1996). Meiotické kompetence oocyt dosáhne v pozdější části růstu, když dojde do stádia metafáze II (Kanatsu-Shinohara et al., 2000; Mitra and Schultz, 1996; Wickramasinghe et al., 1991).

Žádný z oocytů pod 90 μm není schopen obnovit meiosu. Meiotické zrání bylo pozorováno u oocytů větších než 90 μm a stupeň GVBD se zvyšoval s rostoucí velikostí oocyty. Progrese do MII byla pozorována u 40 % oocytů o velikosti nad 110 μm a oocyty o průměru 115 μm kompletně dozrály (Hirao et al., 1994).

Částečně meioticky kompetentní oocyty ve folikulu o velikosti 1 – 1,5 mm, podstupují po uvolnění z folikulu rozpad zárodečného váčku (GVBD) a brzy na to většina z nich dokončí MI fázi. Poté oocyty prochází přes anafázi I a telofázi I až dosáhnou MII fáze s vyčleněným 1. pólovým tělískem. Takový oocyt je již meioticky plně kompetentní (Ellederova et al., 2004; Motlik et al., 1984). Podle Marchal et al. (2002) dosáhnou plné meiotické kompetence oocyty ve folikulech větších než 3 mm. Po dosažení meiotické kompetence se chromatin v oocytech zdá být kondenzovaný (Sun et al., 2004).

Rozdíly mezi rostoucím a plně dorostlým a kompetentním oocytem jsou způsobeny strukturálními a biochemickými změnami v jádře i cytoplazmě. Strukturální změny jsou popisovány jako množení a morfologická změna mitochondrií, ultrastrukturální modifikace Golgiho komplexu a akumulace ribosomů v cytoplazmě. Jádro se zvětšuje, retikulární konfigurace kondenzuje a tělo buňky tvoří výhradně fibrilární materiál (Fulka et al., 1998). Během růstu je chromatin v jádře oocyty dekonzenzovaný a mikrotubuly se nachází v interfázi. Meioticky kompetentní oocyty mají kondenzovaný chromatin a počet mikrotubulových organizačních center (MTOC) v perinukleární pozici se zvýšil na 1-5 (Albertini, 1992; Wickramasinghe and Albertini, 1993; Wickramasinghe et al., 1991).

2.1.4. Fáze zrání

Plně dorostlé folikuly reagují na gonadotropní vlnu a pokračují meiosou z profáze I (GV) do metafáze II, poté jsou ovulovány (Miyano, 2005; Tsafiriri et al., 1982) a obvykle zůstávají v tzv. druhém meiotickém bloku, dokud nedojde k oplození (Mehlmann, 2013). Prasečí oocyty dokončují první meiotické dělení asi 36-40 hodin po zvýšení hladiny gonadotropinů (Hunter, 2000). Pro zrání je charakteristický rozpad zárodečného váčku (GVBD) a přetváření mikrotubulové sítě, poté následuje vytlačení 1. pólového tělíska a oocyty zůstávají v metafázi druhého meiotického dělení. Jen oocyty, které projdou úplným zráním jsou schopné podstoupit oplození, vytvořit zygotu a projít dalším vývojem (Ellederova et al., 2004; Moor et al., 1998).

Zrání oocytů je proces, který zahrnuje morfologické, fyziologické a vývojové změny z profáze I do metafáze II meiotickým dělením, remodelací chromatinu a reorganizací cytoplazmatických organel (Eppig, 1996). Pro zahájení zrání je potřeba několika nezbytných procesů. Za prvé, oocyt musí mít dokončen růst a odděleny všechny požadované molekuly před indukcí zrání, protože transkripce je poté již potlačena. Za druhé, endokrinní a parakrinní signály musí být vytvořeny ve vhodnou dobu a v dostatečných koncentracích, aby mohly být zahájeny všechny intracelulární změny jaderného i cytoplazmatického zrání. Do třetice musí být zajištěna přítomnost vhodných receptorů a intercelulární přenos (Moor et al., 1998).

Oocyty dokončující fázi růstu jsou schopné podstoupit dvě formy zrání – cytoplazmatické a jaderné. Obě dvě jsou nezbytné pro vývoj vajíčka, aby bylo schopné oplození a následný vývoj

živého potomstva (Eppig, 1996). Přestože jsou obě dvě formy na sobě nezávislé, vývojová kompetence je dokončena jen tehdy, pokud jsou oba dva procesy úzce integrované (Moor et al., 1998).

Cytoplazmatické zrání se vztahuje k procesům, které připravují vajíčko na aktivaci a předimplantaci (Eppig, 1996). Zahrnuje syntézu proteinů, přemístění cytoplazmatických organel a změny na membráně ovlivňující transport v oocytu (Moor et al., 1998).

Jaderné dozrávání zahrnuje procesy, které zvrátí zastavení oocytu v profázi I a řídí postup meiosis do metafáze II (Eppig, 1996) a je charakteristické rozpadem jaderného obalu nebo zárodečného váčku a vyvolává se signálním vzestupem LH v polovině cyklu (Heikinheimo and Gibbons, 1998). V oocytu podstupujícím rozpad zárodečného váčku (GVBD) jádro již není pozorováno a chromatin je kondenzován do shluků (Sun et al., 2004). Kromě toho dochází k separaci homologních chromozomů a vyčlenění prvního pólového tělíska (Schultz and Wassarman, 1977). Výsledkem jaderného zrání je redukce na haploidní soubor DNA (Ueno et al., 2005).

Poprvé byla pozorována změna chromatinu v zárodečném váčku (GV) Motlikem a Fulkou (1976), kteří popsali 4 konfigurace (GV1 – 4) založené na změnách chromatinu, zániku jádra a jaderné membrány. Sun et al. (2004) klasifikoval chromatin prasečích oocytů během zrání do pěti fází, když přidal konfiguraci GV0.

GV0 – jasně viditelné jádro s jadernou membránou, difuzní a fibrilární charakter chromatinu v celé jaderné oblasti. V této fázi byla nalezena většina oocytů, které se nacházely ve folikulech menších než 1,9 mm. Když ale folikuly dosáhly velikosti 2-6 mm, oocyty ve stádiu GV0 již kompletně zmizely.

GV1 – jaderná membrána s jádrem jsou neporušené, ale kondenzovaný chromatin se formuje kolem jádra do tvaru kruhu, nebo podkovy.

GV2 – má podobný vzor jako GV1 s tím rozdílem, že může být detekováno několik shluků chromatinu, zejména v blízkosti jaderné membrány.

GV3 – chromatin se dále kondenzuje do shluků nebo řetězců rozprostřených po celé nukleoplazmě.

GV4 – chromatin je stále kondenzovaný do shluků nebo řetězců, mizí membrána a jádro již kompletně zmizelo. Vzory chromatinu GV3 a GV4 měly významně vyšší zastoupení ve folikulech o velikosti 2-2,9 mm, než jiných kategorií (Sun et al., 2004).

Během GVBD se vytváří centrozomy, ty se skládají ze dvou centriol, které obklopuje pericentriolový materiál (PCM). Centrozomy jsou hlavními organizačními centry mikrotubulů (MTOCs). Slouží k segregaci chromozomů a přispívají k sestavení dělicího vřetenka (Manandhar et al., 2005; Verlhac and Terret, 2016). Vřetenko musí zajistit správnou segregaci homologních chromozomů a sesterských chromatid ve dvou následujících meiotických děleních (Verlhac and Breuer, 2013). Kvůli abnormálnímu vytvoření vřetenka tak nemusí oocyt dojít do MII fáze (Ogawa et al., 2012). Dělicí vřetenko je u oocytů *in vivo* delší, než u oocytů v podmínkách *in vitro* (Ueno et al., 2005). Mikrotubuly cytoskeletu podléhají během dělení dramatickým změnám a jsou to velmi dynamické struktury (Verlhac and Breuer, 2013).

V profázi prvního meiotického dělení dochází po replikaci DNA ke kondenzaci chromozomů, které se skládají z bivalentů. Vně jádra se mezi dvěma centrozomy tvoří meiotické vřetenko.

Mezistupeň prometafáze I zahrnuje rozpad jaderné membrány a chromozomy se mohou přes kinetochory napojit na mikrotubuly dělicího vřetenka, které vychází z MTOCs. Meiotické vřetenko působí na chromozomy různými silami v závislosti na tom, kde se od vřetenka nachází. Přenos těchto sil na kinetochory je však nezbytný pro efektivní segregaci chromozomů (Alberts et al., 1998; Shimamoto et al., 2011).

V metafázi I jsou chromozomy v podobě bivalentů seřazeny v ekvatoriální rovině mezi póly vřetenka.

Následuje anafáze I, kde jsou homologní chromozomy každého bivalentu od sebe odděleny a jsou taženy k opačným pólům vřetenka. Mikrotubuly navázané na kinetochory se zkracují a zároveň se centrozomy pohybují k okraji buňky, což přispívá k separaci chromozomů.

V průběhu telofáze I dceřinné chromozomy již doputovaly k pólům vřetenka a tvoří se kolem nich jaderná membrána. Poté dochází k vydělení 1. pólového tělíska.

Ve druhém meiotickém dělení již nedochází k replikaci DNA (Alberts et al., 1998). Po GVBD se MTOCs shromažďují v blízkosti kondenzovaných chromozomů (Verlhac and Breuer, 2013). Začne se sestavovat dělicí vřetenko, což podporuje aktivní RanGTP a spouští faktory (SAF) pro jeho tvorbu v blízkosti chromozomů (Kaláb et al., 2006). Formování vřetenka je v meiose II rychlejší, v porovnání s meiosou I (Verlhac and Breuer, 2013). Mikrotubuly se opět přes kinetochory naváží na chromozomy, uspořádají je do ekvatoriální roviny a oocyty zůstávají v metafázi II (Alberts et al., 1998). Po vzniku spermie do oocytu nebo vlivem partenogenetického

stimulu, oocyty znovu obnoví meiosu II a dokončí zrání s vydělením druhého pólóvého tělíska (Sun and Nagai, 2003).

Asymetrie meiotických dělení probíhajících v oocytu umožňuje zachování mateřské mRNA, proteinů a živin v cytoplazmě, které byly během růstové fáze nahromaděny (Verlhac and Breuer, 2013). Na rozdíl od myších oocytů, je v prasečích nutná aktivní transkripce a translace, aby proběhla kondenzace chromatinu a rozpad zárodečného váčku (Hunter, 2000). Během růstu a vývoje se oocyt zásobuje transkripty mRNA a proteiny, které jsou nezbytné pro dokončení meiosy, získání meiotické kompetence a raný vývoj embrya (Moor et al., 1998; Tesfaye et al., 2018). Transkripční aktivita se v oocytu během zrání rychle snižuje až úplně přestane, ale translace nahromaděné mRNA pokračuje (Heikinheimo and Gibbons, 1998). Proto se předpokládá, že pro plnou meiotickou a vývojovou kompetenci oocytu je potřebné určité množství proteinů. Především těch, které regulují průběh buněčného cyklu (Ellederova et al., 2004; Fan and Sun, 2004).

Zralé myší oocyty obsahují asi 200x více RNA a 50-60x více bílkovin než průměrná somatická buňka. Významný je také vyšší obsah mRNA v oocytu (15-20 %), na rozdíl od somatické buňky (2-3 %), (Heikinheimo and Gibbons, 1998). Hlavní změny v syntéze bílkovin probíhají po rozpadu zárodečného váčku (Schultz and Wassarman, 1977).

Gonadotropiny stimulují folikulární vývoj vyvolaný změnami metabolismu oocytů s nepoškozeným folikulem před normálním zahájením zrání LH vlnou. Pulsace LH se vyskytuje během 24 hodin preovulační periody a dosahuje vrcholu 6-8 hodin po začátku estru. Tato LH vlna zahajuje zrání oocytu, které je dokončeno 18-22 hodin poté (Moor et al., 1998). Výzkum Oussaid et al. (1997) prokázal, že pulsace LH během folikulární fáze nemá žádný vliv na počet ovulací zvířete, počet oocytů, které dokončily meiosu, ani na rychlost oplození. Nicméně její absence podstatně zhoršuje další folikulární vývoj.

Výzkum Sun et al. (2001) ukázal, že biologické faktory, jako jsou gonadotropiny, přítomnost kumulárních buněk a velikost folikulů, ovlivňují nukleární i cytoplazmatické zrání, stejně jako vývojový potenciál embrya. Gonadotropní LH vlna vede k eliminaci jedné nebo více inhibičních látek, například inhibitor dozrávání oocytů (OMI), což vede k aktivaci cyklinů, fosfatáz a kináz, které jsou nutné pro dosažení jaderného zrání (Hunter, 2000). Inhibiční efekt OMI závisí na počtu granulózních buněk a jeho aktivita se ve folikulární tekutině prasat s vývojem folikulu postupně snižuje (Tsafiriri et al., 1982).

Rozpad zárodečného vajíčka je vyvolán LH vlnou v polovině cyklu a *in vitro* je tento proces spojen se snížením intracelulárních koncentrací cAMP. Tento a další kroky meiosy jsou řízeny faktorem podporujícím M-fázi (MPF). Zdá se, že cAMP produkovaný granulózními buňkami do oocyty blokuje znovuoobnovení meiosy (Heikinheimo and Gibbons, 1998). Inhibiční efekt cAMP při meiotickém zrání *in vitro* potvrzuje Schultz and Wassarman (1977) i Tsafiriri et al. (1982).

Také bylo prokázáno, že schopnost oocyty podstoupit spontánní zrání *in vitro* ovlivňuje i přítomnost FSH a zdá se, že jeho účinek je zprostředkován syntézou estradiolu. Z toho vyplývá, že steroidy mohou hrát důležitou roli při navození meiosy a dosažení metafáze II (Tsafiriri et al., 1982).

Během zrání je důležitá komunikace folikulárních buněk s oocytem. Oba dva typy buněk jsou ve spojení prostřednictvím mezerových spojů, které umožňují přenos metabolitů a regulačních látek (Heikinheimo and Gibbons, 1998; Mehlmann, 2013). Folikulární buňky těmito spoji také ovlivňují membránový potenciál oocyty. Zdá se, že LH signál způsobuje depolarizaci membrány. V té jsou přítomny vápenaté kanály, které se v důsledku depolarizace aktivují a dochází ke zvýšení intracelulárního Ca, což mění funkci oocyty (Mattioli et al., 1990).

Proces zrání *in vivo* je ukončen uvolněním zralého oocyty v metafázi II z folikulu (Fulka et al., 1998).

