

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv gasotransmiteru oxidu uhelnatého na expanzi kumulu
během meiotického zrání prasečích oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Alena Makovičková

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

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv gasotransmiteru oxidu uhelnatého na expanzi kumulu během meiotického zrání prasečích oocytů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Podpis autora práce:.....

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce Ing. Tereze Krejčové a Ing. Janu Nevoralovi za cenné rady, připomínky, podporu a trpělivost.

SOUHRN

Reprodukční biotechnologické postupy často závisí na dostatku kvalitních oocytů. Kvalita oocytů je dána korektním průběhem meiotického zrání a expanzí kumulárních buněk, ke které během meiotického zrání dochází. Oba tyto děje reguluje řada klíčových faktorů, mezi nimiž jsou mnohé protein-kinázy a další signální molekuly. Mezi signální molekuly řadíme také skupinu plyných látek, tzv. gasotransmiterů. Do této skupiny patří sulfan, oxid dusnatý a oxid uhelnatý. O úloze oxidu uhelnatého v regulaci reprodukčních procesů, včetně regulace procesu meiotického zrání, toho není mnoho známo. V reprodukční soustavě samic je v současné době prokázáno jeho zapojení v regulaci průběhu estrálního cyklu, porodu a laktace. Oxid uhelnatý vzniká v organismu pomocí enzymu hem oxygenázy (HO) z hemoglobinu a lze předpokládat, že oxid uhelnatý bude sehrávat regulační úlohu i v procesu meiotického zrání a expanze kumulárních buněk prasečích oocytů v podmínkách *in vitro*.

Cílem diplomové práce bylo ověřit tuto hypotézu. Pro její ověření byly provedeny experimenty, ve kterých byly prasečí oocyty během meiotického zrání vystaveny působení inhibitoru hem oxygenázy Zn-protoporfyrinu IX (Zn-PP IX) nebo donoru oxidu uhelnatého trikarbonyl-RuCl (TRIK-RuCl).

Inhibice hem oxygenázy u prasečích oocytů neměla žádný vliv na průběh meiotického zrání na rozdíl od donoru oxidu uhelnatého, který průběh meiotického zrání účinně inhiboval. U takto ošetřených oocytů docházelo k potlačení přechodu oocytů z prvního meiotického dělení do druhého meiotického dělení. Při sledování expanze kumulárních buněk bylo zjištěno, že inhibice hem oxygenázy měla za následek zvýšenou produkci hyaluronové kyseliny a tím i vyšší intenzitu expanze kumulárních buněk, zatímco donor oxidu uhelnatého měl vliv opačný.

Výsledky experimentů potvrzují hypotézu, že se oxid uhelnatý zapojuje do regulace meiotického zrání a expanze kumulárních buněk prasečích oocytů.

Klíčová slova: gasotransmitery, kumulární buňky, kumulární expanze, oocyt, oxid uhelnatý

SUMMARY

Reproductive biotechnological processes often depend on a sufficient quantity and quality of oocytes. The quality of oocytes depends on the correct course of meiotic maturation and cumulus cell expansion, which occurs during meiotic maturation. Both of these events regulate a number of key factors, among which are many protein kinases and other signaling molecules. Between signaling molecules is a group of gaseous substances called gasotransmitters. This group includes hydrogen sulfide, nitric monoxide and carbon monoxide. There is not much known about the role of carbon monoxide in the regulation of reproductive processes, including the regulation of meiotic maturation process. It has been proved that the carbon monoxide participates in regulation of the estrous cycle, parturition and lactation in females. Carbon monoxide is produced in the body by the enzyme heme oxygenase (HO) from hemoglobin, and it can be assumed that carbon monoxide plays a regulatory role in the process of meiotic maturation and cumulus cell expansion of porcine oocytes *in vitro*.

The purpose of this thesis was to test this hypothesis. In order to verify this hypothesis, experiments were performed where the porcine oocytes during meiotic maturation were exposed to heme oxygenase inhibitor Zn-protoporphyrin IX (Zn-PP IX) or carbon monoxide donor tricarbonyl-RuCl (TRICK-RuCl).

Inhibition of heme oxygenase in pig oocytes had no effect on the course of meiotic maturation, unlike carbon monoxide donor, that has effectively inhibited meiotic maturation. As a result of this, the oocytes were suppressed in the transition from the first meiotic division in the second meiotic division. When monitoring cumulus cell expansion it was found that heme oxygenase inhibition resulted in increased production of hyaluronic acid and higher intensity expansion of cumulus cells, while carbon monoxide donor had the opposite effect.

The results from these experiments confirm the hypothesis that carbon monoxide is involved in the regulation of meiotic maturation and cumulus cell expansion of porcine oocytes.

Keywords: gasotransmitters, carbon monoxide, oocyte, cumulus cells, cumulus expansion.

OBSAH

1	Úvod	1
2	Hypotéza a cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Oogeneze	3
3.1.1	Oogeneze během fetálního vývoje	3
3.1.2	Oogeneze - fáze růstu a zrání	4
3.2	Regulace meiotického zrání.....	7
3.2.1	Vápenaté kationty	7
3.2.2	cAMP (cyklický adenosinmonofosfát).....	7
3.2.3	MPF (M-phase/maturation promoting factor)	8
3.2.4	MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase	9
3.3	Gasotransmitery	11
3.3.1	Oxid dusnatý.....	11
3.3.2	Sulfan.....	12
3.3.3	Oxid uhelnatý	13
3.4	Folikulogeneze	15
3.5	Kumulární expanze.....	18
4	Materiál a metodika	21
5	Výsledky.....	24
5.1	Vliv Zn-PP IX na meiotické zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	24
5.2	Vliv TRIK-RuCl na meiotické zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	25
5.3	Vliv Zn-PP IX na kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů (COCs) <i>in vitro</i>	27
5.4	Vliv TRIK-RuCl na kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů (COCs) <i>in vitro</i>	28
6	Diskuze	31
7	Závěr.....	34
8	Literatura	35
9	Seznam příloh.....	46

1 ÚVOD

V současné době zaznamenávají reprodukční biotechnologie intenzivní rozvoj. Tyto biotechnologie se využívají v chovu a šlechtění hospodářských zvířat a současně nacházejí uplatnění v humánní reprodukci.

Pro další rozvoj reprodukčních biotechnologií je nezbytný dostatečný počet kvalitních oocytů, které jsou schopné úspěšného oplození a vývoje v nového jedince. Pro rozlišení kvalitních oocytů je potřeba znalostí fyziologických procesů probíhajících v oocytu, zejména meiotického zrání. Kvalita oocytů je determinována také intenzitou kumulární expanze. Studium molekulárních mechanismů a vlivů vybraných faktorů na meiotické zrání prasečích oocytů a kumulární expanzi lze docílit vyšší úspěšnosti reprodukčních biotechnologií používaných v chovech hospodářských zvířat. Prase lze současně využít jako vhodný model pro aplikaci poznatků do humánní medicíny.

Předpokládá se, že meiotické zrání oocytů a kumulární expanze mohou regulovat také gasotransmitery. Gasotransmitery jsou jednoduché molekuly plynů endogenního původu. Mezi gasotransmitery patří sulfan, oxid dusnatý a oxid uhelnatý (CO).

CO je ve vysokých koncentracích znám jako jedovatý plyn, vznikající například nedokonalým spalováním paliv. Exogenní CO se váže v organismu na hemoglobin a tím brání přenosu kyslíku do tkání. Během endogenní produkce je CO uvolňován ve výrazně nižších koncentracích, které v organismu plní fyziologické funkce.

CO vzniká v buňkách pomocí hem oxygenázy z hemoglobinu a takto vzniklý plyn se podílí na transdukcii buněčného signálu v nervové soustavě, cévní soustavě a reprodukční soustavě samců i samic.

U samic CO ovlivňuje estrální cyklus, porod i laktaci. CO je aktivní např. ve vaječnicích, kde se podílí na produkci steroidních hormonů. Dosud nebyla studována úloha gasotransmiteru CO v procesu meiotického zrání a kumulární expanze prasečích oocytů kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

2 HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Hypotézou této diplomové práce je, že signální molekula oxidu uhelnatého se zapojuje do regulace průběhu meiotického zrání a expanze kumulárních buněk prasečích oocytů kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Cílem práce je ověřit tuto hypotézu prostřednictvím vhodných experimentů zaměřených na vliv inhibitoru hem oxygenázy a donoru oxidu uhelnatého na meiotické zrání a expanzi kumulárních buněk prasečích oocytů po 48 hodinové kultivaci *in vitro*.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Oogeneze

Oogeneze je proces, při kterém vznikají mitotickým a meiotickým dělením oplození schopné oocyty. Pro meiotické dělení je během procesu oogeneze specifický 1. meiotický blok v profázi prvního meiotického dělení a 2. meiotický blok v metafázi druhého meiotického dělení (Wassarman, 1988). U prasat začíná meiotické dělení ve vaječnicích mezi 40. a 50. dnem vývoje samičího embrya (Black and Erickson, 1968). Meiotické dělení oocyty dává vzniknout pouze jednomu zralému oocytu, na rozdíl od meiotického dělení probíhajícího v procesu spermatogeneze.

Kvalita oocytů dospělé prasnice je definována jako schopnost oplození tohoto oocyty a vývoje do životaschopného jedince (Hunter, 2000). Kvalita oocytů je závislá již na vývoji vaječníků během fetálního vývoje (Sarraj and Drummond, 2012). Vaječníky se zakládají během embryogeneze a v pubertě je jejich vývoj dokončen. Produkce zralých oocytů během reprodukčního života je závislá na dostatečné hormonální aktivitě (Vanderhyden, 2002).

3.1.1 Oogeneze během fetálního vývoje

Oocyty se vyvíjejí z primordiálních zárodečných buněk - PGCs (van den Hurk and Zhao, 2005). PGCs jsou jediné buňky samice, které po diferenciaci podstupují meiotické dělení a organismus samice tak může produkovat specializované buňky pro pohlavní rozmnožování – oocyty (Lawson and Hage, 1994). PGCs se zakládají v blízkosti žlutkového vřívku (Ginsburg et al., 1990; Saitou et al., 2002). V rané embryogenezi se PGCs mitoticky dělí (Ginsburg et al., 1990) a migrují do genitální lišty (Sládeček, 1986; Sarraj and Drummond, 2012).

Genitální lišta je základem pro gonády obou pohlaví, v dalším vývoji se u samic determinuje na samičí gonády – vaječníky. Zde se PGCs stále mitoticky dělí a kolonizují vyvíjející se fetální vaječníky. Tato část oogeneze se nazývá fáze množení zárodečných buněk. Výsledkem této fáze je velké množství oogonií, které se diferencovaly z (Sládeček, 1986).

U prasat je ve 20. dni embryogeneze přítomno cca 5 000 PGCs, mitózou tento počet vzrůstá během následujících 30-ti dní na 1 100 000 oogonií. Mitotická aktivita se postupně snižuje a některé buňky zanikají. Konečný počet oogonií při narození samice je asi 500 000 (Black and Erickson, 1968).

V minulosti převládal jednoznačný názor, že mitotická aktivita zárodečných buněk probíhá pouze během fetálního vývoje samice, to znamená, že se samice rodí s konečným počtem oocytů. Gilbert (2000) předpokládal, že množství oogonií a jejich schopnost se dělit i v postnatálním životě se odvíjí od druhu organismu. U druhů, které produkují tisíce oocytů během života, se oogonie množí i postnatálně, zatímco u druhů produkujících nižší počet oocytů se oogonie dělí pouze v prenatalní období a jejich počet je omezený, tedy po celý život jedince stejný. V nedávné době došlo k objevu mitoticky aktivních zárodečných buněk ve vaječnicích dospělých myší. Ze zásoby těchto kmenových buněk může docházet k částečné obnově oogonií ještě i v dospělosti samice (Johnson et al., 2004).

3.1.2 Oogeneze - fáze růstu a zrání

3.1.2.1 Meiotické dělení oocytů

PGCs a z nich vzniklé oogonie mají dvě sady chromozómů a je nezbytné, aby tyto diploidní buňky podstoupily redukční dělení, meiózu. Meióza jsou dvě po sobě jdoucí dělení označovaná jako heterotypické a homeotypické.

Při prvním meiotickém dělení jsou zdvojené chromatidy homologních chromozómů rozděleny do dvou dceřiných buněk – každá buňka má jednu kopii zdvojeného chromozómu (2n). Ve druhém dělení jsou sesterské chromatidy rozděleny do dalších dvou buněk a vznikají čtyři haploidní buňky (n). V procesu oogeneze z původní jedné oogonie meiotickým dělením nevznikají čtyři identické buňky, ale jeden oocyt a dvě až tři pólová tělíska, která mají minimální množství cytoplasmy (Sládeček, 1986).

