

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín

Oxid dusnatý a protein kináza C v meióze oocytů prasete.
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Miroslava Šmelcová**

Školitel: **prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc**

Konzultant: **Ing. Mgr. Tereza Krejčová, Ph.D.**

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma: Oxid dusnatý a protein kináza C v meióze oocytů prasete vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 25.3.2013

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda velmi poděkovala svému školiteli prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. za cenné rady, nezištnou pomoc a za dodávaný optimismus za každé situace. Dále bych ještě chtěla poděkovat Ing. Mgr. Tereza Krejčové, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracování disertační práce a podporu nejen v práci, ale i v osobním životě. Mé poděkování patří i doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D., prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., prof. MVDr. Ing. Františku Jílkovi, DrSc. a všem mým kolegům z Katedry veterinárních disciplín za podporu v mém studiu a práci. V neposlední řadě patří velké díky mému manželovi a rodině za psychickou i finanční podporu.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	3
2.1. Oogeneze	3
2.1.1. Fáze množení zárodečných buněk	3
2.1.2. Fáze růstu oocyty	4
2.1.3. Fáze zrání oocyty	5
2.1.4. Faktory, které regulují meiotické zrání oocytů.....	8
2.1.5. Oplození a aktivace.....	13
2.1.6. Stárnutí oocyty	15
2.2. Oxid dusnatý (NO).....	20
2.3. Protein kináza C (PKC)	26
3. Cíle disertační práce.....	30
4. Materiál a metodika	31
4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů.....	31
4.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.	32
4.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů.....	33
4.4. Experimentální schéma.....	34
4.4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů.....	34
4.4.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.	36
4.4.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů.....	39
5. Výsledky	42
5.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů.....	42
5.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.	49

5.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů.....	63
6. Diskuze	76
7. Závěr	85
8. Seznam použité literatury	88
9. Seznam použitých zkratek	117

1. Úvod

Výzkum v oblasti chovu a šlechtění hospodářských zvířat si klade za cíl zvýšit úspěšnost reprodukčních ukazatelů hospodářských zvířat cestou optimalizace technik diagnostiky říje, umělé inseminace a následně i diagnostiky březosti, dále je zaměřen na zvýšení efektivity produkce embryí v *in vitro* podmínkách a mnoha dalších reprodukčních biotechnik. U prasat jsou reprodukční biotechnologické postupy často závislé na dostatku kvalitních oocytů, schopných meiotického zrání v *in vitro* podmínkách. Těchto oocytů je však ve vaječnicích prasnic omezené množství. Slibný zdroj kvalitních oocytů představují rostoucí oocyty, které však nejsou meioticky plně kompetentní, nejsou tedy schopné korektního meiotického zrání v *in vitro* podmínkách. Plně dorostlé oocyty jsou již plně meioticky kompetentní a jsou schopné v *in vitro* podmínkách dospět do stádia metafáze II. Takto dozrálé oocyty jsou připravené k oplození. Pokud však k oplození nedochází včas, podléhají oocyty procesu stárnutí, který významně ovlivňuje životaschopnost oocytů a tím i možnost jejich využití pro reprodukční biotechnologické postupy. Cílem mnoha výzkumných týmů je nalézt takové metody kultivace, které by napomohly zvýšit meiotickou kompetenci rostoucích prasečích oocytů, následně by také navodily optimální prostředí pro korektní průběh meiotického zrání a v neposlední řadě by zajistily i dostatečný vývojový potenciál těchto oocytů. Doposud však nejsou detailně popsány všechny faktory, které se zapojují do regulací těchto složitých procesů.

Tato disertační práce je zaměřena nejprve na studium vlivu gasotransmiteru oxidu dusnatého (NO), produkovaného NO-syntázou (NOS), v procesu zisku meiotické kompetence prasečích oocytů. Bylo již prokázáno, že oxid dusnatý je zapojen do regulace reprodukčních procesů, dokonce i do regulace meiotického zrání. Cílem první části disertační práce tedy bylo zjistit úlohu NO v růstové fázi oocytu prasete a jeho vliv na nabývání meiotické kompetence pomocí NOS inhibitorů, NO donorů a jejich kombinace.