2.1.5. Stárnutí oocyty

V případě, že nedojde k oplození oocyty v MII fázi, prochází tyto oocyty procesem degradace, který je označován jako postovulační stárnutí (Lord and Aitken, 2013). Dochází k uvolňování ligandu Fas (sFasL) z kumulárních buněk oocyty. Ten se naváže na receptor Fas na membráně oocyty a dochází ke stimulaci signálních drah, které vedou ke zvýšení hladiny Ca²⁺ prostřednictvím aktivace CaMKII a kaspázy-3, což usnadňuje stárnutí oocyty (Zhu et al., 2016). Kaspáza-3 zprostředkovává degradační proces a je součástí buněčné smrti (Zhang et al., 2003). Signální dráha indukovaná Fas aktivuje stárnutí oocyty (Zhu et al., 2015), s tím je spojena i vysoká hladina intracelulárního vápníku (Fissore et al., 2002). Zahájení apoptózy pomocí Fas je hlavní drahou v různých buňkách a tkáních během normálních biologických procesů stejně jako při patologických poruchách (Ju et al., 1995; Poulaki et al., 2001). Klinické důsledky stárnoucích oocyty zahrnují sníženou pravděpodobnost oplození, horší kvalitu oocyty i embryí, vyšší

pravděpodobnost rané embryonální mortality a výskyt abnormalit u potomků (Lord and Aitken, 2013).

2.1.6. Faktory účastníci se oogeneze

MPF (maturation/ M-phase promoting factor)

MPF je protein účastníci se regulace progresu buněčného cyklu při G₂/M přechodu při meiose i při mitose (Fan and Sun, 2004; Hunter, 2000; Murray and Kirschner, 1989). Je nazýván také jako metafázi podporující faktor (Trounson et al., 1998). MPF je serin – threoninová protein kináza, která je složena z regulační podjednotky – cyklin B, a z katalytické podjednotky cyklin dependentní kinázy – p34cdc2 (Hunter, 2000). Rostoucí prasečí oocyty v preantrálním folikulu začínají akumulovat p34cdc2 (Hirao et al., 2008). V nedávné době byla identifikována Greatwall kináza (GWL) jako podstatná složka MPF (Hara et al., 2012), která se podílí na meiotickém zrání prasečích oocytů (Li et al., 2013).

Cyklin B je periodicky syntetizován a zase degradován. Jeho syntéza je potřeba pro vznik komplexu MPF. Proto je nutný k řízení zvyšování MPF aktivity po GVBD (Wu et al., 1997). Zdá se, že cyklin B je jediný druh mRNA podílející se na přechodu G₂/M (Murray and Kirschner, 1989). Inaktivace MPF je doprovázena poklesem hladiny cyklinu B1. Bylo zjištěno, že suprese tohoto cyklinu blokuje zrání. Výsledky experimentu ukázaly, že CB1 se exprimuje hlavně v MII a syntéza alespoň jednoho z cyklinů B1, nebo B2 je nezbytná pro správné načasování GVBD (Kuroda et al., 2004). Při přechodu z metafáze do anafáze dochází k degradaci cyklinu, což vede k inaktivaci MPF. Na cykliny se napojují ubiquitiny a následně dojde k jeho proteolýze v proteazomu (Glotzer et al., 1991).

Aktivace MPF závisí na tyrosinové defosforylaci p34cdc2 a syntéze cyklinu B (Sun and Nagai, 2003). Po sestavení cyklin-B-p34cdc2 kinázového komplexu se vytvořená MPF udržuje v neaktivním stádiu fosforylací specifických aminokyselinových zbytků kinázy p34cdc2 (Gu et al., 1992). K této inaktivaci dochází v raných antrálních folikulech (0,5 - 0,7 mm) pravděpodobně Myt1 kinázou (Kanayama et al., 2002). Cdc25-fosfatáza řídí defosforylaci threoninových a tyrosinových zbytků, a tak aktivuje MPF (Gautier et al., 1991). Ve folikulech 1,0 - 1,5 mm jsou oocyty v metafázi I schopny aktivovat cdc2 kinázu, ale nemohou aktivovat MAP kinázu (MEK nebo MAPKK), která je součástí signální dráhy MAP kináz (Miyano, 2003). Ke konci růstové fáze získávají prasečí oocyty schopnost aktivovat cdc2 kinázu a poté i využít signální dráhu MAP kináz pro získání plné meiotické kompetence (Kanayama et al., 2002).

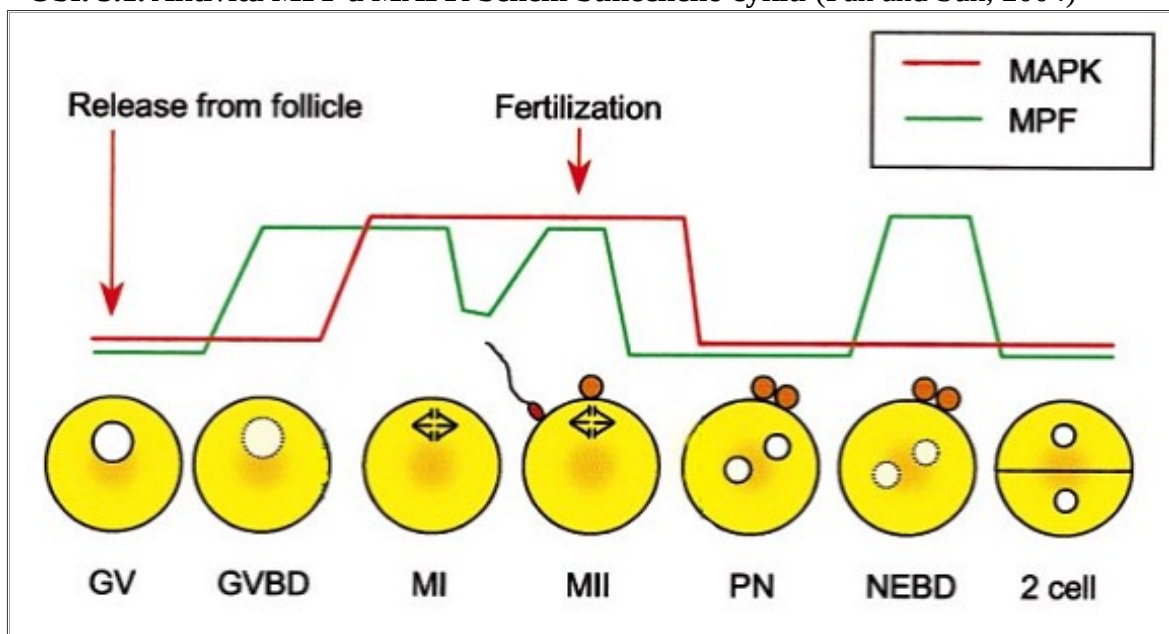
MPF v cytoplasmě stoupá krátce před GVBD a indukuje právě již zmíněný rozpad zárodečného váčku, kondenzaci chromozomů (Ford, 1985) a tvorbu dělicího vřeténka (Hunter, 2000). MPF také pravděpodobně inhibuje RNA polymerázu II, což by vysvětlovalo inhibici transkripce v posledních fázích zrání oocyty (Heikinheimo and Gibbons, 1998).

Aktivita MPF roste až dosáhne MI fáze, poté během anafáze I a telofáze I klesá, dojde k vydělení 1. pólového tělíska a znovu roste v době metafáze II, kdy se vajíčko nachází v druhém meiotickém bloku. Snížení jeho aktivity je nezbytné pro výstup z tohoto bloku a dochází k němu krátce po proniknutí spermie do oocyty (Hunter, 2000; Kikuchi et al., 1995; Naito and Toyoda, 1991; Ogushi et al., 2005). Výstup z meiosis I je spojen s degradací cyklinu B, což vede k částečné inaktivaci MPF a dočasnému snížení jeho aktivity (Tunquist and Maller, 2003).

MPF se také označuje jako histon kináza (Naito and Toyoda, 1991), protože jejím substrátem je histon H1. Místa na tomto histonu jsou specificky fosforylována cdc2 kinázou a tento proces fosforylace je důležitou součástí pro vstup buněk do mitosy (Langan et al., 1989). Histon H1 hraje také důležitou roli v balení nukleozomů. Předpokládá se, že fosforylace tohoto histonu H1 má vliv na kondenzaci chromozomů během buněčného dělení (Bradbury et al., 1974).

Ke stabilizaci MPF během druhého meiotického bloku je potřeba exprese c-mos, který je součástí cytotatického faktoru (CSF), (Kubiak et al., 1993; Trounson et al., 1998). V myších oocytech c-mos inhibuje degradaci cyklinu B, což vede k jeho akumulaci mezi meiosou I a II (O'Keefe et al., 1991).

Obr. 3.1. Aktivita MPF a MAPK během buněčného cyklu (Fan and Sun, 2004)



MAPK (mitogen-activated protein kinase)

MAP kinázy jsou signální molekuly, které aktivují kaskádu nejméně tří protein kináz v sérii, což zvyšuje jejich aktivaci. Jsou hlavní součástí v řízení embryogeneze, diferenciace a proliferace buněk a buněčné smrti (Pearson et al., 2001). Protein kinázy způsobující fosforylaci a fosfatázy, které způsobují defosforylaci příslušného proteinu, hrají při meiose klíčovou úlohu (Fan and Sun, 2004).

Mitogen-activated protein (MAP) kináza patří do rodiny serin/threonin protein kináz. Je také nazývána jako extracellular-regulated kinase (ERK). Pro plnou aktivitu MAPK je nutná fosforylace threoninových a tyrosinových zbytků (Fan and Sun, 2004; Inoue et al., 1995).

Mos, MAPKK a MAP kináza jsou aktivovány stejně jako MPF během období zrání oocyty a inaktivovány krátce po oplození, nebo partenogenetické aktivaci (Fan and Sun, 2004; Kosako et al., 1994). Aktivita MAP kinázy je ve stádiu GV oocytů nízká. K vlastní aktivaci dochází až po GVBD (Inoue et al., 1995). Hodnoty MAPK se postupně zvyšují, dokud buňka nedosáhne metafáze II, poté její aktivita zůstává vysoká, i když hladina MPF během anafáze I a telofáze I dočasně poklesne. Na rozdíl od MPF zůstává MAP kinázová aktivita vysoká i při vydělení prvního pólového tělíska (Hunter, 2000). Inoue et al. (1995) při vydělení 1. pólového tělíska zaznamenal nepatrný pokles aktivity MAP kinázy.

Vzrůst aktivity MAP kinázy nezávisí na její syntéze, ale na fosforylaci (Inoue et al., 1995). MAP kináza je aktivní pouze v případě, když jsou tyrosinové i threonino-serinové zbytky fosforylované. Tuto fosforylaci může zabezpečit aktivátor MAP kinázy, což je fosfoprotein o velikosti 45 kDa a je proto důležitým článkem ve fosforylační kaskádě. Kromě aktivátoru je pro aktivaci MAP kinázy potřeba i ATP. Zpětnou defosforylaci a inaktivaci MAP kinázy iniciuje protein fosfatáza 2A (Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992).

Aktivní MAP kináza se podílí na dozrávání prasečích oocytů, jak již bylo uvedeno, zejména v období po GVBD (Inoue et al., 1995; Sun et al., 2002). Předčasná aktivace MAP kinázy indukuje předčasný rozpad zárodečného váčku u meioticky nekompetentních oocytů (Sun et al., 2002). Bylo uvedeno, že MAP kináza může regulovat faktory zapojené do aktivace nebo stabilizace MPF (Kosako et al., 1994). MAPK se také podílí na regulaci organizace mikrotubulů a sestavování meiotického vřeténka (Fan and Sun, 2004)

Členem této MAP kinázové kaskády v prasečích oocytech je i p90rsk. Tato ribosomální S6 protein kináza o velikosti 90 kDa je považována za nejznámější substrát MAP kinázy (Fan et al., 2003a). Signální dráha Mos/MEK/MAPK/p90rsk reguluje buněčný cyklus prostřednictvím kaskádové fosforylace a je v kumulárních buňkách nepostradatelná pro obnovu meiosis

indukovanou gonadotropiny. MAP kináza a p90rsk jsou vysoce fosforylované mezi MI a MII fázemi, což je období kdy jsou mikrotubuly sestaveny do dělicího vřeténka (Fan and Sun, 2004; Sun et al., 2002). Jejich aktivita se souběžně zvyšuje krátce po GVBD, kulminuje v MI fázi a udržuje vysokou aktivitu v metafázi II (Fan et al., 2003a; Sugiura et al., 2002). P90rsk je aktivována pomocí ERK1 a 2, které ji fosforylují na místech Ser369 a Thr577 v in vivo i in vitro podmínkách (Dalby et al., 1998). MEK neboli MAP kináza kináza je též aktivována fosforylací a jejím aktivátorem v oocytech obratlovců je Mos, což je produkt proto-onkogenu c-mos. (Tunquist and Maller, 2003). C-mos mRNA se uchovává v rostoucích oocytech a je překládána na protein Mos, který stimuluje MAPK kaskádovou fosforylací během zrání oocyty (Gebauer and Richter, 1997).

Bylo zjištěno, že MAP kinázy interagují s MPF v řízení progresu buněčného cyklu (Fan and Sun, 2004). Nahromaděný Mos aktivuje dráhu MAPK, pravděpodobně přes aktivaci p90rsk. Aktivní p90rsk inaktivuje Myt1 a podpoří tak aktivaci komplexu MPF a vstup do meiosis I (Fan et al., 2002).

CSF (cytostatický faktor)

Během zrání se objevují cytoplazmatické faktory, které podporují syntézu DNA a zastavují buněčný cyklus v metafázi (Ford, 1985). Exprese c-mos, který je součástí cytostatického faktoru (CSF), je potřeba ke stabilizaci MPF během druhého meiotického bloku (Kubiak et al., 1993; Trounson et al., 1998). CSF je definován jako aktivita, která je schopná inhibovat přechod z metafáze II do anafáze II (Fan and Sun, 2004).

Zdá se, že CSF je součástí signální dráhy Mos/MEK/MAPK/p90rsk (Fan and Sun, 2004). Podle studie Kosako et al. (1994) je v signální dráze indukující expresi Mos využita i MAPKK (MEK).