Před meiotickým dělením replikují oogonie svoji DNA. Po této replikaci je každý chromozóm tvořen dvěma sesterskými chromatidami (Sládeček, 1986). Oogonie vstupují do meiotického dělení, které je záhy zastaveno ve stádiu diplotene profáze prvního meiotického dělení, ještě ve fetálním období samice (Wassarman, 1988; Gilbert, 2000). Zárodečné buňky ve stádiu diplotene profáze I se označují jako primární oocyty. Primární oocyty jsou charakteristické strukturou svého jádra, které se označuje jako zárodečný váček, germinal

vesicle - GV (Motlík and Fulka, 1976). První meiotický blok primárních oocytů se také označuje jako diktyotenní blok a přetrvává až do pohlavní dospělosti jedince a vytvoření Graafova folikulu (Yanagimachi, 1988).

3.1.2.2 *Fáze růstu*

Fáze růstu probíhá během diktyotenního bloku (Wassarman, 1988; Palma et al., 2012). Růst oocyty je vyvolán působením gonadotropinů, steroidních hormonů a růstových faktorů po dosažení pohlavní dospělosti samice. Hormony působí prostřednictvím folikulárních buněk, které tak plní úlohu mezibuněčné signalizace. Folikulární buňky se zároveň podílí na poskytování živin oocyty prostřednictvím mezibuněčných spojů typu gap junctions (Yanagimachi, 1988).

Diktyotenní blok je charakterizován vysokou transkripční aktivitou (Zybina and Zybina, 1992). Transkripční aktivita je nezbytná pro fázi růstu, kdy primární oocyty mnohonásobně zvětšují svoji velikost a zároveň dochází k intenzivní syntéze RNA, zejména rRNA (Sládeček, 1986). Následuje proteosyntéza, která je nezbytná pro růst, množení organel, úspěšné meiotické zrání, oplodnění a embryonální vývoj. Z důvodu zvyšující se proteosyntézy je nezbytný nárůst počtu ribozómů. Přestože jejich množství vzrůstá, koncentrace v rostoucím objemu cytoplasmy klesá. Celkový počet ribozómů se ke konci fáze růstu snižuje, a to v důsledku nižší intenzity proteosyntézy (Wassarman, 1988; Sánchez and Smitz, 2012).

Během fáze růstu dochází ke změnám u jednotlivých organel. Množící se mitochondrie mění svůj tvar z podlouhlého na oválný a mění se i vnitřní uspořádání krist. Pro Golgiho komplex v rostoucím oocyty jsou typické rozsáhlé změny vnitřních struktur. Tyto transformace směřují ke zvýšení aktivity celého komplexu membrán. Golgiho aparát produkuje například glykoproteiny a kortikální granula. Glykoproteiny se shromažďují okolo celého oocyty a vytváří jemná filamenta, která jsou základem pro obal oocyty, tzv. *zonu pellucidu*. V průběhu fáze růstu se filamenta formují do husté a silné sítě. Oocyt je tak *zonou pellucidou* oddělen od buněk folikulu, ovšem komunikace je stále zachována (Wassarman, 1988).

Dokončit meiotické dělení je schopný pouze plně dorostlý oocyt. Během růstu oocyty nabývají tzv. meiotické kompetence. Pro její získání je nezbytné nasyntetizování dostatečného množství regulačních faktorů, důležitých pro průběh meiotického zrání, např. cyklin B,

cyklin-dependentní kinázy 1 (CDK 1), MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Meiotická kompetence je hlavní podmínkou pro úspěšné dokončení meiotického zrání až do metafáze druhého meiotického dělení - MII (Yanagimachi, 1988; Wassarman and Albertini, 1994; Evans and Robinson, 2011).

3.1.2.3 *Fáze zrání*

Oocyt s meiotickou kompetencí vystupuje z diktyotenního bloku po hormonální stimulaci a pokračuje až do MII, kde se meióza opět zastaví. Tento úsek vývoje oocytu se označuje jako meiotické zrání (Evans and Robinson, 2011).

I během meiotického zrání dochází k řadě morfologických a fyziologických změn v oocytu a také u kumulárních buněk, které oocyt obklopují. Mezi nejvýznamnější změny oocytu patří rozpad jaderné membrány zárodečného váčku (Germinal Vesical Breakdown, GVBD) (Motlík and Fulka, 1978; Němcová et al., 2007). Následně dochází ke kondenzaci chromatinu, oddělení homologních chromozómů a vydělení prvního pólového tělíska. Takový oocyt dosahuje metafáze II, kde je meiotické dělení spontánně zablokováno. K úplnému dokončení meiotického dělení dochází až po oplození anebo po partenogenetické aktivaci oocytu (Wassarman et al., 1976). Po stimulaci gonadotropiny kumulárním buňky syntetizují kyselinu hyauronovou. Díky akumulaci kyseliny hyaluronové se zvětšuje extracelulární matrix a kumulární obal oocytu zvětšuje svůj objem. Dochází tak ke kumulární expanzi (Němcová et al., 2007).

In vitro meiotické zrání prasečího oocytu začíná spontánně po uvolnění oocytu z prostředí folikulu (Wassarman et al., 1976). Oocyty dosahují MII stádia s mnohem vyšší úspěšností, pokud jsou kultivovány s kumulárními buňkami (Cross and Brinster, 1970; Bing et al., 2002).

Oocyt v MII je *in vivo* uvolněn z folikulu v procesu zvaném ovulace. Po ovulaci je zralý oocyt zachycen nálevkou vejcovodu a ještě ve vejcovodu je oplozen spermií. Po aktivaci oocytu spermií se dokončuje druhé meiotické dělení a vyděluje se druhé pólové tělísko (Wassarman, 1988; Hunter, 2000; Němcová 2007). V některých případech vznikají tři pólová tělíska, a to v případě rozdělení prvního pólového tělíska (Sládeček, 1986).

V procesu meiotického zrání se uplatňuje mnoho buněčných posílů a protein-kináz, které představují klíčové faktory regulující průběh meiotického zrání oocytů.

3.2 Regulace meiotického zrání

Aktivita regulačních faktorů a jejich dynamika je důležitá pro úspěšné dokončení meiotického zrání a pro časný embryonální vývoj. Mezi důležité faktory regulující meiotické zrání oocytů patří vápenaté kationty, cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), MPF (Maturation promoting factor), MAPK.

3.2.1 Vápenaté kationty

Vápenaté kationty jsou důležitým buněčným poslem, který transdukuje buněčný signál pomocí proteinů, které se označují jako Ca^{2+} -dependentní. Tyto proteiny mění po interakci s Ca^{2+} svoji konformaci a tím mění i svou aktivitu (Alberts et al., 1998).

Během meiotického zrání hladina vápenatých kationtů kolísá. Nízká koncentrace vápenatých kationtů zvyšuje hladinu cAMP a brání tím GVBD, naopak rostoucí extracelulární koncentrace vápenatých kationtů inhibuje účinek cAMP. Tato inhibice cAMP umožňuje vystoupení oocytu z diktyotenního bloku a pokračování vývoje do metafáze II (Wassarman, 1988; Horner et al., 2003). Přesto nejsou vápenaté kationty zcela nezbytné pro GVBD. Ukázalo se totiž, že působení inhibitorů transmembránových proteinů pro vápenaté kationty, tetracainu a verapamilu, nemá žádný vliv na GVBD. Naopak nepostradatelnou úlohu má extracelulární vápník při dokončení prvního meiotického dělení, kdy vzniká první pólové tělísko. Použití alespoň jednoho z inhibitorů způsobí nižší úspěšnost meiotického dělení (Paleos and Powers, 1981).

Po oplození spermií se v oocyту zvyšuje koncentrace intracelulárního vápníku uvolňováním z endoplazmatického retikula. Uvolněné vápníkové kationty aktivují vápník vázající protein kalmodulin (CaM) a ten následně aktivuje CaM-dependentní kinázu (CaMKII). CaMKII v myších oocytech patří mezi regulátory snižující aktivitu MPF.

3.2.2 cAMP (cyklický adenosinmonofosfát)

cAMP je syntetizován z ATP pomocí adenylát-cyklázy v kumulárních buňkách. Aktivita adenylát-cyklázy závisí na aktivaci G-proteinu extracelulárními signály (Wassarman, 1988; Alberts et al., 1998).

Vysoká koncentrace cAMP je zodpovědná za udržení oocytu v diktyotenním bloku a brání předčasnému spuštění meiotického zrání. Znovuzahájení meiózy v podmínkách *in vivo*

je závislé na poklesu koncentrace cAMP (Wassarman, 1988). K inaktivaci adenylát-cyklázy a snížení koncentrace cAMP dochází po stimulaci oocyty gonadotropiny (Dekel et al., 1979), vliv na úbytek cAMP v oocyty má také přerušení spojů gap junctions (Wassarman, 1988; Liang et al., 2007b).

Na přítomnosti cAMP závisí aktivita cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA). Aktivní PKA se podílí na defosforylaci a inaktivaci klíčových faktorů meiotického zrání. Až pokles koncentrace cAMP a aktivity PKA umožňuje fosforylaci těchto faktorů a znovuzahájení meiotického zrání (Dekel, 1996).

Pokles koncentrace cAMP spouští syntézu některých proteinů důležitých pro meiotické zrání oocyty, například mos a cyklin B (Liang et al., 2007b). cAMP se tedy podílí na GVBD oocyty a znovuzahájení meiotického zrání.

3.2.3 MPF (M-phase/maturation promoting factor)

MPF se skládá ze dvou podjednotek: katalytické podjednotky – cyklin-dependentní kinázy CDK 1 ($p34^{cdc2}$) a regulační podjednotky - cyklinu B (Izumi and Maller, 1991). Enzymatickou aktivitu má pouze kináza asociovaná s cyklinem B.

V plně dorostlém oocyty, který je schopen vystoupit z prvního meiotického bloku, je vysoká hladina neaktivního pre-MPF, pre-MPF je fosforylován na Thr14 a Tyr15 a tím inhibován (Fulka et al., 1998; Hagting et al., 1999). Inhibiční fosforylaci MPF katalyzují kinázy Wee1 a Myt1 (Fattaey and Booher, 1997). Pro aktivaci pre-MPF je nezbytná aktivační defosforylace Thr14 a Tyr15 pomocí Cdc25 fosfatázy (Hagting et al., 1999) a fosforylace cyklinu B. Fosforylace cyklinu B probíhá v místech aminokyselin Ser-Pro pomocí CDK 1 nebo MAPK (Izumi and Maller, 1991; Hagting et al., 1999). Tím vzniká aktivní MPF. Na zvýšení aktivity MPF se podílí snížení koncentrace cAMP. Snížení cAMP způsobuje deaktivaci protein-kinázy A (PKA), to umožní fosforylaci cdc25, která defosforyluje inhibiční fosfáty z CDK 1 (Dekel, 1996).

Aktivní MPF je schopný dále fosforylovat Cdc25 a defosforylovat Wee1/Myt1 a takto hladinu aktivního MPF zvyšovat efektivněji, pozitivní zpětnou vazbou. Cdc25 lze aktivovat také pomocí polo-like kinázy 1 (Plk 1), která zároveň deaktivuje Wee1/Myt1 (Qian et al., 2001).

MPF dále fosforyluje zejména jaderné laminy a histony v jádře. Tato fosforylace způsobí rozpad jaderné membrány a spiralizaci chromozómů. Dále je MPF zodpovědný za reorganizaci mikrotubulů, která vede k vytvoření meiotického vřeténka (Alberts et al., 1998). V prasečích oocytech je aktivní MPF nezbytný pro GVBD (Fulka et al., 1998).

Nejvyšší aktivity dosahuje MPF v metafázi prvního i druhého meiotického dělení. Během druhého meiotického bloku je hladina aktivního MPF vysoká. Nejnižší aktivita MPF je během anafáze I a telofáze I a následně aktivita opět vzrůstá (Wassarman and Albertini, 1994).

Koncentrace cyklinu kolísá, na rozdíl od CDK 1, která je přítomna v téměř konstantní koncentraci (Alberts et al., 1998). Za kolísání koncentrace cyklinu B a nepřímo za přítomnost aktivního MPF odpovídají Ca^{2+} ionty a anafázi podporující komplex (APC/C - Anaphase Promoting Complex/Cyclosome). APC/C katalyzuje asociaci cyklinu B a ubiquitinu, tzv. polyubiquitinaci. Takto označený cyklin B je následně degradován v proteazomu 26S. Tím dochází k deaktivaci MPF a ocyt pokračuje do anafáze I a telofáze I (Irniger, 2002).

Vysokou hladinu aktivního MPF v MII bloku udržuje cytostatický faktor (CSF), který brání degradaci cyklinu B pomocí inaktivace již zmiňovaného APC/C (Norbury and Nurse, 1990). CSF je nezbytný pro potlačení spontánní partenogenetické aktivace (Suzuki et al., 2010). Součástí CSF je endogenní inhibitor meiózy (Emi2) a mos. Emi2 udržuje ocyt v MII bloku do oplození nebo jeho aktivace inhibicí ubikvitin-ligázy a APC/C a potlačením destrukce cyklinu B. APC/C je degradován také v důsledku růstu koncentrace Ca^{2+} iontů. Uvolnění oocytu z MII dochází po inaktivaci CSF, kdy se APC/C aktivuje a degraduje cyklin B (Suzuki et al., 2010).