Druhá část této disertační práce je zaměřena na studium vlivu oxidu dusnatého na partenogenetickou aktivaci a následný časný embryonální vývoj prasečích embryí. Cílem této části disertační práce bylo popsání vlivu NO donoru a dále vlivu inhibice proteosyntézy nebo inhibice protein kináz v kombinaci s NO donorem na průběh partenogenetické aktivace a časného embryonálního vývoje prasečích embryí.

Třetí část této disertační práce je zaměřena na studium vlivu protein kinázy C (PKC) během stárnutí prasečích oocytů. Je známo, že PKC je mimo jiné zapojena do regulace procesů probíhajících po oplození během aktivace oocytu. Cílem této části disertační práce bylo pomocí specifických aktivátorů PKC prověřit její zapojení do regulace procesu stárnutí prasečích oocytů.

2. Literární přehled

2.1. Oogeneze

Oogeneze je proces, při kterém se ze zárodečných buněk vyvíjejí zralé oocyty, které jsou schopny oplození. Oogeneze probíhá ve třech fázích: fáze množení, fáze růstu a fáze zrání.

2.1.1. Fáze množení zárodečných buněk

Savčí oocyty vznikají ze zárodečných kmenových buněk, které mají extragonadální původ. Z oblasti svého vzniku, kterou je embryonální rudiment alantoidu a kaudální konec primitivního proužku, migrují zárodečné buňky do endodermálního epithelia zadního střeva a poté améboidním pohybem podél dorsálního mesenteria do základů genitální lišty. Jakmile zárodečné buňky dosáhnou svého cíle, ztrácí ve vyvíjejícím se ovariu svou motilitu a již se označují jako oogonie. Oogonie se začínají mitoticky rychle dělit a posléze vstupují do prvního meiotického dělení. Nyní jsou již označovány jako primární oocyty (Wassarman, 1988a).

V prvním meiotickém dělení procházejí savčí oocyty nejprve profází, kterou lze rozdělit do pěti fází: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakenese*.

Ve fázi *leptotene* dochází ke kondenzaci chromozómů (Sládeček, 1986; Wassarman, 1988a) a ty jsou viditelné jako dlouhá, tenká vlákna (Sládeček, 1986). Během fáze *zygotene* se k sobě přikládají homologní chromozómy a vznikají tzv bivalenty. Ve třetím stádiu – v *pachytene* chromozómy dále tloustnou, zkracují se a každý chromozóm je viditelně rozdělen na dvě sesterské chromatidy. V tento okamžik má každý bivalent čtyři chromatidy a vzniklý útvar se označuje jako tzv. tetráda. Mezi odpovídajícími úseky chromatid homologních chromozómů dojde k překřížení (crossing-over) a výměně (rekombinaci) části nesesterských chromatid. V *diplotenním* stádiu je průběh profáze přerušen, oocyt je zastaven v prvním meiotickém bloku a jádro oocytu v této fázi je označováno jako zárodečný váček (Wassarman, 1988a). Primární oocyt přechází do fáze růstu.

2.1.2. Fáze růstu oocyty

Během růstové fáze prochází oocyt výraznými změnami. Oocyt zvětšuje svůj objem, zvyšuje se počet organel a syntetizují se signální a zásobní faktory potřebné pro dokončení meiózy, oplození a časný vývoj embrya (Schultz et al., 1978; Fair, 2003). Prasečí oocyty rostou v průměru z 30 μm do 120 μm a jejich růst je téměř kompletní ve folikulu velkém 1,8 mm (Motlík a Fulka, 1986).