Je zajímavé, že přestože aktivní CSF udržuje oocyty v MII fázi druhého meiotického bloku, není potřebná inaktivace CSF nebo MAPK pro z něho vystoupení po oplození. Za fyziologických podmínek je uvolnění z MII zprostředkováno Ca^{2+} /kalmmodulin-dependentní kinázou II (CaMKII), která spouští degradaci cyklinů M-fáze a segregaci sesterských chromatid (Fan et al., 2003b). Zároveň se aktivita MPF v přítomnosti Ca^{2+} , které se uvolňují při oplození, extrémně rychle ztrácí (Ford, 1985).

Po oplození následuje rychlý pokles aktivity MPF, zatímco CSF je přítomen ještě 30 – 45 minut po oplození, než také klesne (Tunquist and Maller, 2003). Inaktivace MAPK způsobuje uvolnění oocyty z MII fáze (Tatemoto and Muto, 2001). MEK inhibitor U0126

partenogeneticky aktivuje myší oocyty. V médiu s prasečími oocyty tento inhibitor znatelně snížil aktivitu MAPK i MPF a asi polovina oocytů vstoupila do interfáze (Fan et al., 2003a). Podle těchto výsledků je jasné, že aktivita MAPK je nezbytná pro udržení MPF aktivity a pro udržení oocytu v MII fázi (Fan and Sun, 2004). Ztráta aktivity CSF po oplození může být způsobena degradací Mos a inaktivací MEK a MAP kinázy (Kosako et al., 1994).

Předpokládá se, že Mos je důležitou součástí při procesu uvolnění z profáze prvního meiotického bloku a při vyvolání druhého meiotického bloku v metafázi II (Kosako et al., 1994). V myších oocytech c-mos inhibuje degradaci cyklinu B, což vede k jeho akumulaci mezi meiosou I a II (O'Keefe et al., 1991).

Bylo zjištěno, že endogenní produkt c-mos, konkrétně pp39mos, pozitivně ovlivňuje iniciaci MPF a tím i meiotické dozrávání oocytů u rodu *Xenopus*. Je jedním ze spouštěčů pro přechod G2/M (Sagata et al., 1989). Stejných závěrů bylo dosaženo i u myší, kde byl produkt c-mos, pp39mos, detekován v oocytech s vyděleným pólovým tělískem, během GVBD, v metafázi I, anafázi I i v ovulovaných vajíčkách (Paules et al., 1989).

Cyklické nukleotidy

Cyklické nukleotidy jsou klíčové molekuly pro regulaci meiosis u savčích oocytů. Patří sem cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate (cAMP) a cyclic guanosine 3', 5'- monophosphate (cGMP), (Gilchrist et al., 2016; Hubbard and Price, 1988).

Cyklický AMP je syntetizován z ATP aktivní adenylyl cyklázou (AC) přímo v oocytech hlodavců (Horner et al., 2003). Nicméně hlavním zdrojem cAMP jsou somatické buňky obklopující oocyt, přičemž se cAMP do něj pak přenáší pomocí mezerových spojů (Bornslaeger and Schultz, 1985; Conti et al., 2012; Salustri et al., 1985). Vyšší hladina cAMP, který v oocytu hraje roli sekundárního posla, zabraňuje rozpadu zárodečného váčku a podílí se tak na udržování oocytu v meiotickém bloku (Gilchrist et al., 2016; Cho et al., 1974). Taková hladina cAMP aktivuje cAMP dependentní protein kinázu A (PKA), která zabraňuje aktivaci MPF a udržuje oocyt v M-fázi. MPF se inaktivuje fosforylací dvou vysoce konzervativních zbytků podjednotky Cdc2, Thr14 a Tyr15. Tento proces je katalyzován Wee1 kinázami, zatímco defosforylace těchto zbytků závisí na fosfatázách Cdc25 (Conti et al., 2012). Některé studie ukazují, že PKA reguluje přímo aktivitu Cdc25 fosfatáz a Wee1 kináz (Oh et al., 2010; Pirino et al., 2009).

Bylo také zjištěno, že cAMP se může podílet na regulaci aktivity faktorů, které upravují průběh transkripce a remodelaci chromatinu v dorostlých oocytech krátce před obnovením meiosis (Gilchrist et al., 2016).

Molekuly cGMP pronikají přes mezerové spoje z granulózních buněk do oocyty, kde inhibují enzym PDE3A a zabraňují tak hydrolýze cAMP (Norris et al., 2009; Vaccari et al., 2009). Aktivní PDE jsou fosfodiesterázy cyklických nukleotidů, které jsou přítomny v oocyty a inaktivují cAMP. V oocytech myši se nachází PDE3 a v granulózních buňkách PDE4 (Conti et al., 2002). Tímto způsobem cGMP udržuje dostatečnou hladinu cAMP v oocyty a podporuje tak setrvání oocyty v meiotickém bloku (Gilchrist et al., 2016).

LH způsobuje akutní krátkodobé zvýšení cAMP v somatických buňkách preovulačního folikulu. Dochází k němu bezprostředně před GVBD a je proto potřebné pro iniciaci meiotického zrání. Zmíněné jednorázové zvýšení hladiny je významné, protože je až 80-200x vyšší (Yoshimura et al., 1992). To vede k aktivaci MAPK kaskády, která zavře mezerové spoje mezi granulózními buňkami a oocytem (Sela-Abramovich et al., 2006). LH zároveň snižuje množství cGMP v granulózních buňkách, které může vycházet z inhibice guanylyl cyklázy, nebo stimulace cGMP fosfodiesteráz. Protože molekuly již nemají kudy procházet, sníží se koncentrace cGMP i v oocyty (Patwardhan and Lanthier, 1984; Vaccari et al., 2009). Výsledkem je pak aktivace PDE3A, snížení hladiny cAMP a oocyt prochází meiotickou progresí (Norris et al., 2009).

Vápník

Vápník je důležitou intracelulární signální molekulou. Běžná hladina Ca^{2+} v buňce je asi 100 nM, což je 20 000x nižší koncentrace, než jsou 2 mM v extracelulárním prostředí. Příliš vysoká hladina Ca^{2+} v intracelulárním prostředí vede k buněčné smrti (Clapham, 1995).

Vápenaté ionty hrají zásadní roli v regulaci mnoha buněčných procesů – kontrakci hladké svaloviny, smyslovém vnímání, neurohumorální signalizaci (Berridge, 1993) a v neposlední řadě také regulaci meiosis savčích oocytů a fertilizaci (Petr et al., 2001).

Vápník je uskladněn v intracelulárních zásobárnách, jako jsou mitochondrie a endoplazmatické retikulum (ER), které je největší. V ER jsou vápenaté ionty navázány na specializovaných proteinech, jako je calsequestrin. Hlavní depozita prasečích oocytů se nachází ve vakuolách, v mitochondriích, na povrchu lipidových granul, ale rovněž v karyoplazmě a cytoplazmě kumulárních buněk. (Petr et al., 2001).

Uvolňování Ca^{2+} do cytosolu je zprostředkováno dvěma signálními kaskádami. Jedna dráha využívá inositol (1,4,5) – trifosfát (IP_3) a druhá dráha je zprostředkována ryanodinovými receptory (RyR), (Clapham, 1995; Wilding and Dale, 1997). Z cytoplazmy do ER jsou Ca^{2+} aktivně přemístovány pomocí SERCA pump zanořených v membráně retikula, za využití ATP (Clapham, 1995; Schuster et al., 2002).

Pro uvolnění Ca^{2+} na základě signalizace pomocí IP_3 je zásadní protein fosfolipáza C (PLC). Různé izoformy PLC jsou aktivovány prostřednictvím hormonálních receptorů ve spojení s G-proteiny ($\text{PLC}\beta$), které se nachází na povrchu oocyty, nebo protein kinázami ($\text{PLC}\gamma$), nebo vápníkem ($\text{PLC}\delta$), (Rebecchi and Pentylala, 2000). Fosfolipáza C rozkládá fosfatidyl inositol 4,5-bisfosfát (PIP_2) na IP_3 a diacylglycerol (DAG). Molekula IP_3 se naváže na vlastní receptor (IP_3R), který se nachází na endoplazmatickém retikulu a z něj se poté kanálky uvolní vápenaté ionty do cytosolu (Schuster et al., 2002). Luteinizační hormon (LH) má pozitivní vliv na syntézu PLC a stimuluje výše uvedenou kaskádu (Davis et al., 1986).

Další mechanismus pro uvolnění Ca^{2+} z ER je významně využíván ve svalových buňkách a neuronech. Jde o ryanodinové receptory (RyR) umístěné na membráně zásobárny vápníku, jejichž aktivátorem je cyklická ADP ribóza (Schuster et al., 2002), nebo zvýšená hladina vápníku v cytosolu (Clapham, 1995). Cyklická ADP ribóza je z nikotinamid adenin difosfátu (NAD^+) přeměněna ADP ribosyl cyklázou nebo NAD^+ glykohydrolázou. Zároveň je potřeba přítomnost kalmodulinu v buňce, (Jacobson et al., 1995; Lee et al., 1995).

Kalmodulin (CaM) je protein, na který jsou schopny se navázat Ca^{2+} . Je přítomný ve všech eukaryotních buňkách, reguluje koncentraci Ca^{2+} v intracelulárních podmínkách a je součástí různých signálních drah (Chin and Means, 2000).

Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII) je serin-threoninová protein kináza, která je aktivována vápenatými ionty nebo kalmodulinem (Hama et al., 1995). Běžně je udržována v inaktivním stavu, ale v přítomnosti vápníku nebo kalmodulinu se enzym autofosforyluje na threoninu 286 a stane se aktivním. CaMKII se podílí na regulaci vzniku MPF a MAPK kaskády, proto je důležitým regulátorem meiotického cyklu, tvorby dělicího vřeténka a aktivaci prasečích oocytů (Fan et al., 2003b).

Je známé, že oplození spouští oscilační vlnu intracelulárního vápníku (Wilding and Dale, 1997). Uvolněný Ca^{2+} vede k aktivaci proteolytických enzymů, které degradují c-mos a cyklin B, což má za následek inaktivaci MPF a tím i dokončení meiosis II (Lorca et al., 1994). Cyklin B je degradován přes CaMKII (Fan et al., 2003b) a c-mos ubikvitinací v proteazomu (Ishida et al., 1993).

Gasotransmittery

Gasotransmittery jsou malé plynné molekuly, mezi které patří oxid dusnatý (NO), sirovodík (H_2S) a oxid uhelnatý (CO), (Sen and Snyder, 2010). Plynné molekuly se nedají skladovat ve váčkovitých strukturách, ale musí být opětovně enzymaticky resyntetizovány podle

aktuální potřeby. Jako signální molekuly difundují přímo do buněk a interagují s cíli (Mustafa et al., 2009), jsou po uvolnění rychle degradovány a vzájemně se mezi sebou ovlivňují (Pae et al., 2009).

Oxid dusnatý (NO) byl prvním popsaným gasotransmitterem (Pae et al., 2009). Vzhledem k tomu, že má jeden nepárový elektron v posledním orbitalu, je to volný radikál a jako takový je vysoce reaktivní (Chung et al., 2001). Jeho syntéza proto musí být přísně regulována a přesně určována jeho signalizace (Bredt, 2003).

NO se účastní dilatace krevních cév, je neurotransmitterem v centrální i periferní nervové soustavě a podílí se na nespecifické imunitní odpovědi (Choi et al., 2002). Ovlivňuje posttranslační modifikace proteinů přímo (nitrosylace, nitrace) i nepřímo (methylace, ribosylace) a aktivitu guanylát cyklázy (Schmidt, 1992). Dále přispívá k aktivaci apoptotické signální dráhy v případě jeho dlouhodobé nadprodukce. Prahová hodnota NO, která spouští apoptózu se však v buňkách liší. Nicméně nízká nebo fyziologická koncentrace NO apoptóze zabraňuje (Choi et al., 2002). Všechny izoformy NO syntáz, které jsou níže detailněji popsány, regulují vznik NO a ovlivňují tak získání meiotické kompetence v prasečích oocytech (Chmelíková et al., 2009).

Biosyntetický enzym NO syntáza (NOS), který vyrábí oxid dusnatý, využívá jako substráty L-arginin, NADPH a O_2 za vzniku produktů NADP a citrulinu (Alderton et al., 2001). Existují 3 izoformy NOS: nervová NOS (nNOS), indukovatelná NOS (iNOS) a endoteliální NOS (eNOS), (Pae et al., 2009). NO syntázy jsou bidomérové struktury. N-oxygenázová doména má vazebná místa pro hem, BH_4 a L-arginin a C-reduktázová doména se skládá z vazebných míst pro kofaktory FAD, FMN a NADPH (Ghosh and Stuehr, 1995). Oxidační funkce uvedených izoform jsou zprostředkovány FAD (flavin adenin dinukleotidem), FMN (flavin mononukleotidem) a BH_4 (tetrahydrobiopterinem) a jsou fosforylovány serin kinázami (Mustafa et al., 2009).

Nervová NOS také známá jako NOS-1 (Bredt, 2003) se nachází v cytoplazmě oocyty a v zárodečném váčku (Chmelíková et al., 2010). Forma nNOS je přítomná pouze v oocyty, nikoliv v granulóznicích ani kumulárních buňkách (Chmelíková et al., 2009). NO produkovaný nNOS je důležitý pro uvolňování neurotransmitteru závislého na receptoru N-methyl-D-aspartátu (NMDA), pro neurotoxicitu a zvýšení hladiny cGMP. Nosný protein Capon interaguje s nNOS doménou PDZ prostřednictvím C-konce a vede molekulu k cílovým proteinům. Doména PDZ je charakterizována jako součást nNOS o velikosti 20-100 aminokyselin, na kterou se váže protein Capon (Jaffrey et al., 1998).

Indukovatelná NOS neboli NOS-2 je nezávislá na vápníku (Alderton et al., 2001) a je dispergovaná v cytoplazmě oocyty (Chmelíková et al., 2010). NO z iNOS inhibuje meiotické zrání tím, že zvyšuje koncentrace cGMP v preovulačních folikulech (Nakamura et al., 2002). Byla potvrzena přítomnost iNOS v jádře meioticky nekompetentních oocytů, ve kterých ještě probíhá syntéza RNA potřebná pro jeho další vývoj. V jádrech oocytů s dokončeným růstem však již iNOS nebyla nalezena. Proto je pravděpodobné, že iNOS může být důležitá pro syntézu RNA během růstové periody oocyty (Chmelíková et al., 2009).