3.2.4 MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase

MAPK zahrnují množství regulačních faktorů buněčného cyklu. Mezi tyto faktory patří stresem aktivované kinázy p38 a JNK a extracelulárními signály aktivované kinázy ERK1 a ERK2. ERK1/2 jsou také označovány jako MAPK1/2. MAPK je regulována signální kaskádou, kde MAPK je fosforylována MAPKK (také MEK). MAPKK aktivuje MAPK až po vlastní fosforylaci, za kterou je zodpovědná MAPKKK (také Mos). MAPKKK je produktem proto-onkogenu c-mos (Seger and Krebs, 1995).

MAPK je syntetizována v rostoucích oocytech, ale k aktivaci dochází až během meiotického zrání v přilehlých kumulárních buňkách. U hlodavců je to přibližně dvě hodiny po spontánním GVBD vyvolaným zvýšením hladiny MPF (Liang et al., 2007b). U prasat dochází k aktivaci MAPK také po GVBD, avšak v případě injekce aktivní MAPK do oocyty dochází k časnějšímu nástupu GVBD. MAPK není tedy pro GVBD zcela nezbytná, ale svým působením podporuje zvýšení hladiny MPF (Ohaski et al., 2003). Po aktivaci je MAPK aktivní až do stádia MII, kde se podílí na MII bloku. Po oplození nebo aktivaci oocytů aktivita MAPK a CDK 1 klesá (Verlhac et al., 1996).

MAPK má důležitou úlohu při tvorbě a udržení normální morfologie meiotického vřeténka a kondenzace chromozómů, při reaktivaci MPF po MII a také při udržování bloku v MII prostřednictvím stabilizace hladiny cyklinu B (Araki et al., 1996; Sun et al., 1999). MAPK dokonce brání oocyt před oplozením spermií nebo před stimulací k partenogenezi (Jones, 2004).

Tato kaskáda kináz je důležitá i pro GVBD vyvolaným prostřednictvím gonadotropinů. Preovulační vlna luteinizačního hormonu (LH) působí na folikulární a kumulární buňky, kde skrz receptory, mnohem rychleji než folikulostimulační hormon (FSH), aktivuje například cAMP, PKA a MAPK. Celý řetězec končí aktivací MPF a následným zahájením meiózy (Su et al., 2003; Liang et al., 2007b). LH stimuluje produkci progesteronu a estradiolu. To, který hormon se bude právě syntetizovat, určuje kaskáda MAPK (Liang et al., 2007b).

MAPK pozitivně ovlivňuje i kumulární expanzi, podílí se zejména na syntéze hyaluronové kyseliny (Su et al. 2003).

Na regulaci meiotického zrání se podílí řada dalších faktorů, mezi kterými je mnoho dosud plně nepoznaných. Mezi molekuly s fyziologickým účinkem a schopností regulovat reprodukční procesy, včetně meiotického zrání, patří gasotransmitery.

3.3 Gasotransmitery

Skupina plynů endogenního původu podílejících se na fyziologických procesech buněčnou signalizací, je označována jako gasotransmitery. Gasotransmitery jsou lipofilní látky prostupující přes cytoplasmatickou membránu do buňky, nepotřebují tedy na buňce receptory. Cílové proteiny signálních molekul gasotransmiterů se tedy nacházejí zejména v cytoplasmě buněk (Wang, 2002; Mustafa et al., 2009; Stárka, 2009).

Společné vlastnosti gasotransmiterů (Wang, 2002):

- 1) Malé a jednoduché molekuly plynů.
- 2) Schopnost volně procházet skrz buněčné membrány a nevyužívat membránových receptorů.
- 3) Endogenní produkce ve fyziologických koncentracích je katalyzována enzymy.
- 4) Definovatelný specifický vliv na fyziologii organismu.
- 5) Gasotransmitery jsou součástí signálních kaskád.

Mezi gasotransmitery v současné době řadíme sulfan, oxid dusnatý a oxid uhelnatý (Wang, 2002). Je všeobecně známo, že všechny tři plyny jsou toxické pro organismus, avšak v posledních letech jsou na buněčné úrovni studovány jejich fyziologické funkce v organismu. Oxid uhelnatý, oxid dusnatý a sulfan se podílejí například na vazodilataci, nervovém vzruchu, obranyschopnosti a mají vliv i na reprodukci. U samců například gasotransmitery, zejména oxid uhelnatý a oxid dusnatý, působí na erekci penisu, spermatogenezi a motilitu spermií. U samic ovlivňují oogenezi, ale i stahy dělohy během březosti (Šmelcová and Tichovská, 2011).

Prvním plynem definovaným jako gasotransmitter byl oxid dusnatý, jehož vliv na procesy v organismu je v současné době nejvíce prozkoumán.

3.3.1 Oxid dusnatý

Na vzniku oxidu dusnatého (NO) v buňkách se podílí aminokyselina L-Arginin a enzym NO-syntáza (NOS), který se vyskytuje ve třech izoformách – eNOS, nNOS, iNOS (Moncada et al., 1991). Místo vzniku NO je závislé na katalyzující NOS, které byly poprvé popsány v buňkách endotelu cév (eNOS), nervové tkáni (nNOS) a imunitním systému (iNOS)

(Mustafa et al., 2009). Vzniklý NO se v průběhu několika vteřin přeměňuje na další sloučeniny, jako jsou nitrity a nitráty (Wang, 2002).

NO je součástí signální kaskády, kde aktivuje solubilní guanylát-cyklázu (sGC) v cílové tkáni. Aktivní sGC stimuluje tkáň k produkci cyklického 3', 5' - guanosinmonofosfátu (cGMP), který v organismu zastává funkci druhého posla. Vysoká koncentrace cGMP způsobuje relaxaci hladkého svalstva. Relaxaci lze pozorovat například při dilataci cév a při potlačení kontrakcí děložního svalstva březí dělohy (Moncada et al., 1991; Buhimschi et al., 1996). NO dále působí jako neurotransmiter, reguluje krevní tlak a uplatňuje se v procesu zánětu a potlačování bakteriálních infekcí (Mustafa et al., 2009). Molekula NO se uplatňuje také v reprodukčních procesech samců i samic (Šmelcová and Tichovská, 2011).

V reprodukční soustavě NO reguluje hladiny některých hormonů, např. testosteronu a hormonu uvolňující luteinizační hormony (LHRH), které jsou důležité pro spermatogenezi, ale také pro projevy sexuálního chování (Davidoff et al., 1997). Vlivem tohoto gasotransmiteru dochází k dilataci cév, podílí se tedy i na erekci penisu (Ignarro et al., 1990), dále působí na motilitu a dozrávání spermií. Nefyziologicky vysoká koncentrace NO snižuje pohyblivost spermií, která má za následek neplodnost samce (Rosselli et al., 1995). Také u samic oxid dusnatý reguluje produkci některých hormonů a má vliv na růst a zrání, ovulaci oocytů i kontraktilitu dělohy (Buhimschi et al., 1996; Jablonka-Shariff and Olson, 1998).

Klíčová role NO v reprodukci samic je právě ve vaječnicích při regulaci meiotického zrání oocytů. Bylo prokázáno, že absence NO ve vaječnicích způsobuje omezený růst a vývin vaječníků, menší počet ovulovaných oocytů i jejich kvalitu ve srovnání s přítomností fyziologické koncentrace NO. Stejně tak oocyty myši s genetickým knock-outem pro NOS vykazovaly abnormality během svého vývoje a většina nebyla schopná ovulace (Jablonka-Shariff and Olson, 1998). U ovčích kumulo-oocytárních komplexů inhibice NOS potlačuje kumulární expanzi (Amale et al., 2011).

3.3.2 Sulfan

Sulfan (H_2S) je bezbarvý, silně zapáchající, neurotoxický plyn, vznikající rozkladem bílkovin. Přesto, pokud je přítomen v organismu ve fyziologických koncentracích, funguje v buněčné signalizaci a je považován za gasotransmiter (Wang, 2002).

V organismu H₂S vzniká z L-cysteinu, na jehož konverzi se podílí tři enzymy: cystathionin β-syntasa (CBS), cystathionin γ-lyasa (CSE) a 3merkaptosulfurtransferasa (3-MPST). Fyziologická koncentrace H₂S zvyšuje koncentraci cAMP, která ovlivní aktivitu PKA (Kimura, 2000). Degradace H₂S probíhá v mitochondriích oxidací nebo v cytosolu methyloací, metabolity jsou následně vyloučeny ledvinami, gastrointestinálním traktem nebo plícemi (Stárka, 2009).

V organismu H₂S vykonává svou funkci zejména v centrální nervové soustavě, kardiovaskulárním systému a svalstvu (Stárka, 2009). H₂S hraje důležitou roli v reprodukci samců i samic. U samců se podílí na erekci penisu. U samic má účinky na estrální cyklus, dělohu a vývoj placenty (Guzmán et al., 2006). Ukázalo se, že u samic je H₂S nezbytný pro meiotické zrání oocyty *in vivo* a *in vitro*. Nepřímým ovlivněním aktivity PKA indukuje H₂S nástup GVBD (Liang et al., 2007a).

3.3.3 Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý vzniká v organismu pomocí enzymu hem oxygenázy (HO) při rozkladu hemoglobinu. HO katalyzuje oxidaci hemu, při které vzniká CO a biliverdin (Tenhunen et al., 1969). HO se vyskytuje ve 3 izoformách HO-1, HO-2 a HO-3 (Wu and Wang, 2005).

HO-1 se také označuje jako *heat-shock* protein (hsp32) (Keyse and Tyrrell, 1989) nebo jako inducibilní HO (Maines, 1988). Inducibilní proto, že existuje mnoho podnětů, které mnohonásobně zvýší aktivitu této HO, např. ionty kovů a hormony (Maines, 1988). HO-1 je syntetizována zejména buňkami, které podléhají buněčnému stresu (Wu and Wang, 2005).

HO-2 je produkována ve více buňkách. HO-2 je tzv. konstitutivní forma hem oxygenázy, která na rozdíl od HO-1 na určité stimuly zvýšením činnosti nereaguje (Maines, 1988; Wu and Wang, 2005).

K aktivitě HO je nezbytná činnost NADPH-cytochrom P-450 reduktázy, která přemění cytochrom P-450 a získá nezbytné elektrony pro HO. Tento proces umožní vznik pouze dvou produktů – biliverdinu a CO. Naopak aktivitu HO blokují inhibitory, např. Zn-, Sn-, Cr-, Cd- a Mn-protoporfyriny. Tato blokáce vede ke komplikacím v buněčném metabolismu (Maines, 1988).

Vzniklý CO reguluje zánětlivé procesy, ochraňuje buňky před tepelným šokem, reguluje uvolňování neurotransmiterů a podílí se na procesech učení a paměti (Wu and Wang,

2005). CO je schopný, stejně jako NO, navodit vasodilataci cév (Wang, 1998) a jeho produkce je výhodná i pro boj proti bakteriím (Burnett et al., 1998).

Molekula CO je zapojena do signální dráhy cGMP, kde cílem CO je solubilní guanylát-cykláza (sGC), která následně stimuluje produkci cGMP (Morita et al. 1995). Tato signální dráha cGMP ovlivňuje také tkáň reprodukční soustavy, například způsobuje relaxaci hladké svaloviny močové trubice samců při ejakulaci a působí na hladkou svalovinu dělohy (Burnett et al., 1998; Cella et al., 2006). Lze předpokládat, že CO reguluje produkci cGMP také v procesu meiotického zrání a kumulární expanze.

CO se podílí na hormonální regulaci reprodukčních funkcí, na oogenezi (Verma et al., 1993) a spermatogenezi (Ozawa et al., 2002). Během spermatogeneze produkce CO Leydigovými a Sertoliho buňkami ochraňuje spermie před stresovými faktory, jako jsou volné radikály. CO má pozitivní vliv i na motilitu spermií (Shiraishi and Naito, 2005) a erekci pyje. Některé medikamenty na podporu erekce vychází z účinků CO (Shamloul and Wang, 2006). Nízká produkce tohoto gasotransmiteru může vést až k neplodnosti nebo k neschopnosti rozmnožovat se.

Přítomnost HO byla u samic prokázána v březí i nebřezí děloze, placentě a aktivní je i ve vaječnicích. Ve vaječnicích byla prokázána přítomnost HO-1 a HO-2 v thekálních buňkách, granulózních buňkách a ve žlutém tělísku. HO-2 dokonce i v ovariálním stromatu. CO má významnou roli při syntéze steroidních hormonů. Působí pozitivně zejména na produkci progesteronu a estradiolu. Endogenní CO má vliv i na průběh estrálního cyklu, porodu i laktace (Alexandreaanu and Lawson, 2003). Ukázalo se, že samice s nízkou hladinou HO-1 produkují po hormonální stimulaci méně oocytů, které často nejsou schopné oplození (Zenclussen et al., 2012). Účinky CO na meiotické zrání, ani na folikulogenezi a kumulární expanzi nejsou dosud zcela objasněné.