Rostoucí oocyty obsahují jedno velké jádro a jedno nebo dvě jadérka. Původně dekondezovaný rozptýlený chromatin zárodečného vaku se formuje do denzního prstence přiléhajícího k jádru (Wickramasinghe et al., 1991). Jadérko se během růstu také zvětšuje. Jeho zvětšení je doprovázeno změnami ve struktuře, které svědčí o intenzivní syntéze rRNA. Difúzní retikulární struktura jádérka se během růstu postupně mění na denzní kompaktní matrix (Wassarman, 1988a; Hyttel et al., 1999).

Během růstu se dramaticky zvyšuje počet mitochondrií a tyto organely jsou ke konci růstu více vakuolizované, což naznačuje jejich nižší aktivitu. V prasečích oocytech mají mitochondrie kulovitý, případně oválný tvar a dosahují velikosti 0,8 μm (Norberg, 1972).

Podobně jako mitochondrie, podstupuje Golgiho komplex dramatické ultrastrukturní změny během růstu oocyty a stává se více aktivním. Golgiho komplex se zvětšuje a rozpadá se do separovaných jednotek lokalizovaných v korové části oocyty, kde se aktivně účastní exportu glykoproteinů k *zoně pellucidě* a formace kortikálních granul (Gosden et al., 1997).

Kolem jádra oocyty se na počátku fáze růstu seskupuje endoplazmatické retikulum, které je formováno do vzájemně propojených cisteren. Během růstu se počet jeho cisteren zvyšuje, protože oocyt má větší nároky na syntézu proteinů a lipidů. V době vzniku perivitelinního prostoru se v oocyty naopak množství cisteren endoplazmatického retikula snižuje (Fair et al., 1997).

Jednou z nejvíce nápadných změn, která nastává během růstu oocyty je tvorba glykoproteinové membrány – *zony pellucidy*, která obklopuje a chrání oocyt. U prasat dosahuje tloušťky 8,6 μm (Norberg, 1972). Na formaci *zony pellucidy* se podílejí tři hlavní glykoproteiny: ZP1, ZP2 a ZP3 (Wassarman, 1988b; Jovine et al., 2002, 2005, 2007). U jednotlivých živočišných druhů existuje mezi těmito skupinami glykoproteinů vysoká strukturní podobnost (Green, 1997).

Během růstové fáze oocyty také postupně nabývají meiotické kompetence (Wassarman a Albertini, 1994).

2.1.2.1. Meiotická kompetence oocyty

Meiotická kompetence je schopnost oocyty znovuzahájit a dokončit meiotické zrání dosažením metafáze druhého meiotického dělení. Stupeň meiotické kompetence je závislý na velikosti oocyty. Oocyty prasete o velikosti do 100 μm jsou zcela meioticky nekompetentní a v *in vitro* podmínkách nejsou schopny prolomit první meiotický blok a podstoupit rozpad zárodečného váčku (germinal vesical breakdown - GVBD) (Motlík a Kubelka, 1990). Oocyty o velikosti 100 – 110 μm mají meiotickou kompetenci vyvinutou jen částečně. Procházejí v *in vitro* podmínkách rozpadem zárodečného váčku (GVBD) a dosahují metafáze prvního meiotického dělení. Nejsou však schopny vydělit první pólóvé tělíčko a dospět do stádia metafáze druhého meiotického dělení (Motlík a Fulka, 1986; Motlík et al., 1984; Motlík, 1989; Sörensen a Wassarman, 1976; Sun a Nagai, 2003). V případě prasete, jsou oocyty plně meioticky kompetentní, pokud dosáhnou velikosti 120 μm . Při kultivaci v *in vitro* podmínkách jsou schopny dokončit meiotické zrání dosažením metafáze druhého meiotického dělení (Motlík et al., 1984; Petr et al., 1994; Kanayama et al., 2002). V průběhu nabývání meiotické kompetence jsou v oocytech pozorovatelné změny jaderných a cytoplasmatických struktur. Meioticky kompetentní oocyty jsou charakteristické hustým prstencem chromatinu pod jadernou membránou, naproti tomu u meioticky nekompetentních oocytů je chromatin v jádře volně rozptýlen s malými ložisky heterochromatinu okolo jadérka (Wickramasinghe et al., 1991). V souvislosti se získáním meiotické kompetence se mění i uspořádání mikrotubulárních struktur. Meioticky nekompetentní oocyty mají nefosforylovaný centrozom a soubor dlouhých mikrotubulů, zatímco u meioticky kompetentních oocytů je centrozom fosforylovaný a je spojen s hustými krátkými mikrotubuly (Wickramasinghe a Albertini, 1992).