Endoteliální NOS neboli NOS-3 (Bredt, 2003) je přítomná v cytoplazmě, zárodečném váčku a je asociovaná s meiotickým vřeténkem (Chmelíková et al., 2010). eNOS je stejně jako nNOS Ca^{2+} -CaM dependentní a obě produkují malé množství NO po krátkou dobu (Lamas et al., 1992). Stimulace vápníkem zajišťuje rychlou aktivaci těchto izoform (Mustafa et al., 2009), protože vazebné místo CaM zvyšuje rychlost přenosu elektronů z NADPH (Alderton et al., 2001).

V oocyty jsou přítomny všechny izoformy NOS. V granulóznicích a kumulárních buňkách se však nachází pouze iNOS a eNOS (Chmelíková et al., 2009). Bylo zjištěno, že NOS a NO se účastní meiotického zrání, oplození a pre-implantačního embryonálního vývoje (Petr et al., 2007). Je důležité v jaké koncentraci NO působí. Nízké intracelulární koncentrace oocyty ve stádiu GV podporují produkci progesteronu v granulóznicích buňkách, indukují GVBD a dozrávání oocytů. Na druhou stranu, příliš vysoká množství udržují oocyty v meiotickém bloku a způsobují apoptózu (Nakamura et al., 2002; Thaler and Epel, 2003). Výsledky studie Nakamury et al. (2002) ukázaly, že donor NO inhibuje zrání oocyty *in vitro* skrze inhibici MAPK aktivací tyrosin kináz.

Sirovodík (H_2S) neboli sulfan je charakterizován jako bezbarvý plyn, který silně zapáchá (Wang, 2002).

Je prokázáno, že je sirovodík fyziologicky syntetizován enzymy cystationin β -syntázou (CBS) a cystathion γ -lyázou (CSE), které využívají metabolismus cysteinu. Dalším enzymem je 3-mercaptopyruvát sulfurtransferáza (3-MPST), která za přítomnosti vhodných substrátů reaguje s cystein aminotransferázou (CAT) a produkuje H_2S (Wang, 2010). *In vivo* k syntéze sulfanu dochází oxidací v mitochondriích nebo methylací v cytosolu (Yang et al., 2008; Wang, 2002).

H_2S se účastní různých fyziologických procesů relaxace hladké svaloviny, neurální vzrušivosti (Wang, 2002), včetně jeho vlivu na reprodukční funkce (Nevoral et al., 2015a). Dále funguje jako regulátor krevního tlaku a fyziologický vazodilatátor (Zhao et al., 2001). Také

ovlivňuje tvorbu cyklických nukleotidů tím, že inhibuje fosfodiesterázy (PDEs), (Cao et al., 2017).

Ve zrajících prasečích oocytech byla detekována mRNA enzymů syntetizujících H₂S: CBS, CSE a 3-MPST. Inhibice těchto enzymů způsobuje zpomalení meiotického zrání. Předpokládá se, že je H₂S nutný k regulaci MPF a MAPK v období zrání oocyty (Nevoral et al., 2015a, 2015b).

2.2. Oxid uhelnatý (CO)

Oxid uhelnatý je bezbarvý plyn bez zápachu a ve vysokém množství toxický. Je fyziologicky produkován buňkami savců během degradace hemu a účastní se regulace metabolismu (Motterlini and Foresti, 2017; Racek, 2012). Má dvouatomovou molekulu, která se skládá z jednoho atomu uhlíku kovalentně vázaného na jeden atom kyslíku (Pae et al., 2009).

V porovnání s ostatními gasotransmitery CO není reaktivní molekula a od její produkce v buňkách až po její vyloučení dýcháním se příliš nemění. To má vliv na její signalizační aktivitu, což znamená, že příliš nereaguje s okolními molekulami a je tedy potenciale odolnější vůči vlastní přeměně a její účinnost trvá delší dobu (Motterlini and Foresti, 2017).

2.2.1. Obecné vlastnosti a toxicita CO

Bod tání CO je -205 °C a bod varu -192 °C. Má lipofilní charakter, minimálně se rozpouští ve vodě a snadno prostupuje membránami (Racek, 2012).

CO funguje jako signální molekula ve velmi nízkých koncentracích. Interaguje pouze s některými proteiny obsahující kov, včetně bílkovin závislých na hemu (hemoglobin, myoglobin, peroxidázy, NOS, cytochrom P₄₅₀) a některými plyny (NO, H₂S), (Kajimura et al., 2012). CO je oproti ostatním gasotransmitterům velice specifický a vysoce selektivní. Váže se pouze na železnatý hem (Fe²⁺), (Motterlini and Foresti, 2017) a má schopnost zabránit jeho oxidaci (Sher et al., 2012). Ve vysoké koncentraci je však cytotoxický, protože inhibuje respirační aktivitu v mitochondriích (Long et al., 2014).

Oxid uhelnatý v přírodě vzniká při nedokonalém spalování uhlíkatých látek. Je obsažen ve výfukových plynech ze spalovacích motorů, v kamnech, v tabákovém kouři. Jeho vazba na hem je 200x silnější než vazba kyslíku, vzniklý karboxyhemoglobin (COHb) proto není schopen

vázat kyslík a přenášet ho do tkání (Racek, 2012). V důsledku toho dochází k hypoxii tkání a otravě oxidem uhelnatým (Kourti et al., 2017).

2.2.2. Syntéza CO v živých organismech

Hemoxygenázy degradují hem, který opouští stárnoucí červené krvinky, za účelem uvolnění oxidu uhelnatého (CO), železnatého iontu (Fe^{2+}) a biliverdinu. Biliverdin je tetrapyrrolový pigment, který se pak redukuje na bilirubin pomocí biliverdin reduktázy (BVR), (Ayer et al., 2016; Untereiner et al., 2012). Bilirubin je považován za fyziologický antioxidantní cytoprotektant srovnatelný s glutathionem (Sedlak and Snyder, 2006).

K odbourávání hemu dochází za spolupůsobení kyslíku a redukované formy koenzymu NADPH. Reakci lze vyjádřit sumární rovnicí:



CO se tvoří v různých tkáních, nejvíce však ve slezině, protože k degradaci hemu dochází právě tam (Racek, 2012).

Zjištění hladiny karboxyhemoglobinu (COHb) v krvi je běžným parametrem pro *in vivo* stanovení množství CO po podání plynného CO, molekul podporujících CO (CO-RMs) a pro odhalení zvýšené endogenní produkce CO v patologických stavech (Melley et al., 2007).

2.2.3. Izoformy biosyntetických enzymů CO

Hlavním endogenním zdrojem CO jsou enzymy hemoxygenázy. Existují v indukční (HO-1) a konstitutivní (HO-2 a HO-3) izoformě (Lu et al., 2016; Motterlini et al., 2002a). HO-1 a HO-2 jsou produkty dvou různých genů: HMOX1 a HMOX2. U lidí a potkanů jsou tyto geny paralogy, které si jsou sekvenčně podobné asi ze 43 % aminokyselinových sekvencí (Cruse and Maines, 1988). Jejich genové produkty jsou odlišné v primární struktuře, regulaci i distribuci v tkáních. Oba však katalyzují oxidaci hemu na biologicky aktivní molekuly (Ayer et al., 2016; Maines, 1997).

Hemoxygenázy jsou evolučně vysoce konzervativní enzymy a byly identifikovány i v jednobuněčných organismech jako jsou některé bakterie (Zhu et al., 2000) nebo druhy kvasinek (Kim et al., 2006).

Hemoxygenáza 1 (HO-1)

Aktivita této indukovatelné formy je řízena zvýšeným oxidačním stresem (Abraham and Kappas, 2008; Maines, 1997).

HO-1 je antioxidační enzym, který funguje jako obranný systém tkání proti stresovým stimulům, včetně oxidačního stresu, UV záření, karcinogenů, hypoxie, hormony, endotoxiny a dalších stavů, které jsou charakterizovány produkcí volných radikálů odvozených od kyslíku. HO-1 koreluje s ochranou orgánů a tkání po zranění (Maines, 1997; Motterlini and Foresti, 2016). Mezi tyto látky patří i NO, který stimuluje expresi HO-1 a ta poté zvýší produkci endogenního CO (Motterlini et al., 2002b). Je tvořena v játrech, slezině, ledvinách a kostní dřeni (Racek, 2012).

Hemoxygenáza 2 (HO-2)

HO-2 je přednostně exprimována ve varlatech, mozku a endotelu (Maines, 1997). Je zodpovědná hlavně za neurotransmisi a dilataci cév (Kourti et al., 2017; Zakhary et al., 1996).

Oxid uhelnatý funguje jako plynový neurotransmitter, není však skladován ve váčcích, ale musí být opakovaně dynamicky syntetizován. Jeho biosyntetický enzym HO-2 je během neurální stimulace fosforylován a aktivován kasein kinázou 2 (CK2), (Boehning et al., 2003). HO-2 je také velice rychle stimulována komplexem Ca^{2+} -CaM, stejně jako eNOS a nNOS. Nebyl zjištěn žádný vliv vápenatého komplexu na aktivaci enzymu CK2 (Boehning et al., 2004).

Hemoxygenáza 3 (HO-3)

HO-3 je zřejmě transkriptem genu pro izoformu HO-2, je s ní totiž v 90 % homologii. Nejspíše nemá význam pro degradaci hemu (Racek, 2012).

2.2.4. Význam CO

Oxid uhelnatý je jako signální molekula detekována v mozku, játrech a endotelu živočichů. Reguluje cévní tonus, buněčnou proliferaci, bakteriální infekci, účastní se signalizačních drah proti zánětu, když inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů v makrofázích, má antiapoptotický a antikoagulační efekt (Ayer et al., 2016; Brouard et al., 2000; Desmard et al., 2012; Motterlini et al., 1998; Untereiner et al., 2012; Zakhary et al., 1996). Funguje jako neurotransmitter (Verma et al., 1993) a dilatátor krevních cév, stejně jako NO (Motterlini et al., 2002a).

CO například zvyšuje citlivost vápníkem aktivovaných K^+ kanálů (BK_{Ca}) k Ca^{2+} (Untereiner et al., 2012). Otevření těchto kanálů vede k hyperpolarizaci, která zavírá napětím řízené kanály Ca^{2+} , snižuje intracelulární koncentrace Ca^{2+} a dochází k uvolnění cév (André et al., 2011). Oxid uhelnatý ovlivňuje i aktivaci MAPK, tím je zprostředkován jeho antiapoptotický účinek (Untereiner et al., 2012; Zhang et al., 2003). Účinky CO a NO se navzájem ovlivňují. CO také aktivuje syntázu oxidu dusnatého (NOS) a vzniklý NO pak aktivuje solubilní guanylátcyklázu (sGC) a zvyšuje se hladina cGMP (Acevedo and Ahmed, 1998; Untereiner et al., 2012), která například blokuje zrání oocyty (Schwarz et al., 2014; Tichovská et al., 2011).

Antiapoptotický účinek CO

Apoptóza je forma programované buněčné smrti, která fyziologicky a řízeně ovlivňuje vývojový program buňky (Wang et al., 2011) a slouží k odstranění přebytečných, poškozených nebo infikovaných buněk. Je regulována aktivovanými proteázami (kaspázami) a nukleázami. Jsou známy dvě apoptotické dráhy: vnitřní, která je závislá na mitochondriích a vnější, která závisí na receptoru smrti (Huang and Strasser, 2000). Vnitřní apoptotická dráha zahrnuje aktivaci a mitochondriální translokaci členů proapoptotické rodiny Bcl-2, kam patří například Bax. Dochází k mitochondriální dysfunkci a uvolňování proapoptotických mediátorů, jako je cytochrom c (Wang et al., 2011). K mitochondriální dysfunkci, která spouští apoptotické procesy, dochází i kvůli narušení vnější membrány mitochondrie, nebo působením kyslíkových radikálů (ROS), (Fissore et al., 2002; Lord and Aitken, 2013). Vnější apoptózu vyvolává asimilace signálního komplexu (DISC), která se skládá z komponent Fas, FADD a kaspázy 8. Přítomnost aktivační protilátky Jo2 a fosforylace FADD jsou důležité pro sestavení komplexu DISC, který je schopen aktivovat kaspázy a indukovat buněčnou smrt. Transmembránové receptory, receptory smrti, přímo překládají apoptotické signály (Wang et al., 2011).

Četné studie prokazují, že nízké koncentrace CO zabraňují spuštění apoptózy v endoteliálních buňkách (Brouard et al., 2000; Wang et al., 2007), hepatocytech (Choi et al., 2004) a kardiomyocytech (Clark et al., 2003). Nízké koncentrace CO (10-100 μ m) mohou zabránit poškození mitochondriální membrány, zatímco vysoké koncentrace CO (250-500 μ m) vyvolávají její poškození a spouští uvolňování proapoptotických faktorů do cytosolu (Queiroga et al., 2011). Výsledky Wang et al. (2011) ukázaly, že CO může zabraňovat apoptóze prostřednictvím inhibice obou zmíněných signalizačních drah. Brouard et al. (2000) a Zhang et al. (2003) uvádí, že antiapoptotický účinek CO závisí na aktivaci p38 MAP kinázové signální dráhy. Hlavním faktorem zodpovědným za výskyt negativních známek stárnutí během stárnutí

oocytů je pravděpodobně vysoká hladina ROS. S rostoucí hladinou ROS se zvyšuje i exprese HO-1 (Lord and Aitken, 2013).

Význam CO v reprodukci

Hemoxygenázy se nachází ve vaječnicích (Alexandreaanu and Lawson, 2003), děloze a placentě (Kreiser et al., 2003). Bylo zjištěno, že exprese HO-1 pozitivně ovlivňuje ovulaci, implantaci, placentaci, vývoj plodu a imunitní toleranci (Zenclussen et al., 2011). Hormonální hladiny během estrálního cyklu také ovlivňují expresi děložní HO-1. Během estru myši se exprese HO-1 zvyšuje (Cella et al., 2006; Zenclussen et al., 2014). Endogenní CO stimuluje steroidogenezi (Alexandreaanu and Lawson, 2003). Na základě experimentu Zenclussen et al. (2012) zjistili, že se u myši s deficiencí HO-1 zvyšuje apoptóza buněk a snižuje produkce oocytů.

Jak již bylo uvedeno donor CO interaguje se signální dráhou NO. Aktivuje iNOS/NO/cGC/cGMP a ovlivňuje meiotické zrání oocytu. Zvýšená hladina NO inhibuje meiotické zrání a MAPK kaskádu (Nakamura et al., 2002; Schwarz et al., 2014).