3.4 Folikulogeneze

Proces oogeneze těsně souvisí s folikulogenezí a je závislý na metabolické aktivitě folikulárních buněk, které obklopují oocyt a oddělují ho od ovariálního stromatu a ostatních folikulů bazální laminou (Merchant, 1975; Eppig et al. 1992).

Během folikulogeneze se folikulární buňky množí, postupně se soustředí do několika vrstev (Sládeček, 1986) a podléhají morfologickým a funkčním změnám. Změny jsou vyvolány endokrinními a parakrinními stimuly. Biochemické stimuly ovlivňují i vývoj oocytu, na který granulózní buňky těsně přiléhají. Specifické stimuly umožní vytvořit specifické prostředí pro růst, zrání a ovulaci oocytů (Amsterdam and Rotmensch, 1987). Folikulární tekutina nedorostlých folikulů zabraňuje předčasnému meiotickému zrání oocytu prostřednictvím vysoké koncentrace inhibičních faktorů, jako je cAMP a PKA. (Yang et al., 1993; Qian et al., 2003).

Již po dosažení 1. meiotického bloku se objevuje okolo primárních oocytů jedna vrstva somatických buněk mezodermálního původu, které vznikají v embryonálním základu gonád. Tyto somatické buňky se označují jako folikulární buňky (Kurilo, 1980; Sládeček, 1986; Wassarman, 1988) a pokládají se za prekurzory granulózních buněk (Pepling and Spradling, 1998). Komplex primárního oocytu a přilehlých folikulárních buněk tvoří základ primárního folikulu. Tyto folikuly jsou základní jednotkou vaječnicků a v každém folikulu se nachází pouze jeden oocyt (Wassarman, 1988).

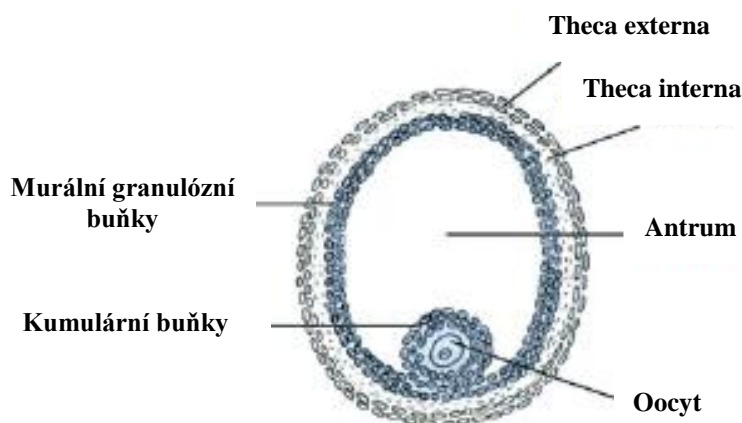
Podle množství, velikosti a morfologie folikulárních buněk se rozlišuje několik typů folikulů: primordiální, primární, sekundární, terciární folikul a Graafův neboli předovulační (Aerts and Bols, 2010). Vývoj primárních folikulů do předovulačních je pomalý proces, u prasat trvá více než 80 dní (Morbeck et al., 1992). Ovšem ne všechny primordiální folikuly projdou celým vývojem, většina v jakémkoli stádiu podlehne programované buněčné smrti (apoptóze).

Nerostoucí primordiální folikul je tvořen jednou vrstvou plochých pregranulózních buněk a uvnitř se nachází nezralý oocyt, který vstupuje do profáze prvního meiotického dělení (Fortune et al., 1998). U prasete se primordiální folikul objevuje kolem 68. dne po fertilizaci (Oxender et al., 1979).

Folikul začíná růst po přechodu do dalšího stádia, tzv. primární folikul, ve kterém je oocyt v diktyotenním bloku. Během tohoto přechodu folikulární buňky prochází již zmíněnou proliferací a diferenciací, buňky získávají kubický tvar (van Wezel and Rodgers, 1996).

Granulózní buňky se dál množí a postupně vytvářejí další vrstvy, folikul tak roste. Folikul s dvěma vrstvami granulózniých buněk se označuje jako sekundární. V tomto typu folikulu lze již pozorovat mezi oocytem a granulózniimi buňkami začínající tvorbu *zony pellucidy* (Fair, 2003).

Po dosažení konečné velikosti oocytu a mnohonásobném zmnožení folikulárních buněk, se začínají formovat dutinky uvnitř folikulu. Takový folikul se označuje jako terciární. Dutinky se postupně zvětšují až se spojí v jednu dutinu (*antrum*), která je vyplněná folikulární tekutinou. Před ovulací se folikul s již vytvořenou dutinou nazývá Graafův folikul (Aerts and Bols, 2010). Granulózní buňky zde vytváří tři vrstvy: murální buňky (poblíž *theca folliculi*), granulóznií buňky a kumulární buňky. Každá vrstva je tvořena několika řadami buněk (viz. obr. č. 1) (Ježová et al., 2001). Oocyt v Graafově folikulu je v antrální dutině bezprostředně obklopen kumulárními buňkami: vnitřní vrstva *corona radiata* a vnější vrstva *cumulus oophorus* (Wassarman, 1988). Meiotické zrání oocytů je zastaveno v metafázi druhého meiotického dělení (Ježová et al., 2001).



Obrázek 1: Vrstvy folikulárních buněk v Graafově folikulu

(Převzato a upraveno podle Aerts and Bols, 2010).

Kumulární buňky, jako jediné buňky ve folikulu, přímo komunikují s oocytem prostřednictvím mezibuněčných spojů typu gap junctions. Tyto spoje jsou i mezi ostatními folikulárními buňkami. Folikul je tedy komplex buněk spojených mezi sebou navzájem a současně s oocytem buněčnými spoji typu gap junctions. Tyto spoje jsou tvořeny převážně proteinem konexinem (Anderson and Albertini, 1976; Lampe and Lau, 2000). Buněčné spoje umožňují interakce, včetně mezibuněčné signalizace, pomocí přenosu malých regulačních molekul a metabolitů do oocytu a jsou důležité pro regulaci meiotického zrání oocytu. Tyto interakce řídí změny v organizaci a diferenciaci folikulárních buněk a zároveň ovlivňují zejména fáze růstu a zrání oocytu. Komunikace pomocí spojů gap junctions je obousměrná, to znamená, že i procesy ve folikulu jsou ovlivňovány vývojem oocytu (Eppig et al., 1992; Eppig et al., 1998; Davachi et al., 2012).

Folikulogeneze končí ovulací Graafova folikulu. Pro ovulaci jsou nezbytné změny kumulárních buněk vedoucí k jejich expanzi. Část granulózních buněk Graafova folikulu se po ovulaci transformuje na buňky žlutého tělíska (Amsterdam and Rotmensch, 1987).

3.5 Kumulární expanze

Kumulární expanze je posledním krokem diferenciaci kumulárních buněk a zároveň nezbytným přípravným krokem pro ovulaci savčího oocyty (Šutovský et al., 1994; Ježová et al., 2001). Kumulární expanze vede k oddělení kumulo-oocytárního komplexu (COCs) od folikulu. Expandovaná vrstva kumulárních buněk dává vyšší šanci ovulovanému oocyty k zachycení nálevkou vejcovodu. Dále je kumulární obal oocyty a jeho expanze důležitý pro selekci spermií a úspěšné oplodnění (Dekel et al., 1979) a zároveň slouží jako jedna z bariér proti polyspermii (Tesařík and Kopečný, 1986). Kumulární expanze je současně pozitivně korelována s úspěšností časného vývoje embrya (Harper and Brackett, 1993). Kumulární expanze je tak hodnotným ukazatelem vývojové kompetence oocyty a slouží jako marker kvality oocyty pro *in vitro* oplodnění (Qian et al., 2003).

Kumulární expanze je výsledkem zvýšené syntézy a ukládání glykosaminoglykanů, zejména kyseliny hyaluronové, do extracelulární matrix kumulárních buněk. Zvýšené ukládání způsobuje cytoskeletární přestavbu, zvětšení kumulárního obalu, prostorovou izolaci samotných kumulárních buněk, které se zároveň prodlužují a postupně přerušují komunikace mezi oocytem a folikulem. Přerušováním spojů gap junctions dochází i k ukončení přenosu inhibičních molekul mezi granulózními buňkami a oocytem a díky tomu může dojít k znovuzahájení meiotického zrání (Dekel et al., 1979; Šutovský et al., 1994). K přerušování spojů gap junctions je zapotřebí fosforylace konexinu kinázami, jako je PKA, PKC nebo MAPK (Lampe and Lau, 2000).

Kumulární expanze v podmínkách *in vivo* je odpovědí kumulo-oocytárního komplexu na ovulační vlnu gonadotropinů. V podmínkách *in vitro* je kumulární expanze vyvolána FSH, aktivací regulačních faktorů zvyšujících hladinu cAMP, růstových faktorů IGF (*Insulin-like Growth Factor*) a EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Ježová et al., 2001; Němcová et al., 2007; Bagg et al., 2009; Yamashita et al., 2009).

FSH vyvolává přes G-proteiny aktivaci adenylát-cyklázy, to vede ke zvýšení koncentrace cAMP v kumulárních buňkách. cAMP pak aktivuje PKA, která pozitivně reguluje produkci hyaluronové kyseliny (Němcová et al., 2007). cAMP dále aktivuje MAPK, která je nezbytná jak pro GVBD, tak pro kumulární expanzi. FSH i LH stimulují expresi klíčových genů *Has2* a *Ptgs2*. Tyto geny zodpovídají za normální průběh kumulární expanze (Su et al., 2003).

Růstové faktory jako EGF a IGF, vyskytující se ve folikulární tekutině, působí pozitivně na kumulární expanzi u prasete. Zejména EGF výrazně podporuje syntézu HA u dorostlých folikulů. IGF v interakci s FSH způsobuje větší expanzi kumulárních buněk v porovnání s kultivací samotného FSH a kumulo-oocytárních komplexů (Procházka et al., 2003; Němcová et al., 2007).

Produkovaná kyselina hyaluronová se váže na receptory CD44, které jsou na kumulárních buňkách během meiotického zrání oocyty. Interakce mezi CD44 a kyselinou hyaluronovou je známa zejména při kumulární expanzi a meiotickém zrání oocyty. Další účinky kyseliny hyaluronové nejsou dosud objasněny. Bylo zjištěno, že CD44 z *in vitro* zrajících COCs má nižší schopnost navázat na sebe kyselinu hyaluronovou. Nedostatečné množství kyseliny hyaluronové může ovlivnit meiotické zrání oocyty a tím snížit jeho další vývoj a schopnost oplození (Yokoo et al., 2007).

U krys a myši je kumulární expanze *in vitro* závislá na přítomnosti oocyty, který produkuje *Cumulus Expansion Enabling Factor* (CEEF), stimuluje kumulární expanzi (Eppig et al., 1993). CEEF je aktivován po stimulaci FSH (Eppig et al., 1993; Nagyová et al., 1999).

CEEF produkovaný kumulo-oocytárním komplexem není nutný pro kumulární expanzi prasete (Procházka et al., 1998). CEEF je také syntetizován v kumulárních a murálních buňkách (Nagyová et al., 1999).

Existuje několik metod hodnocení kumulární expanze. Původní metodou je subjektivní pozorování, kdy se hodnotí tři stupně kumulární expanze: 1) celková expanze (expandují všechny vrstvy kumulárních buněk); 2) částečná expanze (vnitřní vrstva kumulárních buněk zůstane na oocyty); 3) nulová kumulární expanze (Amale et al., 2011). V některých studiích bylo použito pěti stupňů kumulární expanze: 0 - nulová expanze; +1 - oddělení pouze vnější vrstvy kumulárních buněk; +2 - expanze vnější vrstvy kumulárních buněk a vnější části cumulus oophorus; +3 - téměř celá expanze, ale bez *corona radiata*; +4 - kompletní kumulární expanze (Downs, 1989). Kumulární expanzi lze posuzovat i podle množství využitého prekurzoru [³H] glukosaminu pro syntézu kyseliny hyaluronové. Tento prekurzor je označen radioaktivní látkou (Nagyová et al., 1999).

Předpokládáme, že kumulární expanzi je možné hodnotit podle produkce kyseliny hyaluronové. Kyselina hyaluronová je hlavní komponenta extracelulární matrix

expandovaných kumulárních buněk. Ke stanovení obsahu HA lze využít například imunologickou metodu ELISA (Kongtawelert and Ghosh, 1990). Tato metoda nebyla dosud použita pro měření koncentrace HA v COCs a pro stanovení intenzity kumulární expanze.