Získání meiotické kompetence koreluje i se schopností oocyty akumulovat a aktivovat klíčové signální molekuly, které jsou zapojeny do regulace růstu a meiotického zrání oocyty (Motlík a Fulka, 1986).

2.1.3. Fáze zrání oocyty

Meiotické zrání oocyty je finálním krokem oogeneze a nezbytnou podmínkou pro to, aby oocyt mohl být oplozen. Meiotické zrání představuje přeměnu plně dorostlého oocyty

v neoplozené vajíčko. Meiotickým zráním je označován vývoj z fáze pozdního *diplotene* profáze I do metafáze II (Motlík a Fulka, 1976). Plně dorostlý prasečí oocyt, po vyjmutí z folikulu, podstupuje meiotické zrání v *in vitro* podmínkách spontánně i bez přítomnosti hormonů (Wassarman, 1988a). Meiotické zrání začíná rozpadem zárodečného váčku, dochází ke kondenzaci chromatinu, k vytvoření dělicího vřeténka, následně k formaci a vydělení prvního pólového tělíska, k přechodu mezi prvním a druhým meiotickým dělením při potlačení S-fáze (bez přechodu do interfáze a replikace chromozómů) a dále se chromozómy formují do ekvatoriální roviny během metafáze a k druhému bloku meiózy (Schmitt a Nebreda, 2002). Ovulované oocyty jsou schopny prolomit druhý meiotický blok a dokončit meiózu se separovanými chromozómy a s vyděleným druhým pólovým tělískem až po oplození (Wassarman, 1988a).

Proces zrání nezahrnuje pouze reorganizaci chromozómů, ale jeho součástí jsou i změny, probíhající v cytoplazmě oocyty. Tyto dva procesy, jaderné a cytoplazmatické zrání, probíhají současně a jejich správné načasování je důležité pro úspěšný vývoj oocyty (Hunter, 2000).

Jaderné zrání

Proces jaderného zrání je charakteristický výraznými změnami probíhajícími v jádře – zárodečném váčku (GV) (Smith a Richter, 1985). Zárodečný váček je zpočátku ohraničen jadernou membránou. Při znovuzahájení meiotického dělení se nejprve rozpadá zárodečný váček (GVBD – germinal vesical breakdown). Proces rozpadu zárodečného váčku prasečích oocytů byl rozčleněn do pěti stádií na základě stupně kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány. GV0 konfigurace je charakteristická jasně viditelným jádrem a viditelnou jadernou membránou. V GV1 jsou jaderná membrána a jádro stále neporušené, ale kondenzovaný chromatin má tvar koňské podkovy. V GV2 je chromatin stále uspořádán do tvaru koňské podkovy a zároveň se formuje několik barvitelných shluků chromatinu blízko jaderné membrány. V další fázi, v GV3, vytváří kondenzovaný chromatin skupiny shluků nebo vláken vyskytujících se po celé karyoplazmě. Ve fázi GV4 je jaderná membrána už nezřetelná a mizí i jádérko (Lucas et al., 2002). Tento děj trvá u prasete 16 - 18 hodin (Motlík et al., 1984). Dále se chromozómy formují do figury metafáze I. U prasete se tato metafázní struktura objevuje po 20 hodinách *in vitro* kultivace a trvá asi 6-8 hodin (Motlík a Fulka, 1976). Následuje anafáze I, při které se chromozómy rozcházejí k opačným pólům meiotického vřeténka (Eppig, 1991). V telofázi I je už znatelné první pólové tělíska a