Bylo prokázáno, že oxidační stres způsobuje poruchy reprodukce. Podmínky *in vitro* s sebou výše uvedená rizika nesou a kvalita gamet a embryí je proto horší než v podmínkách *in vivo*. Systém HO/CO se podílí na signalizačních drahách, které buňky před těmito procesy chrání (Němeček et al., 2017). Bylo prokázáno, že se produkce CO podílí na regulaci mitochondriálních změn vedoucích k produkci ROS a s tím souvisejícím oxidačním stresem v kardiomyocytech (André et al., 2011; Ayer et al., 2016). Jak již bylo popsáno, právě oxidační stres způsobuje zvýšenou expresi enzymu HO-1, který produkuje oxid uhelnatý. Stejně tak je oxidační stres zodpovědný za známky stárnutí oocytu (Abraham and Kappas, 2008; Lord and Aitken, 2013).

3. Hypotéza a cíl práce

Cílem práce je ověření hypotézy, podle které je oxid uhelnatý zapojen do regulace procesu stárnutí oocyty prasete.

Pro ověření hypotézy bude sledována exprese izoform hemoxygenázy v oocyty prasete metodou Western blot a změny v buněčné lokalizaci izoform hemoxygenázy během stárnutí oocyty prasete pomocí imunohistochemické analýzy. Dále bude sledován účinek donorů oxidu uhelnatého a inhibitorů enzymů produkujících oxid uhelnatý na proces stárnutí oocyty prasete.

4. Materiál a metody

4.1. Zisk a kultivace oocytů

Z jatek byly odebrány vaječníky prasnic v různých fázích estrálního cyklu. Oocyty byly získány aspirací folikulární tekutiny z folikulů o velikosti 2-5 mm. Pro experimenty byly vybrány pouze oocyty s nepoškozenou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních buněk.

Oocyty byly kultivovány v modifikovaném médiu M199 (Gibco-BRL, Life Technologies, Paisley, Skotsko), které obsahovalo hydrogenuhličitan sodný (32,5 mM), kalcium laktát (2,75 mM), gentamicin (0,1 mM), HEPES (6,3 mM), 13,5 IU eCG: 6,6 IU hCG/ml (P.G.600; Intervet, Boxmeer, Holandsko) a 10 % fetálního telecího séra (GibcoBRL). Oocyty byly kultivovány ve 4-jamkových Petriho miskách 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze v 1 ml kultivačního média, při 39 °C a 5 % CO₂. Oocyty ve druhé meiotické metafázi byly zbaveny kumulárních buněk opakovaným pipetováním skrz tenkou skleněnou pipetu. Poté byly oocyty použity pro *in vitro* stárnutí po dobu 24, 48 a 72 hodin za stejných podmínek v kultivačním médiu bez přídavku hormonů.

4.2. Vyhodnocení stárnutí oocytů

Po dokončení stárnutí *in vitro* byly oocyty fixovány ve směsi ethanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu 48 hodin. Fixované oocyty byly barveny za použití 1 % orceinu. Poté byly rozděleny do čtyřech skupin podle morfologických znaků stárnutí na (I) nepoškozené oocyty ve stádiích metafáze II, anafáze II nebo telofáze II, (II) partenogeneticky aktivované oocyty (embrya a oocyty obsahující prvojádra), (III) oocyty podléhající apoptóze (obsahující apoptotické váčky pod vrstvou *zona pellucida*) a (IV) lyzované oocyty (oocyty, které ztratily integritu a mají poškozenou cytoplazmatickou membránu).

4.3. Imunohistochemická detekce HO

Po dokončení kultivace oocytů byla odstraněna vrstva *zona pellucida* (0,1 % pronáza). Následně byla provedena fixace oocytů v 2,5 % paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS). Membrána oocytu byla permeabilizována v 0,5 % roztoku Triton X v PBS s přídavkem 0,01 % BSA. Po opláchnutí v roztoku PBS s 0,1 % Tween 20 následovala inkubace s primární

protilátkou anti-hemoxygenázou 1 nebo anti-hemoxygenázou 2 (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan; 1:200). Inkubace trvala 14-16 hodin při 4 °C v 0,1 % BSA a 0,01 % Tween 20 v PBS. Po inkubaci byly oocyty opláchnuty v 0,1 % Tween 20 v PBS a kultivovány se sekundární myší protilátkou IgG konjugovanou s fluorescein-5-isothiocyánátem (FITC, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Německo; 1:100) nebo s králičí IgG konjugovanou s FITC (ThermoFisher scientific, Rockford, USA; 1:500). Inkubace se sekundární protilátkou byla provedena při laboratorní teplotě v 0,1 % BSA a 0,01 % Tween 20 v PBS po dobu jedné hodiny za nepřítomnosti světla. Po této inkubaci byly oocyty opláchnuty v roztoku 0,1 % Tween 20 v PBS.

Chromatin byl barven pomocí 4',6-diamidino-2-fenylindolu (DAPI, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Německo). Pro vyloučení nespecifické vazby sekundárních protilátek byly oocyty v kontrolní skupině ošetřeny stejným způsobem jako experimentální skupina s tím rozdílem, že nebyla provedena inkubace primární protilátky. Oocyty poté byly umístěny na sklíčka a fotografie pořízeny za použití konfokálního skenovacího mikroskopu (Zeiss, Německo). Fotografie byly analyzovány pomocí programu pro analýzu obrazu NIS Elements AR software (NIKON, Japonsko). Byla sledována intenzita fluorescenčního signálu FITC, která byla snížena o bazální signální intenzitu. Každý experiment byl zopakován nejméně třikrát, kdy bylo použito minimálně 15 oocytů v každé experimentální skupině.

4.4. Western blot

Western blot byl proveden kvůli ověření specifičnosti protilátek podle Tůmové et al. (2013). Oocyty byly lyzovány v MII fázi a separovány pomocí SDS-PAGE. Po blotingu byly membrány inkubovány s primárními protilátkami: anti-hemoxygenázou 1, anti-hemoxygenázou 2. Poté byly inkubovány se sekundárními protilátkami: myší IgG nebo králičí IgG. Proteiny byly detekovány pomocí kitu ECL Advanced Western blotting (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, Velká Británie). Každý Western blot byl opakován nejméně třikrát s minimálně 200 oocyty.

4.5. Kultivace stárnoucích oocytů s donorem CO a inhibitorem HO

Oocyty bez kumulárních buněk byly kultivovány v kultivačním médiu s donorem oxidu uhelnatého CORM-2 (trikarbonyl dichlororuthenium (II) dimer; Sigma-Aldrich GmbH, Munich,

Německo) v koncentracích 5, 25, 50 a 100 μM , rozpuštěném v dimethyl sulfoxidu (DMSO) po stanovenou dobu. CORM-2 rychle uvolňuje CO.

Další skupina oocytů byla kultivována v kultivačním médiu s inhibitorem HO Zn-protoporfyrim IX (Zn-PP IX; Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Německo) v koncentracích 2,5; 5 a 25 μM rozpuštěné v DMSO po stanovenou dobu. Kontrolní skupina byla kultivována pouze v kultivačním médiu DMSO. Po dokončení kultivace byly oocyty morfologicky ohodnoceny a byl sledován vliv donoru nebo inhibitoru na proces stárnutí oocytů. Každý experiment byl opakován nejméně třikrát a bylo použito nejméně 80 oocytů pro každou experimentální skupinu.

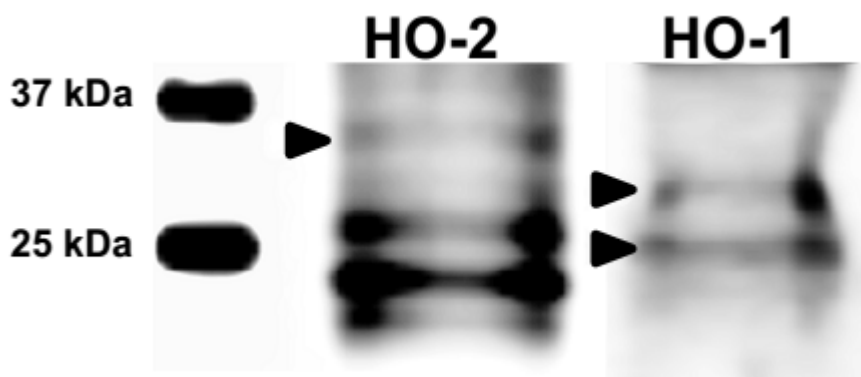
4.6. Statistická analýza

Data ze všech experimentů byla podrobena statistické analýze. Všechny experimenty byly zopakovány nejméně třikrát. Pro statistickou analýzu byl použit SAS 9.0 software (SAS Institute Inc., USA). Významné rozdíly mezi skupinami byly stanoveny analýzou rozptylu (ANOVA) a následnou Scheffovou metodou. P-hodnota menší než 0,05 byla považována za významnou.

5. Výsledky

5.1. HO izofomy jsou přítomny v prasečích oocytech během stárnutí *in vitro*

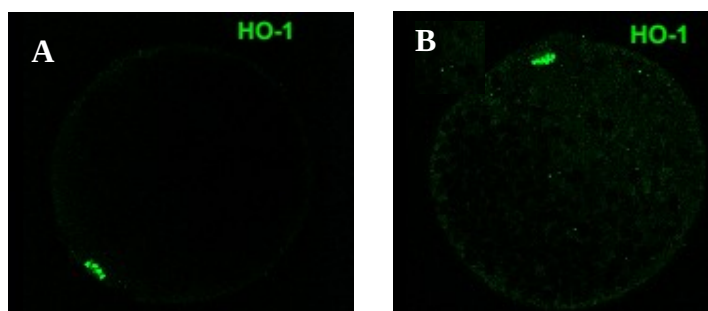
Obr. 5.1. Detekce izoforem HO-1 a HO-2 pomocí metody Western blot ve zralých prasečích oocytech

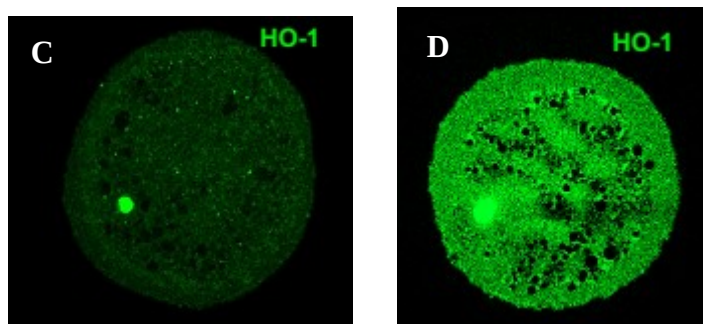


Průkaz exprese izoforem HO v oocytech prasete ve stádiu druhé meiotické metafáze. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a poté inkubovány se specifickými protilátkami HO (anti-HO-1 a anti-HO-2) v poměru 1:1000. Jeden vzorek obsahoval proteiny z 200 oocytů.

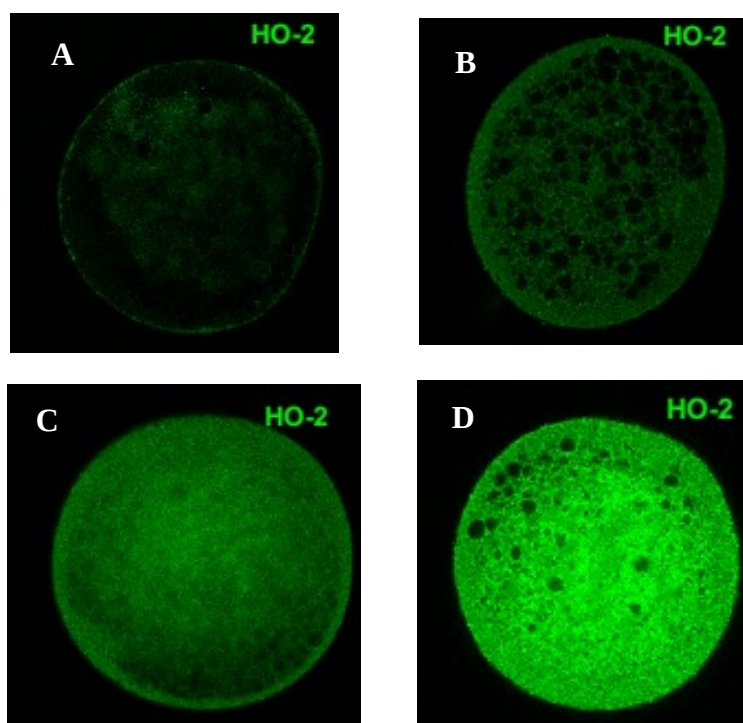
Obr. 5.1.: Pomocí metody Western blot byla specifickými protilátkami prokázána přítomnost izoforem HO-1 a HO-2. Šipky označují odpovídající pásma molekulární hmotnosti každého proteinu HO. Molekulární hmotnost obou proteinů se pohybuje mezi 25 a 37 kDa.