4 MATERIÁL A METODIKA

Pro experimenty byly použity prasečí oocyty získané aspirací z vaječníků. Vaječníky pocházely z prepubertálních prasniček a byly dováženy z jatek ve fyziologickém roztoku 0,9 % chloridu sodného o teplotě 39 °C.

Kultivace oocytů

Aspirace folikulů o velikosti 3 - 5 mm byla provedena injekční stříkačkou a jehlou 20G. Ze získané folikulární tekutiny byly pro experimenty použity pouze oocyty s kompaktní vrstvou kumulárních buněk a nepoškozenou cytoplazmou.

Kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány v kultivačním médiu (složení média tab. 1). Připravené kultivační médium bylo přefiltrováno do 100 ml skleněné baňky a bylo přidáno 20 mg/ml růstových proteinů (telecí sérum). Obohacené kultivační médium bylo před použitím temperováno minimálně 30 minut v termoboxu (39 °C, 5 % CO₂). Krátce před použitím bylo do 1 ml média přidáno 0,3 ml růstových hormonů P.G.600, 13.5 IU eCG: 6.6 IU hCG/ml (Intervet, Holland).

Tabulka 1: Složení kultivačního média.

SLOŽKY	MNOŽSTVÍ
médium M199 ¹	100 ml
NaHCO ₃	273 mg
Laktát vápenatý	60 mg
Pyruvát sodný	25 mg
HEPES	150 mg
Gentamicin	2,5 mg

¹Life Technologies, Paisley, Skotsko

V takto připraveném médiu byly COCs kultivovány v podmínkách *in vitro* po 48 hodin do stádia metafáze 2. meiotického dělení (MII). Kultivace probíhala ve sterilních

Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Denmark) v podmínkách řízené atmosféry při teplotě 39 °C a atmosféře 5 % CO₂ ve směsi se vzduchem.

Kultivace COCs s inhibítorem hem oxygenázy

Vliv endogenní produkce oxidu uhelnatého byl studován prostřednictvím inhibitoru hem oxygenázy Zn-protoporfyriu IX (Zn-PP IX), který byl přidán do kultivačního média v koncentracích 1 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM a 25 μM. Kontrolní skupinou byly oocyty kultivované v čistém kultivačním médiu bez přídavku Zn-PP IX.

Kultivace COCs s donorem oxidu uhelnatého

Vliv gasotransmiteru oxidu uhelnatého byl studován prostřednictvím donoru trikarbonyl-RuCl (TRIK-RuCl), který byl přidán do kultivačního média v koncentraci 50 μM. Kontrolní skupinou byly oocyty kultivované v čistém kultivačním médiu bez přídavku TRIK-RuCl.

Fixace a barvení oocytů

Po kultivaci byly protahováním skrz tenkostěnnou kapiláru odstraněny z kumulo-oocytárních komplexů kumulární buňky. Následně se oocyty fixovaly v roztoku etanolu a 100 % kyseliny octové v poměru 3:1. Po 24 hodinách fixace se oocyty obarvily 1 % roztokem orceinu (viz. tab. 2).

Tabulka 2: Příprava roztoku orceinu pro barvení oocytů

Orcein²	2,0 g
Citrát sodný	1,0 g
Kyselina octová 50 %	100 ml

² Sigma Aldrich, USA

Podle stavu chromatinu se pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse) hodnotily fáze meiotického zrání: GV - (*germinal vesical*) zárodečný váček;

LD – (*late diakinesis*) pozdní diakineze; MI – metafáze prvního meiotického dělení; AITI - přechod z anafáze do telofáze MI; MII - metafáze druhého meiotického dělení.

Měření kumulární expanze stanovením obsahu HA

Pomocí tenké kapiláry byly z oocytů odstraněny expandované kumulární buňky a okolní extracelulární hmota a pro kontrolu samovolného uvolňování HA do okolního prostředí během kultivace COCs v podmínkách *in vitro* byl odebrán vzorek kultivačního média pro pozdější analýzu. Následně byly kumulární buňky a extracelulární hmota vystaveny 2 hodiny proteolytickému štěpení prostřednictvím 30 μ l roztoku proteázy z *Aspergillus oryzae* a PBS (Phosphate Buffered Saline; ředěno v poměru 1:100) a poté další 3 hodiny štěpení 30 μ l roztoku proteázy z *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Denmark) a PBS (ředěno v poměru 1:100), kultivace probíhaly při 45 °C. Během těchto kultivací se HA uvolňovala do roztoku proteáz, který byl následně centrifugován při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut. Po té byl odpipetován supernatant (buněčný lyzát kumulárních buněk). V odebraném supernatantu a ve vzorku kultivačního média byla spektrofotometricky měřena koncentrace HA pomocí QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay (Biotech, USA) při 450 nm podle přiloženého protokolu. Výsledné koncentrace HA byly odečteny pomocí kvadratické křivky. Hodnoty koncentrace HA byly vztaženy ke kontrolní skupině a vyjádřeny relativně.

Statistická analýza

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

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv Zn-PP IX na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv inhibitoru hem oxygenázy na meiotické zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách. Jako inhibitor HO byl použit Zn-protoporfyrin IX (Zn-PP IX) o koncentraci: 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM . Kontrolní skupina oocytů byla kultivována v čistém médiu.

Bylo zjištěno, že inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX statisticky významně neovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů. Pouze u koncentrace 5 μM byl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu oocytů, které dosáhly stádia MII. Je patrné, že 5 μM Zn-PP IX mírně potlačuje přechod mezi prvním a druhým meiotickým dělením a dosažení MII (viz. tab. 3).

Tabulka 3: Vliv inhibitoru hem oxygenázy Zn-PP IX na průběh meiotického zrání *in vitro*.

Oocyty získané aspirací z vaječníků prepubertálních prasnic byly kultivovány v podmínkách *in vitro* v kultivačním médiu obohaceném o telecí sérum, růstové hormony a inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX. Zn-PP IX byl přidán v koncentracích: 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM . Kontrolní skupina oocytů byla kultivována v čistém médiu, tj. bez přidaného inhibitoru Zn-PP IX. Po 48 hodinové kultivaci byla fáze meiotického zrání hodnocena podle stavu chromatinu.

Koncentrace Zn-PP IX	Stádium meiotického zrání (% \pm SD)					n
	GV	LD	MI	AITI	MII	
Kontrola	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,8 \pm 0,4 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	99,2 \pm 0,4 ^a	260
1,0 μM	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,4 ^a	100
2,5 μM	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	2,9 \pm 0,4 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	97,1 \pm 0,4 ^a	140
5 μM	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	5,0 \pm 0,4 ^b	0,0 \pm 0,0 ^a	95,0 \pm 0,4 ^b	120
10 μM	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	3,6 \pm 0,4 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	96,4 \pm 0,4 ^a	140
25 μM	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	100,0 \pm 0,4 ^a	100

GV- podíl oocytů ve stádiu zárodečného vřetka; LD – podíl oocytů ve stádiu pozdní diakinexe; MI podíl oocytů ve stádiu metafáze I; AITI – podíl oocytů ve stádiu anafáze I/telofáze I; MII - podíl oocytů ve stádiu metafáze II; n - absolutní počet oocytů použitých v experimentu. ^{a, b, c} Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentální skupinou pro každé stádium meiotického zrání ($p < 0,05$).

5.2 Vliv TRIK-RuCl na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv donoru oxidu uhelnatého trikarbonyl-RuCl (TRIK-RuCl) na meiotické zrání prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti 50 μ M TRIK-RuCl. Kontrolní skupinou byly oocyty kultivované v čistém médiu.

Bylo zjištěno, že 50 μ M TRIK-RuCl statisticky významně potlačuje meiotické zrání a dosažení metafáze II (88 vs. 74 %). 17,4 % oocytů kultivovaných s TRIK-RuCl přetrvává v metafázi I a 7,4 % ve stádiu AITI (viz. tab. 4).

Tabulka 4: Efekt donoru oxidu uhelnatého TRIK-RuCl na průběh meiotického zrání *in vitro*.

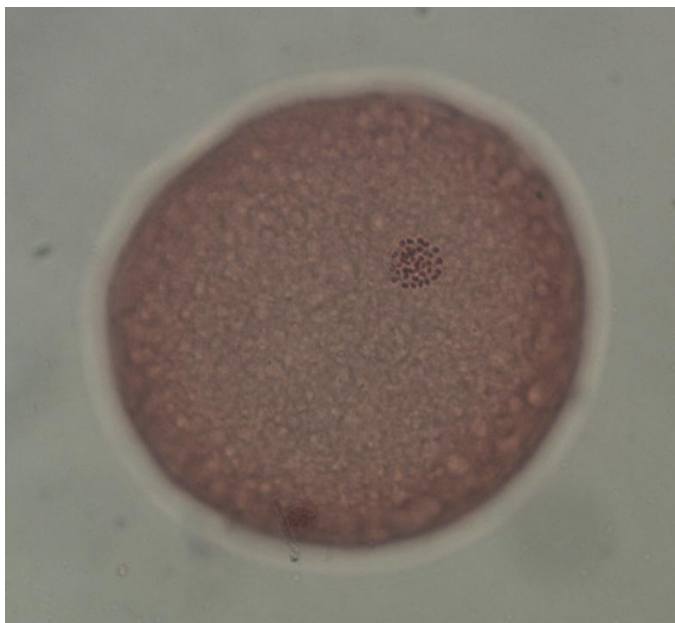
Oocyty byly kultivovány v podmínkách *in vitro* v kultivačním médiu obohaceném o telecí sérum, růstové hormony a donor oxidu uhelnatého TRIK-RuCl. TRIK-RuCl byl přidán v koncentraci 50 μ M. Kontrolní skupina oocytů byla kultivována v čistém médiu, tj. bez přidaného donoru TRIK-RuCl. Po 48 hodinové kultivaci byla hodnocena fáze meiotického zrání podle stavu chromatinu.

Stádium meiotického zrání (% \pm SD)						n
Koncentrace TRIK-RuCl	GV	LD	MI	AITI	MII	
0 μ M	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	7,1 \pm 0,4 ^a	5,1 \pm 0,4 ^a	87,9 \pm 0,4 ^a	99
50 μ M	0,0 \pm 0,0 ^a	0,8 \pm 0,3 ^a	17,4 \pm 0,3 ^b	7,4 \pm 0,3 ^a	74,4 \pm 0,3 ^b	121

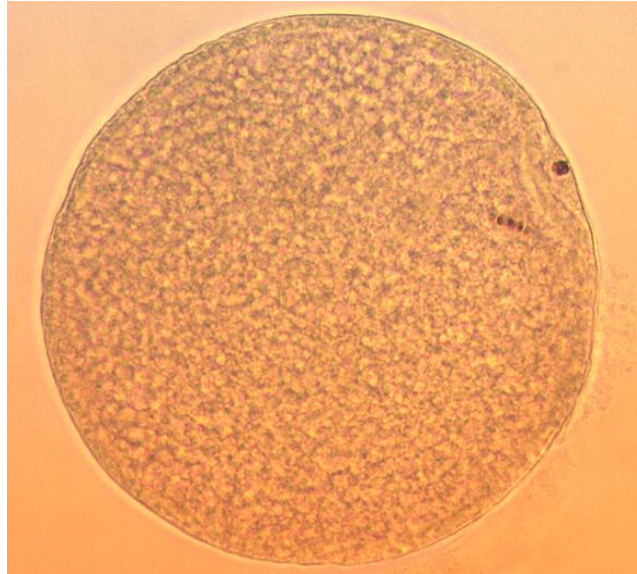
GV- podíl oocytů ve stádiu zárodečného vajíčku; LD – podíl oocytů ve stádiu pozdní diakineze; MI podíl oocytů ve stádiu metafáze I; AITI – podíl oocytů ve stádiu anafáze I/telofáze I; MII - podíl oocytů ve stádiu metafáze II; n - absolutní počet oocytů použitých v experimentu. ^{a, b, c} Statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a experimentální skupinou pro každé stádium meiotického zrání ($p < 0,05$).



Obrázek 2: Prasečí oocyt bez kumulárních buněk ve stádiu GV.