postupně se vyděluje. Tím se oocyt stává haploidním. Toto pólové tělísko obsahuje i různé organely, například mitochondrie, ribozómy a kortikálních granula. Chromozómy pólového tělíska v pozdní telofázi začínají degenerovat. V prvním pólovém tělísku může být přítomná i část dělicího vřeténka (Wassarman, 1998a). Po 40 - 48 hodinách v *in vitro* podmínkách nastává u prasete metafáze II (Motlík a Fulka, 1976). V této fázi je vývoj oocyty opět zastaven a k vydělení druhého pólového tělíska dojde až po penetraci spermie do oocyty nebo po partenogenetické aktivaci oocyty (Wassarman, 1988a).

Cytoplazmatické zrání

Během procesu zrání probíhají také zásadní změny v organizaci organel oocyty. Při přechodu z profáze I do metafáze II se přeskupují mitochondrie, ribozómy, Golgiho aparát i endoplazmatické retikulum. Jejich pohyb je umožněn prostřednictvím cytoskeletárních mikrotubulů a mikrofilament.

Na počátku fáze zrání vytvářejí mitochondrie prstenec kolem zárodečného váčku. Po metafázi I se dočasně rozptýlí v cytoplazmě oocyty a v metafázi II se opět shlukují (Ferreira et al., 2009).

Endoplazmatické retikulum prochází během meiotického zrání také výraznými změnami. Změny ve struktuře endoplazmatického retikula jsou důležité, protože endoplazmatické retikulum představuje zásobárnu vápníkových kationtů, které se významně podílejí na přenosu signálu v oocyty. V nezralých oocytech má endoplazmatické retikulum tvar kompaktní složité sítě tubulů s jednotlivými cisternami a lamelami (Jaffe a Terasaki, 1994). Při meiotickém zrání oocyty dochází ke specifické formaci endoplazmatického retikula do kortikálních klastrů, které jsou posléze nezbytné pro správný mechanismus uvolňování vápenatých iontů během oplození (FitzHarris et al., 2003).

V průběhu meiotického zrání mění svoje rozmístění a strukturu v oocyty i Golgiho komplex. Ve stádiu zárodečného váčku má Golgiho komplex ještě nepravidelnou strukturu. Membrána Golgiho komplexu je zpočátku koncentrovaná okolo zárodečného váčku a poté jsou jednotlivé části Golgiho komplexu rozmístěny pod plazmatickou membránou oocyty (Payne a Schatten 2003).

Během oogeneze oocyty syntetizují a kumulují velká množství kortikálních granulí, která jsou ústředním komponentem při blokaci polyspermie během oplození oocyty. Během meiotického zrání kortikální granula mění svojí distribuci a pohybují se směrem k periférii

oocyty (Wessel et al., 2001). V prasečích oocytech ve stádiu zárodečného váčku jsou kortikální granula distribuována ve vzdálenosti 6-10 μm od obvodu oocyty. Během meiotického zrání kortikální granula migrují k cytoplazmatické membráně a vytvářejí zde jednořadou vrstvu. Množství kortikálních granulí se významně zvyšuje v metafázi I. Ve stádiu metafáze II se už hustota kortikálních granulí nezvyšuje a migrace kortikálních granulí je pravděpodobně kompletní již po metafázi I (Wang et al., 1997).