Obr. 5.2. Lokalizace HO-1 v meioticky zralých oocytech (MII) během stárnutí *in vitro*





Obr. 5.3. Lokalizace HO-2 v meioticky zralých oocytech (MII) během stárnutí *in vitro*

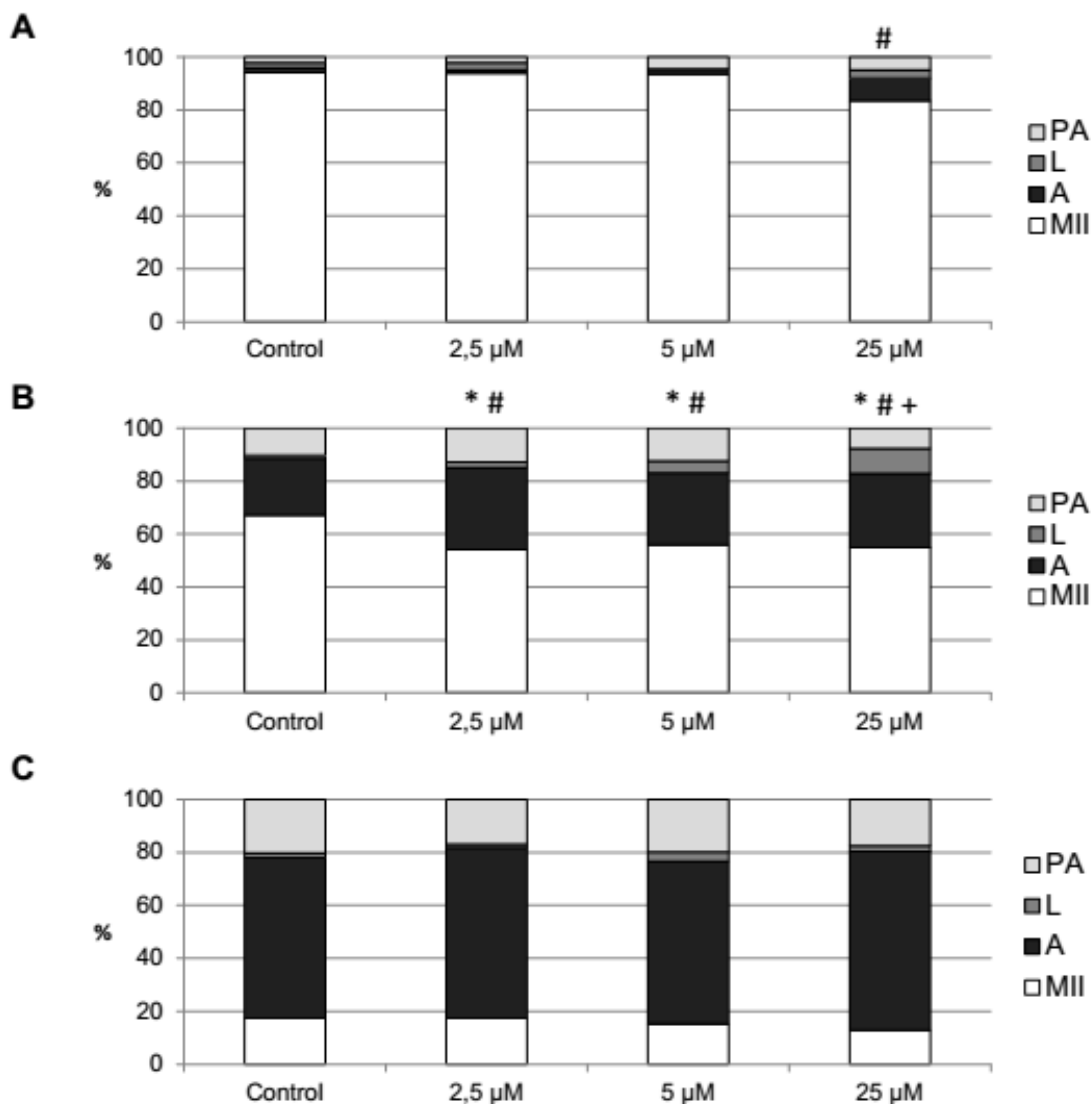


Lokalizace HO-1 a HO-2 v meioticky zralém (MII) oocytu (A), který podléhá stárnutí po dobu 24 (B), 48 (C) a 72 (D) hodin. HO-1 a HO-2 jsou obarveny zeleně (FITC), zvětšení 400x.

Obr. 5.2. a 5.3.: Byla prokázána přítomnost izoforem HO v prasečích oocytech. Podle intenzity signálu se jejich exprese s postupujícím stárnutím zvyšovala. V případě HO-1 byla zaznamenána exprese v jádře a perichromozomální oblasti. Exprese HO-2 byla zaznamenána v cytoplazmě.

5.2. Inhibice HO zvyšuje stupeň apoptózy v prasečích oocytech během stárnutí *in vitro*

Graf 5.1. Účinek HO inhibitoru Zn-protoporfyrinu IX na prasečí oocyty během *in vitro* stárnutí ve 24 (A), 48 (B) a 72 (C) hodinách.

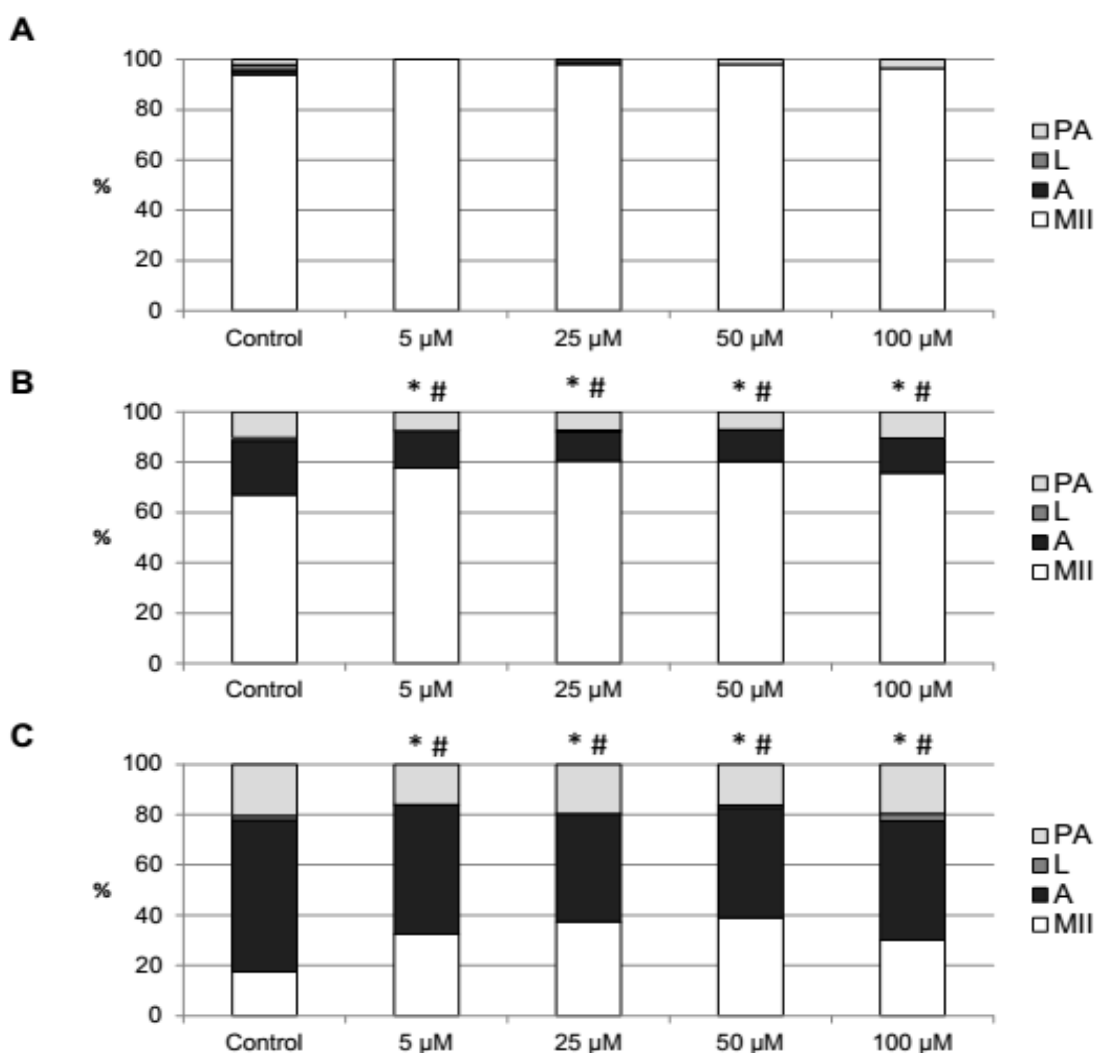


Kontrolní skupina byla kultivována pouze v médiu obsahujícím DMSO. Experimentální skupiny byly kultivované ve stejném médiu obsahujícím Zn-PP IX v koncentracích 2,5; 5 a 25 μM. Podle morfologických znaků byly stárnoucí oocyty rozděleny do následujících stádií: nepoškozené (MII), lyzované (L), partenogeneticky aktivované (PA) a oocyty podléhající apoptóze (A).

Graf 5.1.: Experiment se zaměřil na vliv inhibice enzymu HO inhibitorem Zn-protoporfyriinem IX (Zn-PP IX) během stárnutí oocytů *in vitro*. Výsledky ve skupině, kde oocyty zůstaly po dobu 24 hodin, ukázaly významný rozdíl pouze za použití nejvyšší koncentrace Zn-PP IX (25 μ M). Množství nepoškozených oocytů v porovnání s kontrolní skupinou výrazně kleslo. Po 48 hodinách stárnutí byl rozdíl zatelný ve všech koncentracích Zn-PP IX. Kleslo množství nepoškozených oocytů a zvýšilo se množství apoptotických oocytů. Nejvýraznější znaky stárnutí vykazovaly nejstarší oocyty (72 hod). Nicméně vliv inhibitoru HO na stárnutí oocytů *in vitro* nebyl významný.

5.3. Donor CO potlačuje apoptózu v prasečích oocytech během stárnutí *in vitro*

Graf. 5.2. Účinek donoru CORM-2 na prasečí oocyty během *in vitro* stárnutí po dobu 24 (A), 48 (B) a 72 (C) hodin.



Kontrolní skupina byla kultivována v médiu obsahujícím 100 μ M neaktivní formy CO donoru (iCORM-2). Experimentální skupina byla kultivována v médiu obsahujícím CORM-2 v koncentracích 5, 25, 50 a 100 μ M. Podle morfologických znaků byly stárnoucí oocyty rozděleny do následujících stádií: nepoškozené (MII), lyzované (L), partenogeneticky aktivované (PA) a oocyty podléhající apoptóze (A).

Graf 5.2.: Cílem experimentu bylo sledovat vliv oxidu uhelnatého na stárnutí prasečích oocytů. Po vystavení donoru oxidu uhelnatého byly stárnoucí oocyty morfologicky hodnoceny. Přidání CO v podobě donoru oxidu uhelnatého CORM-2 vyvolalo pokles oocytů, které vstoupily do apoptózy. Účinek CORM-2 byl oproti kontrolní skupině významný ve všech koncentracích. Snížil poměr apoptotických oocytů o 6,7-9,9 % a současně zvýšil poměr nepoškozených oocytů o 8,6-13,5 %. Jeho účinky v různých koncentracích se však významně nelišily.

6. Diskuze

Stárnutí je proces, kterým oocyt po ovulaci prochází, pokud není oplozen. Během stárnutí se zhoršuje kvalita oocyty a v oocyty jsou aktivovány signální kaskády, které jej vedou do procesu řízené buněčné smrti, apoptózy. Proces apoptózy probíhá jak v podmínkách *in vivo*, tak také v kultivačním prostředí *in vitro* (Lord and Aitken, 2013). Na proces apoptózy může mít vliv enzym hemoxygenáza. Hemoxygenázy (HO) jsou cytoprotektivní enzymy, které zabraňují poškození buňky produkcí důležité signální molekuly, oxidu uhelnatého (CO), (Zhang et al., 2003). CO spolu se sirovodíkem (H₂S) a oxidem dusnatým (NO) patří mezi gasotransmittery, což jsou endogenně produkováné plynné signální molekuly (Wang, 2010). Role H₂S a NO v prasečích oocytech již byla prozkoumána (Chmelíková et al., 2009; Nakamura et al., 2002; Nevorál et al., 2015b; Tichovská et al., 2011), ale znalosti o významu systému HO/CO na oocyt jsou zatím nedostatečné (Němeček et al., 2017). V této práci byla prokázána přítomnost obou izoform HO v prasečích oocytech a byl charakterizován účinek donoru CO na jejich stárnutí.

Metodou Western blot bylo zjištěno, že se v prasečích oocytech nachází obě izoformy enzymu HO (HO-1 a HO-2) a spolu s postupujícím stárnutím *in vitro* se zvyšuje jejich exprese. HO-1 je antioxidační enzym, jehož aktivita je stimulována zvýšeným oxidačním stresem (Maines, 1997). Za zvýšenou expresi HO-1 v prasečích oocytech během stárnutí *in vitro* je pravděpodobně zodpovědná zvyšující se hladina kyslíkových radikálů (ROS). Vysoká hladina ROS je hlavním faktorem zodpovědným za výskyt negativních známek stárnutí během stárnutí oocytů (Lord and Aitken, 2013). V experimentu byla prokázána i exprese enzymu HO-2. HO-2 produkuje CO kontinuálně, nezávisle na stresových faktorech. Spolupodílí se hlavně na vazodilataci a neurotransmisi (Zakhary et al., 1996). Výsledky experimentu ukázaly, že jsou obě izoformy HO-1 i HO-2 schopny potlačit stárnutí prasečích oocytů.

Provedené experimenty založené na imunohistochemické detekci prokázaly, že se HO-1 nachází v meioticky zralých i ve stárnoucích prasečích oocytech převážně v oblasti chromozomů. Proces stárnutí *in vitro* zvýšil expresi tohoto enzymu hlavně v cytoplazmě oocyty. Izoforma HO-2 byla lokalizována v cytoplazmě. Obě izoformy se nachází na membráně endoplazmatického retikula (Ma et al., 2004). HO-1 je lokalizována také v mikrosomech, což jsou fragmenty endoplazmatického retikula a na vnitřní membráně mitochondrií, kde se účastní regulace dýchání a s tím související regulace produkce ROS (Converso et al., 2006).

Pomocí provedených experimentů bylo prokázáno, že systém HO/CO přispívá k udržení životaschopnosti a má vliv na regulaci apoptózy u prasečích oocytů. Inhibice HO pomocí Zn-PP

IX vedla ke zvýšení poměru apoptotických oocytů. V oocytech starých 24 hodin byla znatelná inhibice ve skupině kultivované s nejvyšší koncentrací inhibitoru (25 μM). V oocytech starých 48 hodin, byl značný vliv inhibitoru ve všech testovaných koncentracích. Je pravděpodobné, že podání vysokých koncentrací inhibitoru Zn-PP IX, může navíc inhibovat syntázu oxidu dusnatého (NOS) a guanylát cyklázu (sGC), (Luo and Vincent, 1994). Přestože inhibice sGC vede k vyššímu výskytu znaků stárnutí (Goud et al., 2005), inhibice NOS naopak snižuje poměr apoptotických oocytů prostřednictvím snížení oxidačního stresu (Barroso et al., 1998). Je možné, že i když inhibitor Zn-PP IX potlačuje cytoprotektivní účinky systému HO/CO, zároveň podněcuje snížení oxidačního stresu prostřednictvím inhibice NOS.