Obrázek 3: Prasečí oocyt bez kumulárních buněk v metafázi prvního meiotického dělení (MI)



Obrázek 4: Prasečí oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení (MII)

5.3 Vliv Zn-PP IX na kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů (COCs) *in vitro*

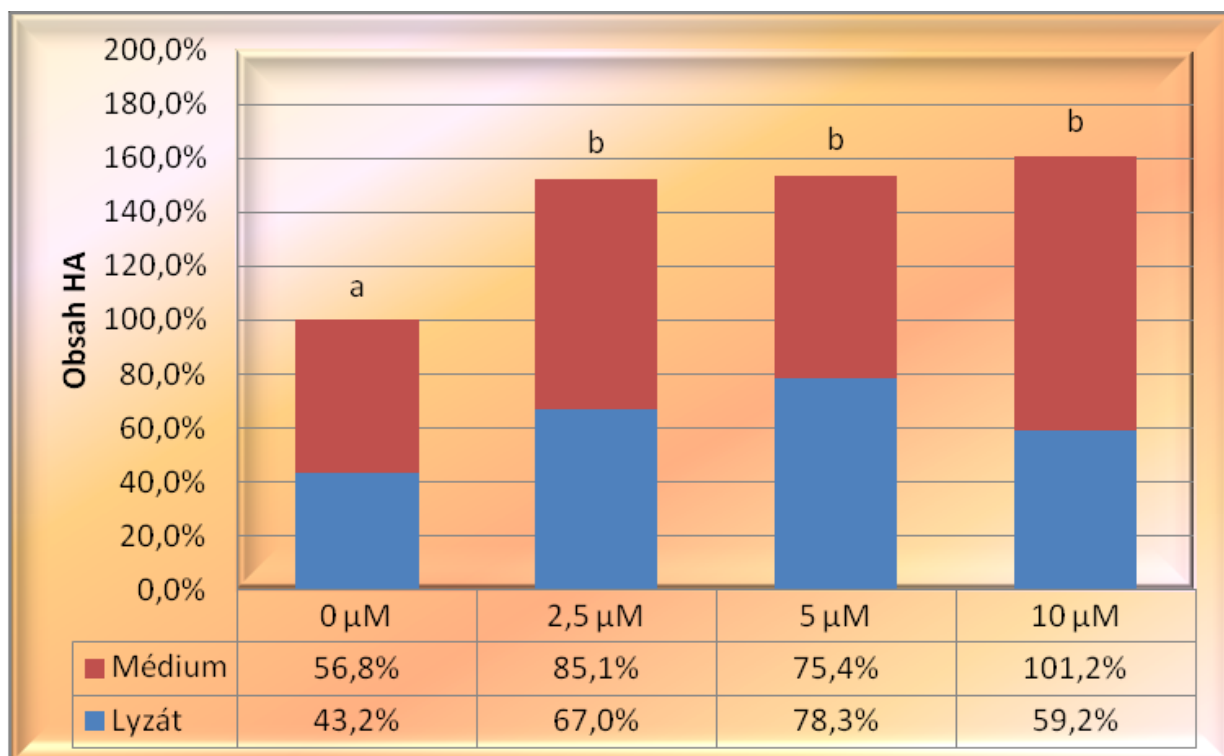
Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv inhibitoru hem oxygenázy Zn-PP IX na kumulární expanzi prasečích COCs v *in vitro* podmínkách. V pokusu byly použity koncentrace inhibitoru Zn-PP IX 2,5 μM , 5 μM a 10 μM . Kontrolní skupinou byly COCs kultivované v čistém médiu. Obsah hyaluronové kyseliny (HA) v pokusné skupině byl vztažen ke kontrolní skupině.

Bylo zjištěno, že produkce HA se významně zvyšuje se vzrůstající koncentrací přidaného Zn-PP IX. Obsah HA se změnil jak v lyzátu kumulárních buněk, tak v kultivačním médiu. Produkce HA vzrostla o 52,1 % u oocytů kultivovaných s 2,5 μM Zn-PP IX a až 60,4 % u oocytů kultivovaných s 10 μM Zn-PP IX. Rozdíly v produkci HA v COCs kultivovaných s Zn-PP IX jsou v porovnání s kontrolní skupinou statisticky významné (viz. graf 1).

Graf 1: Efekt inhibitoru hem oxygenázy Zn-PP IX na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.

Kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu obohaceném o inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX o koncentracích: 2,5 μM , 5 μM a 10 μM . Kontrolní skupina COCs byla kultivována v čistém médiu. Po 48 hodinové kultivaci byly

z oocytů odstraněny expandované kumulární buňky včetně extracelulární matrix, které se vystavily proteolytickému štěpení po 2 a 3 hodiny. Během štěpení se kyselina hyaluronová uvolňovala do roztoku proteáz, který se následně centrifugoval a poté se byl odebrán vzorek buněčného lyzátu. Obsah kyseliny hyaluronové byl stanoven ve vzorku kultivačního média a v buněčném lyzátu kumulárních buněk metodou ELISA.



Lyzát – obsah HA uvolněný z buněčného lyzátu kumulárních buněk; médium – obsah HA uvolněný z COCs do kultivačního média. ^{a, b, c} Superskripty označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).

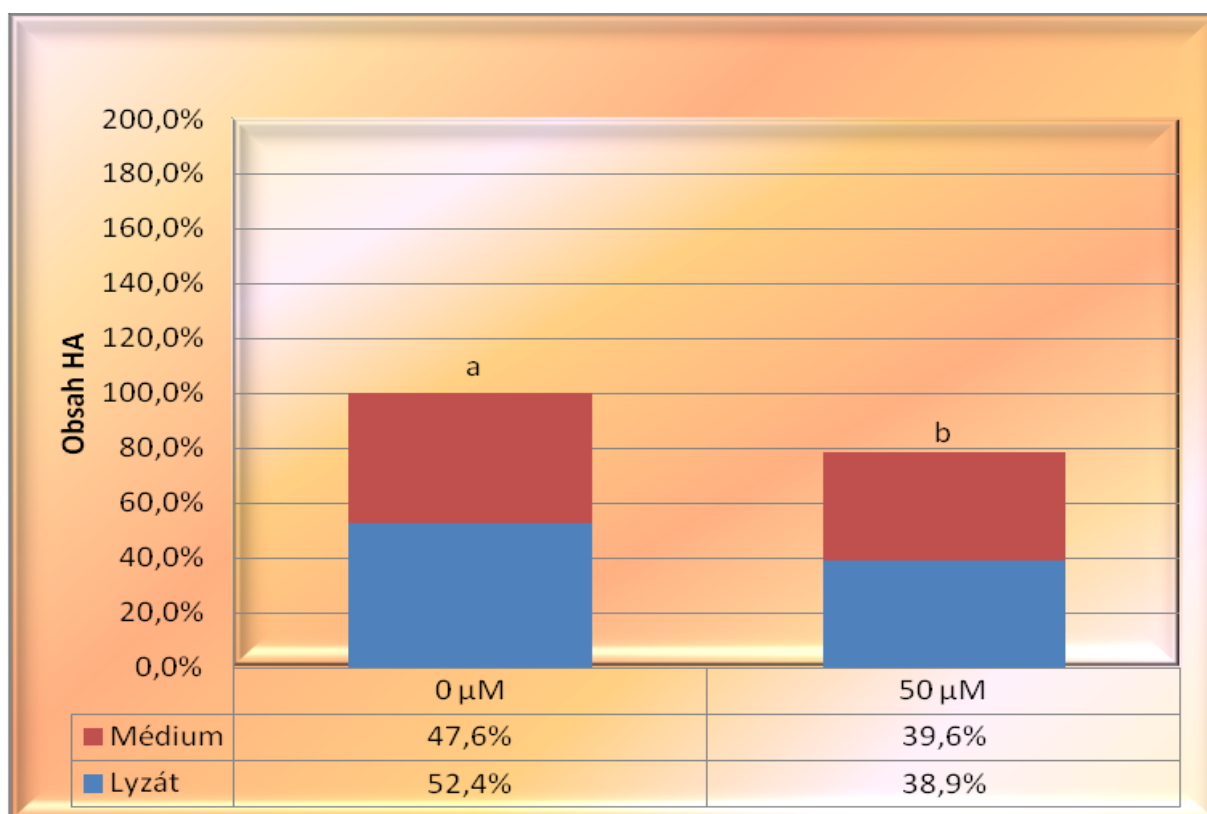
5.4 Vliv TRIK-RuCl na kumulární expanzi prasečích kumulo-oocytárních komplexů (COCs) *in vitro*

Cílem experimentu bylo posoudit vliv donoru oxidu uhelnatého TRIK-RuCl na kumulární expanzi COCs. Vzorky COCs byly kultivovány s 50 µM TRIK-RuCl. Kontrolní skupinou byly COCs kultivované v čistém médiu. Obsah hyaluronové kyseliny (HA) v pokusné skupině byl vztažen ke kontrolní skupině.

Bylo zjištěno, že TRIK-RuCl statisticky významně potlačuje produkci HA během kumulární expanze o 21,5 %. Buněčný lyzát kumulárních buněk pokusné skupiny obsahoval o 25,8 % méně HA. TRIK-RuCl potlačoval uvolňování HA do okolního média o 16,8 % (viz. Graf 2).

Graf 2: Efekt donoru oxidu uhelnatého TRIK-RuCl na kumulární expanzi prasečích COCs *in vitro*.

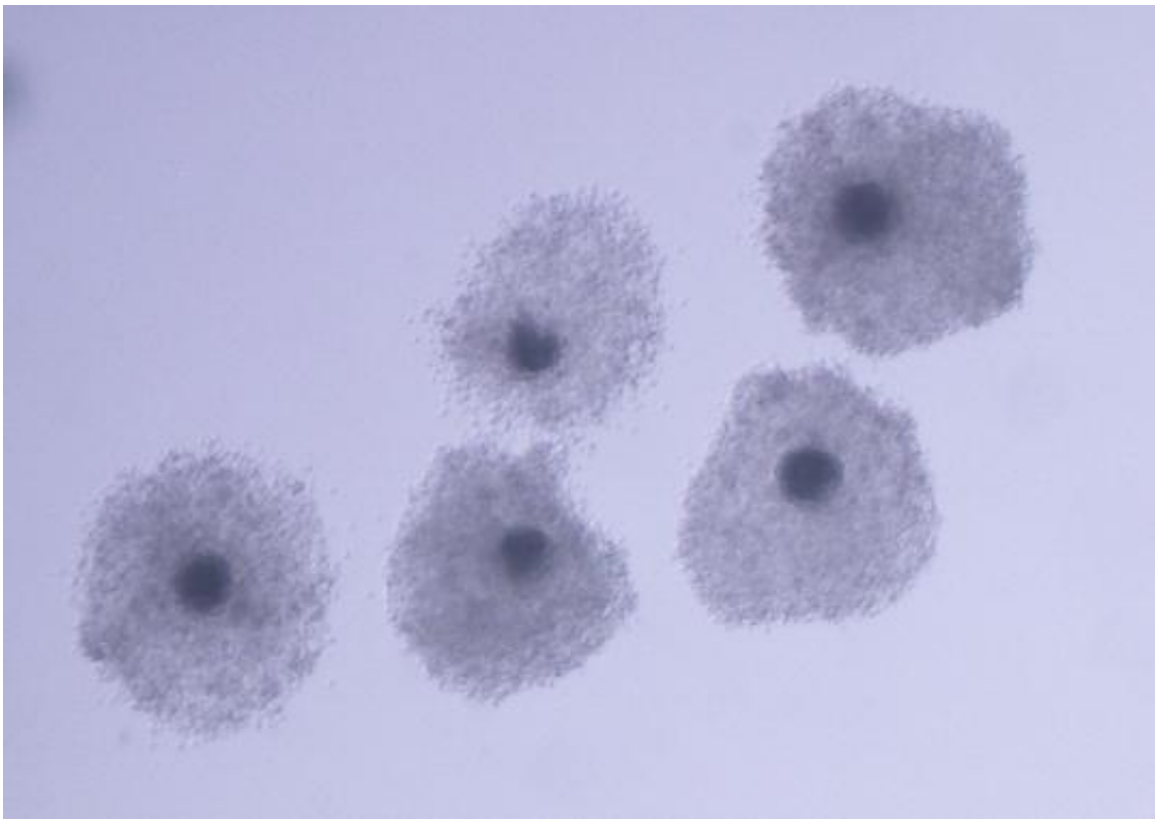
Kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu obohaceném o donor oxidu uhelnatého TRIK-RuCl o koncentraci 50 μ M. Kontrolní skupina COCs byla kultivována v čistém médiu. Po 48 hodinové kultivaci byly z oocytů odstraněny expandované kumulární buňky i s extracelulární matrix, které se vystavily proteolytickému štěpení po 2 a 3 hodiny. Během štěpení se kyselina hyaluronová uvolňovala do roztoku proteáz, který se následně centrifugoval. Obsah kyseliny hyaluronové byl stanoven ve vzorku kultivačního média a v buněčném lyzátu kumulárních buněk metodou ELISA .



Lyzát – obsah HA uvolněný z buněčného lyzátu kumulárních buněk; médium – obsah HA uvolněný z COCs do kultivačního média. ^{a, b, c} Superskripty označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$).



Obrázek 5: Kumulo-oocytární komplexy, oocyt je ve stádiu GV.



Obrázek 6: Expandované prasečí kumulo-oocytární komplexy po 24 hodinové kultivaci.