Provedené experimenty potvrdily cytoprotektivní a antiapoptotický účinek CO na stárnutí oocytů prasete. Jako donor oxidu uhelnatého byl použit komerční donor CORM-2. CORM-2 vykazuje postupné uvolňování CO. Po přidání donoru CO CORM-2 došlo ke zvýšení procenta nepoškozených oocytů a zároveň k poklesu počtu oocytů vykazující známky řízené buněčné smrti, apoptózy. Antiapoptotický vliv CO byl poprvé popsán na fibroblastech a endoteliálních buňkách (Wang et al., 2011), naše experimenty potvrdily antiapoptotický potenciál oxidu uhelnatého také pro oocyty prasete. Antiapoptotický vliv oxidu uhelnatého může být způsoben aktivací MAPK (Zhang et al., 2003), ale přesný mechanismus účinku není znám. Navození apoptózy koreluje se zvýšením hladiny Ca^{2+} přes aktivaci CaMKII nebo kaspázy-3, čímž usnadňuje degradaci a stárnutí oocytů (Zhu et al., 2016). Je rovněž možné, že je najednou aktivováno několik signálních drah (Wang et al., 2007).

7. Závěr

Pomocí provedených experimentů byl prokázán vliv oxidu uhelnatého na proces stárnutí prasečích oocytů. Pomocí metody Western blot byly detekovány izoformy hemoxygenáz (HO-1 a HO-2) v oocytu prasete. Na základě imunohistochemické detekce byla sledována exprese těchto izoform během stárnutí oocytu. Výsledky ukázaly, že se jejich exprese s postupujícím stárnutím zvyšuje. HO-1 vykazovala expresi v oblasti chromozomů a v cytoplazmě. HO-2 byla lokalizována pouze v cytoplazmě.

Pomocí provedených experimentů bylo prokázáno, že systém HO/CO přispívá k udržení životaschopnosti a má vliv na regulaci apoptózy u prasečích oocytů. Inhibice HO pomocí Zn-PP IX vedla ke zvýšení poměru apoptotických oocytů.

Provedené experimenty také potvrdily cytoprotektivní a antiapoptotický účinek CO na stárnutí oocytů prasete. Po přidání donoru uvolňujícího oxid uhelnatý CORM-2 došlo ke zvýšení procenta nepoškozených oocytů a současně poklesl počet oocytů v apoptóze.

8. Seznam použité literatury

- Abraham N. G., Kappas A. 2008. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological reviews*. 60. 79-127.
- Acevedo C. H., Ahmed A. 1998. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesteron during pregnancy. *The journal of clinical investigation*. 101. 949-955.
- Adhikari D., Liu K. 2013. Regulation of quiescence and activation of oocyte growth in primordial follicles. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Albertini D. F., Combelles C. M. H., Benecchi E., Carabatsos M. J. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 121. 647-653.
- Albertini D. F., Dong J., Nishimori K., Kumar T. R., Lu N., Matzuk M. M. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383. 531-535.
- Albertini D.F. 1992. Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte: Interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *Bioessays*. 14. 97-103.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. ISBN: 80-902906-2-0. 630p.
- Alderton W. K., Cooper Ch. E., Knowles R. G. 2001. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochemistry*. 357. 593-615.
- Alexandreanu I. C., Lawson D. M. 2003. Heme oxygenase in the rat ovary: immunohistochemical localization and possible role in steroidogenesis. *Experimental biology and medicine*. 228. 59-63.
- André L., Gouzi F., Thireau J., Meyer G., Boissiere J., Delage M., Abdellaoui, Feillet-Coudray C., Fouret G., Cristol J. P., Lacampagne, 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. 1235-46.
- Ayer A., Zarjou A., Agarwal A., Stocker R. 2016. Heme oxygenases in cardiovascular health and disease. *Physiological reviews*. 96. 1449-1508.
 - Barroso R. P., Osuamkpe C., Nagamani M., Yallampalli C. 1998. Nitric oxide inhibits development of embryos and implantation in mice. *Molecular human reproduction*. 4. 503-507.
 - Berridge M. J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361. 315-325.
 - Bielanska-Osuchowska Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology*. 6. 161–193.
 - Black J. L., Erickson B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The anatomical record*. 161. 45-55.
 - Boehning D., Moon Ch., Sharma S., Hurt K. J., Hester L. D., Ronnett G. V., Shugar D., Snyder S. H. 2003. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron*. 40. 129-137.
 - Boehning D., Sedaghat L., Sedlak T. W., Snyder S. H. 2004. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *Journal of biological chemistry*. 279. 30927-30.
 - Bornslaeger E. A., Schultz R. M. 1985. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biology of reproduction*. 33. 698-704.
 - Bredt D. S. 2003. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *Journal of cell science*. 116. 9-15.
 - 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. 1015-26.

- Brouard S., Otterbein L. E., Anrather J., Tobiasch E., Bach F. H., Choi A. M. K., Soares M. P. 2000. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *Journal of experimental medicine*. 192. 1015-26.
- Cao X., Wu Z., Xiong S., Cao L., Sethi G., Bian J. 2017. The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling. *Biochemical pharmacology*. 149. 20-28.
- Carlsson I. B., Scott J. E., Visser J. A., Ritvos O., Themmen A. P. N., Hovatta. 2006. Human reproduction. 21. 2223-2227.
- Castrillon D. H., Miao L., Kollipara R., Horner J. W., DePinho R. A. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 301. 215-218.
- 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. 59-66.
- Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80. 259-268.
- Clark J. E., Naughton P., Shurey S., Green C. J., Johnson T. R., Mann B. E., Foresti R., Motterlini R. 2003. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circulation research*. 93. 1-9.
- Collins J. K., Jones K., T. 2016. DNA damage responses in mammalian oocytes. *Reproduction*. 152. R15-R22.
- Combelles C. M. H., Carabatsos M. J., Kumar T. R., Matzuk M. M., Albertini D. F. 2004. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular reproduction and development*. 69. 347-355.
- Conti M., Andersen C. B., Richard F., Mehats C., Chun S. Y., Horner K., Jin C., Tsafiriri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology*. 187. 153-159.

- Conti M., Hsieh M., Zamah A. M., Oh J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*. 356. 65-73.
- Converso D. P., Taillé C., Carreras M. C., Jaitovich A., Poderoso J. J., Boczkowski J. 2006. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB journal*. 20.
- Cruse I., Maines M. D. 1988. Evidence suggesting that two forms of heme oxygenase are products of different genes. *The journal of biological chemistry*. 263. 3348-53.
- Davis J. S., Weakland L. L., West L. A., Farese R. V. 1986. Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. *Biochemical journal*. 238. 597-604.
- De Felici M. 2013. Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Desmard M., Foresti R., Morin D., Dagouassat M., Berdeaux A., Denamur E., Crook S. H., Mann B. E., Scapens D., Montravers P., Boczkowski J., Motterlini R. 2012. Differential antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* by carbon monoxide-releasing molecules. *Antioxidants and redox signaling*. 16. 153-163.
- Durlinger A. L. L., Kramer P., Karels B., de Jong F. H., Uilenbroek J. T. J., Grootegoed J. A., Themmen A. 1999. Control of primordial follicle recruitment by Anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*. 140. 5789-5796.
- Durlinger A. L. L., Visser J. A., Themmen A. P. N. 2002. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*. 124. 601-609.
- Ellederova Z., Halada P., Man P., Kubelka M., Motlik J., Kovarova H. 2004. Protein patterns of pig oocytes during in vitro maturation. *Biology of reproduction*. 71. 1533-39.
- Elvin J. A., Clark A. T., Wang P., Wolfman N. M., Matzuk M. M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular endocrinology*. 13. 1035-1048.

- Elvin J. A., Clark A. T., Wang P., Wolfman N. M., Matzuk M. M. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular endocrinology*. 13. 1035-48.
- Eppig J. J. 1996. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, fertility and development*. 8. 485-489.
- Eppig J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829-838.
- Fissore R. A., Kurokawa M., Knott J., Zhang M., Smyth J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124. 745-754.
- Fulka J. Jr, First N. L., Moor R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular human reproduction*. 4. 41-49.
- Fulka J., Bradshaw J., Moor R. 1994. Meiotic cycle checkpoints in mammalian oocytes. *Zygote*. 2. 351-354.
- Gao L., Wu T., Ni X. 2016. Gas transmitters in female reproductive system. *Acta physiologica sinica*. 68. 611-620.
- Ghosh D. K., Stuehr D. J. 1995. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*. 34. 801-7.
- Gilchrist R. B., Luciano A. M., Richani D., Zeng H. T., Wang X., De Vos M., Sugimura S., Smits J., Richard F. J., Thompson J. G. 2016. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*. 152. R143-R157.
- Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349. 132-137.
- Goud A. P., Goud P. T., Diamond M. P., Abu-Soud H. M. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry*. 44. 11361-11368.
- Greenwald G. S. 1972. Of eggs and follicles. *Developmental dynamics*. 135. 1-3.

- Guglielmo M. C., Albertini D. F. 2013. The structural basis for coordinating oogenesis and folliculogenesis. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Hama N., Paliogianni F., Fessler B. J., Boumpas D. T. 1995. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *The journal of experimental medicine*. 181. 1217-1222.
- Hara M., Abe Y., Tanaka T., Yamamoto T., Okumura E., Kishimoto T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature*. 3. 1-9.
- Hayashi M., McGee E. A., Min G., Klein C., Rose U. M., van Duin M., Hsueh A. J. 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*. 140. 1236-44.
- Heikinheimo O., Gibbons W. E. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular human reproduction*. 4. 745-56.
- Heikinheimo O., Gibbons W. E. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Review. Molecular human reproduction*. 4. 745-756.
- Herlands R. L., Schultz R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte growth: Probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of experimental zoology*. 229. 317-325.
- Hirao Y., Nagai T., Kubo M., Miyano T., Miyake M., Kato S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. 100. 333-339.
- Hirshfield A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of cytology*. 124. 43-101.
- Horner K., Livera G., Hinckley M., Trinh K., Storm D., Conti M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental biology*. 258. 385-396.

- Huang D. C. S., Strasser A. 2000. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*. 103. 839-842.
- Hubbard C. J., Price J. 1988. The Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Cyclic Guanosine 3', 5'-Monophosphate on Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate-Phosphodiesterase and Resumption of Meiosis in Hamster Cumulus-Oocyte Complexes. *Biology of reproduction*. 39. 829-838.
- Hunter M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*. 5. 122-130.
- Chin D., Means A. R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Cell biology*. 10. 322-328.
- Chmelíková E., Jeřeta M., Sedmíková M., Petr J., Tůmová L., Kott T., Lipovová P., Jílek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18. 235-244.
- Chmelíková E., Sedmíková M., Petr J., Kott T., Lánská V., Tůmová L., Tichovská H., Jeřeta. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech journal of animal sciences*. 54. 137-149.
- Cho W. K., Stern S., Biggers J. D. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of experimental zoology*. 187. 383-386.
- Choi B., Pae H., Jang S., Kim Y., Chung H. 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 35. 116-126.
- Choi B., Pae H., Kim Y., Chung H. M. D. 2004. Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: Involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology*. 37. 810-823.
- Chung H., Pae H., Choi B., Billiar T. R., Kim Y. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 282. 1075-9.

- Ishida N., Tanaka K., Tamura T., Nishizawa M., Okazaki K., Sagata N., Ichihara A. 1993. Mos is degraded by the 26S proteasome in a ubiquitin-dependent fashion. *FEBS letters*. 324. 345-348.
- Jacobson M. K., Cervantes-Laurean D., Strohm M. S., Coyle D. L., Bummer P. M., Jacobson E. L. 1995. NAD glycohydrolases and the metabolism of cyclic ADP-ribose. *Biochimie*. 77. 341-344.
- Jaffrey S. R., Snowman A. M., Eliasson M. J., Cohen N. A., Snyder S. H. 1998. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*. 20. 115-124.
- Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee H., Adams G. B., Niikura Y., Tschudy K. S., Tilly J. C., Cortes M. L., Forkert R., Spitzer T., Iacomini J., Scadden D. T., Tilly J. L. 2005a. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122. 303-315.
- Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J. K., Tilly J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145-150.
- Johnson J., Skaznik-Wikiel M., Lee H., Niikura Y., Tilly J. L., Tilly J. C. 2005b. Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle*. 4:11. 1471-1477.
- Jones K. T., Lane S. I. R., Holt J. E. 2013. Start and stop signals of oocyte meiotic maturation. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Ju S., Panka D. J., Cui H., Ettinger R., El-Khatib M., Sherr D. H., Stanger B. Z., Marshak-Rothstein A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 373. 444-448.
- Kajimura M., Nakanishi T., Takenouchi T., Morikawa T., Hishiki T., Yukutake Y., Suematsu M. 2012. Gas biology: Tiny molecules controlling metabolic systems. *Respiratory physiology and neurobiology*. 184. 139-148.
- Kaláb P., Pralle A., Isacoff E. Y., Heald R., Weis K. 2006. Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature*. 440. 697-701.

- Kanatsu-Shinohara M., Schultz R. M., Kopf G. S. 2000. Acquisition of Meiotic Competence in Mouse Oocytes: Absolute Amounts of p34cdc2, Cyclin B1, cdc25C, and wee1 in Meiotically Incompetent and Competent Oocytes. *Biology of reproduction*. 63. 1610-16.
- Kim D., Yukl E. T., Moënne-Loccoz P., Montellano P. R. 2006. Fungal heme oxygenases: Functional expression and characterization of Hmx1 from *Saccharomyces cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida albicans*. *Biochemistry*. 45. 14772-80.
- Kourti M., Jiang W. G., Cai J. 2017. Aspects of carbon monoxide in form of CO-releasing molecules used in cancer treatment: More light on the way. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017: 9326454.
- Kreiser D., Kelly D. K., Seidman D. S., Stevenson D. K., Baum M., Dennery P. A. 2003. Gestational pattern of heme oxygenase expression in the rat. *Pediatric research*. 54. 172-178.
- Lamas S., Marsden P. A., Li G. K., Tempst P., Michel T. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *PNAS*. 89. 6348-52.
- Lee H. Ch., Aarhus R., Graeff R. M. 1995. Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin. *The journal of biological chemistry*. 270. 9060-66.
- Li R., Norman R. J., Armstrong D. T., Gilchrist R. B. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of reproduction*. 63. 839-845.
- Li Y., Kang H., Xu Y., Heo Y., Cui X., Kim N., Oh J. 2013. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 89. 1-7.
- Liu L., Rajareddy S., Reddy P., Du Ch., Jagarlamudi K., Shen Y., Gunnarsson D., Selstam G., Boman K., Liu K. 2007. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*. 134. 199-209.

- Long R., Salouage I., Berdeaux A., Motterlini R., Morin D. 2014. CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier. *Biochemica et biophysica acta*. 1837. 201-209.
- Lorca T., Abrieu A., Means A., Dorée M. 1994. Ca²⁺ is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase. *BBA- Molecular cell research*. 1223. 325-332.
- Lord T., Aitken R. J. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*. 146. R217-27.
- Luo D., Vincent S. R. 1994. Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo. *European journal of pharmacology: Molecular pharmacology*. 267. 263-267.
- Ma N., Ding X., Doi M., Izumi N., Semba R. 2004. Cellular and subcellular localization of heme oxygenase-2 in monkey retina. *Journal of neurocytology*. 33. 407-415.
- Maines M. D. 1997. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 37. 517-554.
- Manandhar G., Schatten H., Sutovsky P. 2005. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of reproduction*. 72. 2-13.
- Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A., Mermillod P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 57. 1523-32.
- Mattioli M., Barboni B., Bacci M. L., Seren E. 1990. Maturation of pig oocytes: Observations on membrane potential. *Biology of reproduction*. 43. 318-322.
- Mehlmann L. M. 2013. Signaling for meiotic resumption in granulosa cells, cumulus cells and oocyte. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Melley D. D., Finney S. J., Elia A., Lagan A. L., Quinlan G. J., Evans T. W. 2007. Arterial carboxyhemoglobin level and outcome in critically ill patients. *Critical care medicine*. 35. 1882-7.

- Mitra J., Schultz R. M. 1996. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *Journal of cell science*. 109. 2407-15.
- Miyano T. 2003. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*. 59. 61-72.
- Miyano T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of reproduction and development*. 51. 169-176
- Moor R. M., Dai Y., Lee C., Fulka J. Jr. 1998. Oocyte maturation and embryonic failure. *Human reproduction update*. 4. 223-236.
- Motlik J., Crozet N., Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of reproduction and fertility*. 72. 323-328.
- Motlik J., Fulka J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *The journal of experimental zoology*. 198. 155-62.
- Motta P. M., Makabe S. 1986. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three-dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. *Journal of submicroscopic cytology*. 18. 271-290.
- Motta P. M., Nottola S. A., Makabe S., Heyn R. 2000. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human reproduction*. 15. 129-147.
- Motterlini R., Clark J. E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B. E., Green C. J. 2002a. Carbon monoxide-releasing molecules characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation research*. 90. e17-e24.
- Motterlini R., Foresti R. 2017. Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules. *American journal of physiology cell physiology*. 312. C1-C12.
- Motterlini R., Gonzales A., Foresti R., Clark J. E., Green C. J., Winslow R. M. 1998. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circulation research*. 83. 568-577.

- Motterlini R., Green C. J., Foresti R. 2002b. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxidants and redox signaling*. 4. 615-624.
- Mustafa A. K., Gadalla M. M., Snyder S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Science signaling*. 2. Re 2.
- Nakamura Y., Yamagata Y., Sugino N., Takayama H., Kato H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67. 1588–1592.
- Nekola M. V., Nalbandov A. V. 1971. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biology of reproduction*. 4. 154-160.
- Němeček D., Dvořáková M., Sedmíková M. 2017. Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *International journal of biochemistry and molecular biology*. 8. 1-12.
- Nevorál J., Zamostná K., Zalmanová T., Kucerová-Chrpová V., Dvořáková M., Hosková K., Petr J. 2015b. Physiological production of hydrogen sulfide is involved in porcine oocytes maturing in vitro. *Nitric oxide*. 47. S59-S60.
- Nevorál J., Žalmanová T., Zámostná K., Kott T., Kučerová-Chrpová V., Bodart J., Gelaude A., Procházka R., Orsák M., Šulc M., Klein P., Dvořáková M., Weingartová I., Víghová A., Hošková K., Krejčová T., Jílek F., Petr J. 2015a. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric oxide*. 51. 24-35.
- Nilsson E. E., Skinner M. K. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the society for gynecologic investigation*. 8. 17-20.
- 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*. 1-2. 19-25.
- 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. 1869-1878.
- Ogawa H., Matsuzaki T., Yamamoto A., Kashiwazaki N., Kono T. 2012. Porcine nuclei in early growing stage do not possess meiotic competence in matured oocytes. *Theriogenology*. 78. 560-566.
 - 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. *Journal of cell biology*. 188. 199-207.
 - Oktay K., Briggs D., Gosden R. G. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 11. 3748-3751.
 - Oktem O., Urman B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Human reproduction*. 25. 2944-54.
 - Otsuka F., Moore R. K., Iemura S., Ueno N., Shimasaki S. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and biophysical research communications*. 5. 961-966.
 - Otsuka F., Yao Z., Lee T., Yamamoto S., Erickson G. F., Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *The journal of biological chemistry*. 50. 39523-39528.
 - Oussaid B., Mariana J. C., Poulin N., Beckers J F., Cognie Y. 1997. Effect of LH pulses during the follicular phase on developmental competence of sheep oocytes. 13th Scientific meeting, European embryo transfer association. 190.
 - Oxender W. D., Colenbrander B., van deWiel D. F. M., Wensing C. J. G. 1979. Ovarian development in fetal and prepubertal pigs. *Biology of reproduction*. 21. 715-721.
 - Packer A. I., Hsu Y. C., Besmer P., Bachvarova R. F. 1994. The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Developmental biology*. 161. 194-205.
 - Pae H., Lee Y. Ch., Jo E., Chung H. 2009. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Archives of pharmacal research*. 32. 1155-1162.

- Patwardhan V. V., Lanthier A. 1984. Cyclin GMP phosphodiesterase and guanylate cyclase activities in rabbit ovaries and the effect of in-vivo stimulation with LH. *Journal of endocrinology*. 101. 305-310.
- Peng X., Hsueh A. J. W., Lapolt P. S., Bjersing L., Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*. 129. 3200-3207.
- Pesce M., Farrace M. G., Piacentini M., Dolci S., De Felici M. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote germ cell survival by supressin programmed cell death (apoptosis). *Development*. 118. 1089-94.
- Peters H. 1976. The development and maturation of the ovary. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. 16. 271-278.
- Petr J., Chmelíková E., Tůmová L., Jeřeta M. 2007. The role of nitric oxide in parthenogenetic activation of pig oocytes: A review. *Journal of animal sciences*. 52. 363-377.
- Petr J., Rozinek J., Hruban V., Jílek F., Sedmíková M., Vaňourková Z., Němeček Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular reproduction and development*. 58. 196-204.
- Pirino G., Wescott M. P., Donovan P. J. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell cycle*. 8. 665-70.
- Poulaki V., Mitsiades C. S., Mitsiades N. 2001. The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy. *Drug resistance updates*. 4. 233-242.
- Queiroga C. S. F., Almeida A. S., Alves P. M., Brenner C., Vieira H. L. A. 2011. Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization. *BMC cell biology*. 12:10.
- Racek J. 2012. Oxid uhelnatý a sirovodík (sulfan) – vznik, metabolismus, význam pro organismus. *Labor aktuell*. 4. 4-7.
- Rebecchi M. J., Pentyala S. N. 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological reviews*. 80. 1292-1324.

- Reece O. W. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Druhé rozšířené vydání. Grada Publishing, a.s. p. 473. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Sadler T. W. Langmanova lékařská embryologie. Překlad 10. vydání. Grada Publishing, a.s. ISBN: 978-80-247-2640-3.
- Salustri A., Petrunaro S., De Felici M., Conti M., Siracusa G. 1985. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. *Biology of reproduction*. 33. 797-802.
- Sedlak T. W., Snyder S. H. 2006. Messenger molecules and cell death: therapeutic implications. *JAMA*. 295. 81-89.
- Sela-Abramovich S., Edry I., Galiani D., Nevo N., Dekel N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147. 2280-86.
- Sen N., Snyder S. H. 2010. Protein modifications involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling. *Trends in neurosciences*. 33. 493-502.
- Sher E. A., Shaklai M., Shaklai N. 2012. Carbon monoxide promotes respiratory hemoproteins iron reduction using peroxides as electron donors. *PloS One*. 7. e33039.
- Shimamoto Y., Maeda Y. T., Ishiwata S., Libchaber A. J., Kapoor T. M. 2011. Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle. *Cell*. 145. 1062-74.
- Schmidt H. H. H. W. 1992. NO, CO and OH endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS*. 307. 102-107.
- Schultz R. M., Wassarman P. M. 1977. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Journal of cell science*. 24. 167-194.
- Schuster S., Marhl M., Höfer T. 2002. Modelling of simple and complex calcium oscillations. *European journal of biochemistry*. 269. 1333-55.

- Schwarz K. R., Pires P. R., Mesquita L. G., Chiaratti M. R., Leal C. L. 2014. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*. 81. 556-564.
- Stallock J., Molyneaux K., Schaible K., Knudson M., Wylie Ch. 2003. The pro-apoptic gene Bax is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development*. 130. 6589-6597.
- Sun Q., Lai L., Bonk A., Prather R. S., Schatten H. 2001. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropines, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Molecular reproduction and development*. 59. 192-198.
- Sun Q., Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of reproduction and development*. 49. 347-359.
- Sun X., Liu Y., Yue K., Ma S., Tan J. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*. 69. 228-234.
- Tesfaye D., Gebremedhn S., Salilew-Wondim D., Hailay T., Hoelker M., Grosse-Brinkhaus Ch., Schellander K. 2018. MicroRNAs: tiny molecules with significant role in mammalian follicular and oocyte development. *Reproduction*. 155. R121-R135.
- Thaler C. D., Epel D. 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: A little dab'll do ya. *Current pharmaceutical design*. 9. 399-409.
- Tichovská H., Petr J., Chmelíková E., Sedmíková M., Tůmová L., Krejčová M., Dörflerová A., Rajmon R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. 5. 1398-1405.
- Tsafriri A., Dekel N., Bar-Ami S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *Journal of reproduction and fertility*. 64. 541-551.

- Tůmová L., Petr J., Žalmanová T., Chmelíková E., Kott T., Tichovská H., Kučerová-Chrpová V., Hošková K., Jílek F. 2013. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science*. 141. 154-163.
- Ueno S., Kurome M., Ueda H., Tomii R., Hiruma K., Nagashima H. 2005. Effects of maturation conditions on spindle morphology in porcine MII oocytes. *Journal of reproduction and development*. 51. 405-410.
- Untereiner A. A., Wu L., Wang R. 2012. The role of carbon monoxide as a gasotransmitter in cardiovascular and metabolic regulation. *Gasotransmitters: Physiology and pathophysiology*. Springer. 37-70.
- Vaccari S., Weeks J. L. II, 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. 595-604.
- Vanderhyden B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. 2006-22.
- Verlhac MH., Breuer M. 2013. Cytoskeletal correlates of oocyte meiotic divisions. *Oogenesis*. Springer. London. ISBN: 978-0-85729-826-3.
- Verlhac MH., Terret ME. 2016. Oocyte maturation and development. *F1000Research*. 5. 8p.
- Verma A., Hirsch D. J., Glatt C. E., Ronnett G. V., Snyder S. H. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*. 259. 381-384.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?. *FASEB journal*. 16. 1792-1798.
- Wang R. 2010. Hydrogen sulfide: The third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxidants and redox signaling*. 12. 1061-1064.
- Wang X., Wang Y., Kim H. P., Nakahira K., Ryter S. W. 2007. Carbon monoxide protects against hyperoxia-induced endothelial cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species formation. *The journal of biological chemistry*. 282. 1718-26.

- Wang X., Wang Y., Lee S., Kim H. P., Choi A. M. K., Ryter S. W. 2011. Carbon monoxide inhibits Fas activating antibody-induced apoptosis in endothelial cells. *Medical gas research*. 1:8.
- Wartenberg H. 1983. Germ cell migration induced and guided by somatic cell interactions. *Bibliotheca anatomica*. 24. 93-111.
- Wickramasinghe D., Albertini D. F., 1993. Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Current topics in developmental biology*. 28. 125-53.
- Wickramasinghe D., Ebert K. M., Albertini D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental biology*. 143. 162-172.
- Wilding M., Dale B. 1997. Sperm factor: what is it and what does it do?. *Molecular human reproduction*. 3. 269-273.
- Wu J., Emery B. R., Carrell D. T. 2001. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of reproduction*. 64. 375-381.
- Yang G., Wu L., Jiang B., Yang W., Qi J., Cao K., Meng Q., Mustafa A. K. Mu W., Zhang S., Snyder S. H., Wang R. 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 322. 587-590.
- Yoshimura Y., Nakamura Y., Oda T., Ando M., Ubukata Y., Karube M., Koyama N., Yamada H. 1992. Induction of meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes of rabbits by a transient increase followed by an abrupt decrease in cyclic AMP concentration. *Journal of reproduction and fertility*. 95. 803-812.
- Zakhary R., Gaine S. P., Dinerman J. L., Ruat M., Flavahan N. A., Snyder S. H. 1996. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *PNAS*. 93. 795-798.
- 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. 2011. Haem oxygenase-1 dictates

- intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The journal of pathology*. 225. 293-304.
- Zenclussen M. L., Casalis P. A., Jensen F., Woidacki K., Zenclussen A. C. 2014. Hormonal fluctuations during the estrous cycle modulate heme oxygenase-1 expression in the uterus. *Frontiers in endocrinology*. 5. 32.
 - Zenclussen M. L., Jensen F., Rebelo S., El-Mousleh T., Casalis P. A., Zenclussen A. C. 2012. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization, and corpora lutea maintenance. *American journal of reproductive immunology*. 67. 376-382.
 - Zhang X., Shan P., Otterbein L. E., Alam J., Flavell R. A., Davis R. J., Choi A. M. K., Lee P. J. 2003. Carbon monoxide inhibition of apoptosis during ischemia-reperfusion lung injury is dependent on the p38 mitogen-activated protein kinase pathway and involves caspase 3. *The journal of biological chemistry*. 278. 1248-1258.
 - Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO journal*. 20. 6008-6016.
 - Zhu J., Lin F., Zhang J., Lin J., Li H., Li Y., Tan X., Tan J. 2016. The signaling pathways by which the Fas/FasL system accelerates oocyte aging. *Aging*. 8. 291-303.
 - Zhu J., Zhang J., Li H., Wang T., Zhang Ch., Luo M., Tan J. 2015. Cumulus cells accelerate oocyte ageing by releasing soluble Fas ligand in mice. *Scientific reports*. 5. 8683.
 - Zhu W., Wilks A., Stojiljkovic I. 2000. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the hemO gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *Journal of bacteriology*. 182. 6783-90.