6 DISKUZE

Pro vývoj nového jedince je důležitý vývoj oocytu. Aby mohl být oocyt oplozený musí nejdříve projít meiotickým zráním a ovulací. Pro proces ovulace je nezbytná expanze kumulární buněk obklopujících oocyt (Šutovský et al., 1994; Ježová et al., 2001), kdy dochází k syntéze glykosaminoglykanů, zejména kyseliny hyaluronové (HA), a následkem toho extracelulární matrix kumulárních buněk zvětšuje svůj objem a mezibuněčné spoje gap junctions se přerušují (Dekel et al., 1979; Šutovský et al., 1994). Takto zvětšený kumulo-oocytární komplex má po ovulaci vyšší šanci k zachycení nálevkou vejcovodu a tím i vyšší šanci k oplodnění (Dekel et al., 1979). Kumulární expanze je dobrým markerem kvality oocytu pro *in vitro* oplození (Qian et al., 2003).

Meiotické zrání i kumulární expanze jsou řízené řadou regulačních faktorů. Například přeměna kumulárních buněk je zahájena nárůstem folikulostimulačního hormonu (FSH) z adenohipofýzy, po kterém se zvýší v těchto buňkách cAMP. Zvýšená koncentrace cAMP aktivuje PKA, která zapříčiní produkci HA a kumulární expanzi (Němcová et al., 2007). Přerušování spojů gap junctions při probíhající kumulární expanzi vede také k zastavení toku molekul inhibujících meiotické zrání do oocytu, například cAMP (Dekel et al., 1979; Dekel, 1996; Šutovský et al., 1994). V poslední době jsou studovány i některé plynné molekuly, tzv. gasotransmitery, a jejich vliv právě na průběh meiotického zrání a kumulární expanzi. V současné době jsou známy výsledky tohoto vlivu pouze u gasotransmiteru oxidu dusnatého (Tao et al., 2005; Chmelíková et al., 2010; Amale et al., 2011). Úloha dalších gasotransmiterů, sulfanu a oxidu uhelnatého, v procesech meiotického zrání a kumulární expanze dosud studována nebyla.

Tato práce se zaměřuje na zapojení oxidu uhelnatého do regulace meiotického zrání a kumulární expanze. Oxid uhelnatý je plynná látka vznikající v buňkách organismu, která je schopná prostupovat cytoplazmatickou membránou buněk a podílet se na buněčné signalizaci v některých fyziologických procesech (Wang, 2002; Stárka, 2009). Endogenní produkce oxidu uhelnatého je katalyzována enzymem hem oxygenázou (HO), která urychluje rozpad hemoglobinu a tím i vznik gasotransmiteru (Tenhunen et al., 1969). Přítomnost HO byla prokázána také ve tkáni vaječníku (Alexandreaanu and Lawson, 2003), proto se předpokládá, že oxid uhelnatý se účastní regulace některých fyziologických procesů probíhajících právě ve vaječnicích, jako například meiotického zrání a kumulární expanze.

Při studiu zapojení molekuly oxidu uhelnatého do regulace procesu meiotického zrání a kumulární expanze prasečního oocyty v podmínkách *in vitro* jsme použili inhibitor hem oxygenázy Zn-protoporfyrin IX (Zn-PP IX) a donor oxidu uhelnatého trikarbonyl-RuCl (TRIK-RuCl). Pro posouzení kumulární expanze byl měřen obsah kyseliny hyaluronové, a to pomocí metody ELISA.

V experimentech bylo zjištěno, že inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX nemá statisticky významný vliv na průběh meiotického zrání oocytů *in vitro*. Naopak TRIK-RuCl o koncentraci 50 μ M potlačil meiotické zrání. V metafázi prvního meiotického dělení zůstalo o 10,3 % více oocytů kultivovaných s TRIK-RuCl a pouze 74,4 % oocytů dosáhlo metafáze druhého meiotického dělení, narozdíl od 87,9 % oocytů kultivovaných v čistém médiu. Je zřejmé, že donor oxidu uhelnatého v koncentraci 50 μ M potlačuje přechod mezi prvním a druhým meiotickým dělením a dosažení metafáze II. Toto negativní působení TRIK-RuCl je statisticky průkazné. Příčinou tohoto účinku donoru může být přetrvávající aktivita CDK 1 a potlačená degradace cyklinu B (Hampl and Eppig, 1995), ovšem zapojení oxidu uhelnatého do proteasomální dráhy degradace cyklinu B dosud nebylo studováno.

V jiné studii byla u myší blokována produkce oxidu uhelnatého pomocí genetického knock-outu genu pro HO, čímž došlo jak k potlačení vývoje folikulů, tak k narušení vývoje oocytů a k jejich omezené vývojové kompetenci (Zenclussen et al., 2012). Také zablokování produkce dalšího gasotransmiteru, oxidu dusnatého, má za následek abnormální průběh meiotického zrání u myších oocytů (Jablonka-Shariff and Olson, 1998) a potlačení meiotického zrání ovčích oocytů (Amale et al., 2011).

Dále bylo v našich experimentech zjištěno, že inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX výrazně stimuluje celkovou produkci HA a tím i kumulární expanzi. Produkce HA se zvyšovala se vzrůstající koncentrací přidávaného inhibitoru. Obsah HA vzrostl u nejnižší použité koncentrace (2,5 μ M) Zn-PP IX o 52,1 % a u nejvyšší použité koncentrace (10 μ M) Zn-PP IX o 60,4 % ve srovnání s kontrolní skupinou, která byla kultivovaná v čistém médiu. Opačný vliv na syntézu HA a kumulární expanzi má donor oxidu uhelnatého TRIK-RuCl. TRIK-RuCl v koncentraci 50 μ M významně potlačuje produkce HA během kumulární expanze, a to o 21,5 % v porovnání s kontrolní skupinou.

Ve studii Amale et al. (2011), zaměřené na gasotransmitter oxid dusnatý a jeho vliv na kumulární expanzi, se uvádí, že enzym katalyzující vznik tohoto gasotransmiteru, NOS, je

zapojen do procesu kumulární expanze a inhibice endogenní produkce oxidu dusnatého způsobuje potlačení kumulární expanze.

Z experimentů, které jsme provedli, je patrné, že oxid uhelnatý je zapojen do regulace meiotického zrání oocytů a kumulární expanze kumulo-oocytárních komplexů prasete v podmínkách *in vitro*. Pro úplné objasnění úlohy tohoto gasotransmiteru v reprodukčních procesech bude zapotřebí dalších vhodných experimentů.

7 ZÁVĚR

Pro úspěšné oplození oocyty a jeho další vývoj v nového jedince je nezbytný proces meiotického zrání, během kterého dochází k expanzi kumulárních buněk. Navíc podle intenzity kumulární expanze lze rozlišit kvalitní oocyty pro *in vitro* oplození. Meiotické zrání a expanze kumulárních buněk jsou regulovány řadou klíčových faktorů. Všechny regulační faktory ovlivňující tyto procesy ani jejich mechanismy nejsou dosud zcela prostudovány.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se molekuly gasotransmiteru oxidu uhelnatého aktivně zapojují do regulace kumulární expanze a meiotického zrání prasečích kumulo-oocytárních komplexů kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Za účelem těchto zjištění byly učiněny pokusy, v nichž byl použit inhibitor hem oxygenázy Zn-PP IX a donor oxidu uhelnatého TRIK-RuCl. U inhibitoru hem oxygenázy se neprokázal žádný vliv na meiotické zrání oocyty, naopak v médiu s 50 μ M donoru oxidu uhelnatého bylo potlačeno dosažení MII stádia. Dále inhibice hem oxygenázy zvyšovala celkovou produkci hyaluronové kyseliny a kumulární expanzi kumulo-oocytárních komplexů, na rozdíl od TRIK-RuCl o koncentraci 50 μ M, který tuto produkci hyaluronové kyseliny snižoval.

Výsledky potvrzují zapojení oxidu uhelnatého do regulace meiotického zrání prasečích oocytů a kumulární expanze kumulo-oocytárních komplexů během *in vitro* kultivace. Pro úplné objasnění vlivu gasotransmiteru oxidu uhelnatého na kumulární expanzi kumulo-oocytárních komplexů a na meiotické zrání oocytů prasete je nezbytné provedení dalších experimentů, například použití více koncentrací donoru TRIK-RuCl.

8 LITERATURA

Aerts, J. M. J. Bols, P. E. J. 2010. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 171-179.

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

Alexandrea, I. C. et Lawson, D. M. 2003. Heme Oxygenase in the Rat Ovary: Immunohistochemical Localization and Possible Role in Steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. 228 (1). p. 59-63.

Amale, M. H. Shahne, A. Z. Abavisani, Nasrollahi, S. 2011. Effects of inhibiting nitric oxide synthase on cumulus expansion and nuclear maturation of sheep oocytes. *Czech journal of animal science*. 56 (6). p. 284-291. ISSN: 1212-1819.

Amsterdam, A. Rotmensch, S. 1987. Structure-function-relationships during granulosa-cell differentiation. *Endocrine reviews*. 8 (3). p. 309-337.

Anderson, E. and Albertini, D. F. 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Rockefeller University Press*. 71 (2). p. 680-686.

Araki, K. Naito, K. Haraguchi, S. Suzuki, R. Yokoyama, M. Inoue, M. Aizawa, S. Toyoda, Y. Sato, E. 1996. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction*. 55 (6). p. 1315-1324.

Bagg, M. A. Nottle, M. B. Armstrong, D. T. Grupen, C. G. 2009. Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus-oocyte complexes during IVM. *Reproduction, Fertility and Development*. 21 (6). p. 796-804.

Bing, Y. Z. Hirao, Y. Iga, K. Che, L. M. Takenouchi, N. Kuwayama, M. Fuchimoto, D. Rodriguez-Martinez, H. Nagai, T. 2002. In vitro maturation and glutathione synthesis of porcine oocytes in the presence or absence of cysteamine under different oxygen tensions:

role of cumulus cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 14 (3). p. 125-131. ISSN: 1031-3613.

Black, J. L. Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161 (1). p. 45-55.

Buhimschi, I. Ali, M. Jain, V. Chwalisz, K. Garfield R. E. 1996. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction*. 11 (8). p. 1755-1766.

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

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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 99 (1). p. 59-66.

Chmelíková, E. Ješeta, 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. p. 235-244.

Cross, P. C. Brinster, R. L. 1970. *In Vitro* Development of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*. 3 (3). p. 298-307.

Davachi, N. D. Kohram, H. ZAINOALDINI, D. 2012. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research*. 102 (1). p. 37-42. ISSN: 0921-4488

Davidoff, M. S. Middendorff, R. Mayer, B. deVente, J. Koesling, D. Holstein, A. F. 1997. Nitric oxide/cGMP pathway components in the Leydig cells of the human testis. *Cell and Tissue Research*. 287 (1). p. 161-170.

Dekel, N. 1996. Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Reviews of Reproduction*. 1 (2). p. 82-88.

Dekel, N. Hillensjö, T. Kraicers, P. F. 1979. Maturation Effects of Gonadotropins on the Cumulus-Oocyte Complex of the Rat. *Biology of Reproduction*. 20. p. 191-197.

Downs, S. M. 1989. Specificity of Epidermal Growth Factor Action on Maturation of the Murine Oocyte and Cumulus Oophorus in Vitro. *Biology of Reproduction*. 41. p. 371-379.

Eppig, J. J. O'Brien, M. J. Pendola, F. L. 1998. Watanabe, S. Factors Affecting the Developmental Competence of Mouse Oocytes Grown In Vitro: Follicle-Stimulating Hormone and Insulin. *Biology of Reproduction*. 59 (6). p. 1445-1453.

Eppig, J. J. Peters, A. H. F. M. Telfer, E. E. Wigglesworth, K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes growth in vitro: preliminary characterization of the factor. *Molecular Reproduction Development*. 34. p. 450-456.

Eppig, J. J. Schroeder, A. C. O'Brien, M. J. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *Journals of Reproduction and Fertility*. 95. p. 119-127.

Evans, J. P. Robinson, D. N. 2011. The spatial and mechanical challenges of female meiosis. *Molecular Reproduction and Development*. 78 (10-11). p. 769-777.

Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3-4). p. 203-216.

Fattaey, A. Booher, R. N. 1997. Myt 1: a Wee1-type kinas that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Cell Cycle Research*. 3. p. 233-240.

Fortune, J. E. Kito, S. Wandji, S. A. Srsen, V. 1998. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. *Theriogenology*. 49 (2). p. 441-449.

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 (1). p. 41-49.

Gilbert, S. F. 2000. editor. *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Ltd. p. 523-538.

Ginsburg, M. Snow, M. H., McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 110. p. 521-528.

Guzmán, M. A. Navarro, M. A. Carnicer, R. Sarría, A. J. Acín, S. Arnal, C. Muniesa, P. Surra, J. C. Arbonés-Mainar, J. M. Maeda, N. Osada, J. 2006. Cystathionine beta-synthase

is essential for female reproductive function. *Human Molecular Genetics*. 15 (21). p. 3168-3176.

Hagting, A. Jackman, M. Simpson, K. Pines, J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology*. 9 (13). p. 680–689.

Harper, K. M. Brackett, B. G. 1993. Bovine Blastocyst Development after In Vitro Maturation in a Defined Medium with Epidermal Growth Factor and Low Concentrations of Gonadotropins'. *Biology of Reproduction*. 48. p. 409-416.

Horner, K. Litera, G. Hinckley, M. Trknu, K. Storm, D. Conti, M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 258. p. 385-396.

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

Ignarro, L. I. Bush, P. A. Buga, G. M. Wood, K. S. Fukuto, J. M. Raifer, J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 170 (2). p. 843-850.

Irniger, S. 2002. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letter*. 532 (1-2). p. 7-11.

Izumi, T. Maller, J. L. 1991. Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (8). p. 3360-3867.

Jablonka-Shariff, A. Olson, L. M. 1998. The Role of Nitric Oxide in Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation: Meiotic Abnormalities of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes. *Endocrinology*. 139 (6). 2944–2954.

Ježová, M. Scsuková, S. Nagyová, E. Vranová, J. Procházka, R. Kolena, J. 2001. Effect of intraovarian factors on porcine follicular cells: cumulus expansit, granulosa and cumulus cell progesterone production. *Animal Reproduction Science*. 65 (1-2). p. 115-126. ISSN: 0378-4320.

- Johnson, F. K. Johnson R. A. 2003. Carbon monoxide promotes endothelium-dependent constriction of isolated gracilis muscle arterioles. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 285 (3). p. 536-541. ISSN: 0363-6119.
- Johnson, J. Canning, J. Kaneka, T. Pru, J. K. Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). p. 145-150.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 10 (1). p. 1-5.
- Keyse, S. M. Tyrrell, R. M. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (1). p. 99-103.
- Kimura, H. 2000. Hydrogen Sulfide Induces Cyclic AMP and Modulates the NMDA Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267. p. 129-133.
- Kongtawelert, P. Ghosh, P. 1990. A method for the quantification of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Analytical Biochemistry*. 185 (2). p. 313-318.
- Kurilo, L. F. 1980. Folliculogenesis in the prenatal period of human development. *Arkhiv anatomii, histologii i embryologii*. 79 (8). p. 63-69.
- Lampe, P. D. Lau, A. F. 2000. Regulation of Gap Junctions by Phosphorylation of Connexins. *Archives of Biochemistry and Biophysic*. 384 (2). p. 205-215.
- Lawson, K. A. Hage, W. J. 1994. Clonal analysis of the origin of primordial germ-cells in the mouse. *Germline development*. 182. p. 68-84.
- Liang, Ch. G. Su, Y. Q. Fan, H. Y. Schatten, H. Sun, Q. Y. 2007b. Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*. 21 (9). p. 2037-2055.
- Liang, R. Yu, W. D. Du, J. B. Yang, L. J. Yang, J. J. Xu, J. Shang , M. Guo, J. Z. 2007a. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*, 24 (1). p. 89-96.

Maines, M. D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2 (10). p. 2557-2568.

Merchant, H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Developmental Biology*. 44 (1). p. 1-21.

Moncada, S. Palmer, R. M. Higgs, E. A. 1991. In: Buhimschi, I. Ali, M. Jain, V. Chwalisz, K. Garfield R. E. 1996. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction*. 11 (8). p. 1755-1766.

Morbeck, D. E. Esbenshade, K. L. Flowers, W. L. Bretf, J. H. 1992. Kinetics of Follicle Growth in the Prepubertal Gilt. *Biology of Reproduction*. 47 (3). p. 485-491.

Morita, T. Perrella, M. A. Lee, M. E. Kourembannas, S. 1995. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (5). p. 1475-1479.

Motlík, J. Fulka, F. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 205(3). p. 377-383.

Mustafa, A. K. Gadalla, M. M. Snyder, S. H. 2009. Signaling by gasotransmitters. *Science Signal*. 2 (68). ISSN: 1937-9145

Nagyová, E. Procházka, R. Vanderhyden, B. C. 1999. Oocyectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biology of reproduction*. 61 (3). p. 569-574. ISSN: 0006-3363.

Němcová, L. Nagyová, E. Petlach, M. Tománek, M. Procházka, R. 2007. Molecular mechanism of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocyte-cumulus complexes. *Biology of reproduction*. 76 (6). p. 1016-1024. ISSN: 0006-3363.

Norbury, C. Nurse, P. 1990. Controls of cell proliferation in yeast and animals. *Ciba Foundation symposium*. 150. p. 168-173.

- Ohaski, S. Naito, K. Suiquira, K. Iwamori, N. Goto, S. Naruoka, H. Tojo, H. 2003. Analyses of Mitogen-Activated Protein Kinase Function in the Maturation of Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 68 (2). p. 604-609.
- Oxender, W. D. Colenbrander, B. van de Wiel, D. F. M. Wensing, C. J. G. 1979. Ovarian Development in Fetal and Prepubertal Pigs. *Biology of Reproduction*. 21 (3). p. 715-721.
- Ozawa, N. Goda, N. Makino, N. Yamagushi, T. Yoshimura, Y. Suematsu, M. 2002. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *The Journal of Clinical Investigation*. 109 (4). p. 457-467.
- Paleos, G. A. Powers, R. D. 1981. The effect of calcium on the first meiotic division of the mammalian oocyte. *Journal of Experimental Zoology*. 217 (3). p. 409-416.
- Palma, G. A. Argañaraz, M. E. Barrera, A. D. Rodler, D. Mutto, A. A. Sinowatz, F. 2012. *Biology and Biotechnology of Follicle Development*. Scientific World Journal. vol. 2012. Article ID 938138. p. 14, 2012. doi:10.1100/2012/938138. ISSN: 1537-744X.
- Pepling, M. E. Spradling, A. C. 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*. 125 (17). p. 3323-3328.
- Procházka, R. Kalab, P. Nagyová, E. 2003. Epidermal Growth Factor-Receptor Tyrosine Kinase Activity Regulates Expansion of Porcine Oocyte-Cumulus Cell Complexes In Vitro. *Biology of Reproduction*. 68 (3). p. 797-803.
- Prochazka, R. Nagyova, E. Brem, G. Schellander, K. 1998. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 49. p. 141-149.
- Qian, Y. Shi, W. Q. Ding, J. T. Sha, J. H. Fan, B. H. 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal Reproduction Development*. 49 (2). p.167-74
- Qian, Y. W. Erikson, E. Taieb, F. E. Maller, J. L. 2001. The Polo-like Kinase Plx1 Is Required for Activation of the Phosphatase Cdc25C and Cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* Oocytes. *Molecular Biology of the Cell*. 12 (6). p. 1791-1799.

- Rosselli, M. Dubey, R. K. Imthurn, B. Macas, E. Keller, P. J. 1995. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *10* (7). p. 1786-90.
- Saitou, M. Barton, S. C. Surani, M. A. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*. 418 (6895). p. 293-300.
- Sánchez, F. Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1822 (12). p.1896-1912.
- Sarraj, M. A. Drummond, A. E. 2012. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction*. 143 (2). p. 151-163.
- Seger, R. Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9 (9). p. 726-735.
- Shiraishi, K. Naito, K. 2005. Increased expression of Leydig cell haem oxygenase-1 preserves spermatogenesis in varicocele. *Human Reproduction*. 20 (9). p. 2608-2613.
- Sládeček, F. 1986. *Rozmnožování a vývoj živočichů*. Academia. Praha. 448 s. ISBN: 21-088-86.
- Šmelcová, M. and Tichovská, H. 2011. Gasotransmitters in the reproductive system: a review. *Scientia agriculturae bohemica*. 42 (4). p. 188–198.
- Sorensen, R. A. Wassarman, P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50 (2). p. 531–536.
- Stárka, L. 2009. Hydrogen Sulfide - Another Gaseous Hormone? *Chemické listy*. 103 (1). p. 28-31.
- Su, Y. Q. Denegre, J. M. Wigglesworth, K. Pendola, F. L. O'Brien, M. J. Eppig, J. J. 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Developmental Biology*. 263 (1). p. 126–138.
- Sun, Q. Y. Breitbart, H. Schatten, H. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 11 (8). p. 443-350.

Šutovský, P. Fléchon, J. E. Pavlok, A. 1994. Microfilaments, mikrotubules and intermediate filaments fulfill differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus-oophorus. *Reproduction nutrition development*. 34 (5). p. 415-425. ISSN: 0926-5287.

Suzuki, T. Suzuki, E. Yoshida, N. Kubo, A. Li, H. Okuda, E. Amanai, M. Perry, A. C. F. 2010. Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. *Development*. 137 (19). p. 3281-3291.

Tao, Y. Xie, H. Hong, H. Chen, X. Jang, J. Xia, G. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13. p.1-9.

Tenhunen, R. Marver, H. S. Schmid, R. 1969. Microsomal Heme Oxygenase, Characterization of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (24). p. 6388-6394.

Tesařík, J. Kopečný, V. 1986. Late preovulatory synthesis of proteoglycans by the human oocyte and cumulus cells and their secretion into the oocyte-cumulus-complex extracellular matrices. *Histochemistry*. 85 (6). p. 523-528.

van den Hurk, R. and Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). p. 1717–1751.

van Wezel, I. L. Rodgers, R. J. 1996. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of reproduction*. 55 (5). p. 1003-1011.

Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and fiction. *Frontiers in Bioscience*. 7. p. 2006-2022.

Verlhac, M. H. Kubiak, J. Z. Weber, M. Geraud, G. Colledge, W. H. Evans, M. J. Maro, B. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*. 22 (3). p. 815-822.

Verma, A. Hirsch, D. J. Glatt, C. E. Ronnett, G. V. Snyder, S. H. 1993. Carbon monoxide: A putative neural messenger. *Science*. 259 (5093). p. 381-384.

Wang, R. 1998. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 76 (1). p. 1-15.

Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16 (13). p. 1792-1798.

Wang, R. 2012. Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (23). p. 8801-8802. ISSN: 0027-8424.

Wassarman, P. M. 1988. The Mammalian Ovum. p. 69 – 102. In: Knobil, E. Neill, J. et al.(eds.). 1988. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p. 2413.

Wassarman, P. M. et Albertini, D. F. 1994. *The Mammalian Ovum, Second Edition. The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. p. 79-122.

Wassarman, P. M. Josefowicz, W. J. Letourneau, G. E. 1976. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *Journal of cell science*. 22. p. 531-545.

Wu, L. Wang, R. 2005. Carbon Monoxide: Endogenous production, physiological functions and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*. 57 (4). p. 585-630.

Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M (2009) Activation PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *Journal of Ovarian Research* 2: doi: 10.1186/1757-2215-2-20.

Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. 1988, 135 – 185. In: Knobil, E.; Neil, J. et al. (eds.) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988. 2413 pp.

Yang, L. S. Kadam, A. L. Koide, S. S. 1993. Identification of a cAMP-dependent protein kinase in bovine and human follicular fluids. *Biochemistry and molecular biology international*. 31 (3). p. 521-525.

Yokoo, M. Shimizu, T. Kimura, N. Tunjung, W. A. S. Matsumoto, H. Abe, H. Sasada, H. Rodriguez-Martinez, H. Sato, E. 2007. Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *Journal of reproduction and development*. 53 (2). p. 263-270.

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 (5). p. 376-382.

Zybina, E. V. Zybina, T. G. 1992. Changes in the relative arrangement of the chromosomes and nucleolus in developing mammalian oocytes during meiotic prophase I in relation to functional changes in the oocytes. *Tsitologija*. 34 (11-12). p. 3-23.

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha: Protokol HA pro ELISA kit, 1 strana.

Příloha: Prokol HA pro ELISA kit

- Příprava HA standardů, HA kontrol a vzorků: 10-ti násobné naředění Reaction pufrů
- Napipetování 100 µl zředěného HA standardu, kontrol, vzorků a samotného Reaction pufru (slepý vzorek) do jamek připravené destičky, jamky pro Water blank zůstávají prázdné.
- Inkubace 60 minut, při 18 – 26 °C.
- Vylití obsahu destičky a promývání jamek PBS (Phosphate Buffered Saline) celkem 4x pomocí ELISA promývače.
- Přidání 100 µl HRP+HABP roztoku (Horseradish Peroxidase + Hyaluronate binding protein) do všech jamek, mimo Water blank.
- Inkubace 30 minut, při laboratorní teplotě .
- Vylití obsahu destičky a promývání jamek PBS celkem 4x pomocí ELISA promývače.
- Přidání 100 µl Substrate roztoku do všech jamek mimo Water blank.
- Inkubace 30 minut, při laboratorní teplotě (modré zbarvení jamek = přítomnost HA).
- Přidání 100 µl Stopping roztoku do všech jamek, mimo Water blank.
- Do jamek Water blank přidat 200 µl destilované vody.
- Reader nulujeme pomocí jamek Water blank.
- Absorbance se měří při 450nm do jedné hodiny po přidání Stopping roztoku.