2.1.4. Faktory, které regulují meiotické zrání oocytů

2.1.4.1. MPF (Metaphase Promoting Factor – metafázi podporující faktor)

MPF je univerzální buněčný regulátor mitózy i meiózy (Stojkovic et al., 1999), který byl objeven poprvé v žabích oocytech skokana levhartího (*Rana pipiens*) a byl pojmenován "Maturation Promoting Factor" (Masui a Market, 1971). MPF je heterodimer složený ze dvou podjednotek: z katalytické podjednotky serin/threonin protein kinázy $p34^{\text{cdc}2}$ a z regulační podjednotky cyklinu B (Gautier et al., 1989). Za kinázovou aktivitu je primárně odpovědné spojení těchto dvou podjednotek, ale samotná vazba těchto dvou podjednotek k plné aktivitě MPF nestačí (Jones, 2004). Během růstu oocyty se MPF hromadí jako neaktivní pre-MPF. V neaktivní formě je komplex udržován prostřednictvím fosforylace podjednotky $p34^{\text{cdc}2}$ na Thr14 a Tyr15. Za fosforylaci odpovídají specifická kináza Myt1 na tyrosinu 15 (Gautier et al., 1989) a kináza Wee1 na threoninu 14 (Touny a Banerjee, 2006).

Za aktivaci komplexu MPF odpovídá fosfatáza Cdc25. Rovnováha mezi aktivitou Cdc25 a Myt 1 patří k důležitým kontrolním bodům meiotického zrání (Palmer et al., 1998).

U žab rodu *Xenopus* bylo zjištěno, že Cdc25 je aktivována polo-like kinázou 1 (Plk1). Plk1 patří mezi serin/threonin kinázy a je zapojena do regulace buněčného cyklu (Abrieu et al., 2001). Tato kináza byla prokázána i v savčích oocytech. V profázi se Plk1 přesunuje k jádru oocyty (Pahlavan et al., 2000). V prasečích oocytech bylo zjištěno, že zvýšená aktivita Plk1 předchází vzestupu MPF a byla zaznamenána kontinuálně zvýšená aktivita Plk 1 během celého meiotického zrání (Anger et al., 2004).

Aktivita samotného MPF je naprosto nezbytná pro správný průběh meiotického zrání. Hraje klíčovou roli v kondenzaci chromozómů, ve formování dělicího vřeténka (Hunter, 2000) a podílí se na regulaci rozpadu zárodečného váčku prostřednictvím fosforylace jaderné laminy

(Kishimoto, 1994). Dále je MPF zapojen do regulace průběhu meiotického zrání, následně i do rekonstrukce jaderné membrány a do reorganizace sítě intermediálních filament (Stojkovic et al., 1999).

Během meiotického zrání se aktivita komplexu MPF mění. V průběhu zrání prasečího oocyty se MPF aktivita zvyšuje ve fázi rozpadu zárodečného váčku, maximální hladiny dosahuje ve stádiu metafáze I, pro přechod do anafáze I je nezbytný její pokles a poté se postupně zase zvyšuje hladina aktivního MPF a ve stádiu metafáze II je opět hladina aktivního MPF nejvyšší (Kikuchi et al., 1995).

Pokles MPF aktivity mezi metafází I a anafází I není spojen s refosforylací MPF komplexu (Goren a Dekel, 1994), ale za snížení kinázové aktivity odpovídá degradace cyklinu B (Josefsberge et al., 2000) polyubiquitinylací ubiquitin ligázou a proteolýzou proteazomem 26S (Irniger, 2002).

2.1.4.2. MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase – mitogeny aktivovaná protein kináza)

MAPK je serin/threonin kináza patřící do důležité intracelulární signální dráhy (Ferrell et al., 1991). MAP kinázová kaskáda funkčně interaguje s MPF a podílí se na řízení meiotického zrání oocytů (Fan a Sun, 2004). Rodina MAP kináz je aktivována fosforylací na specifických zbytcích serinu a threoninu (Dekel, 1995). MAPK aktivita byla zkoumána u různých druhů zvířat, například u žab rodu *Xenopus* a ze savců u myši, skotu, kozy a prasete (Sobajima et al., 1993; Fissore et al., 1996; Dedieu et al., 1996; Inoue et al., 1995). V savčích oocytech existují nejméně dvě formy MAPK, p42-ERK 2 a p44-ERK 1, které se přímo podílejí na regulaci meiotického zrání (Verlhac et al., 1993).

Průběh aktivace MAPK během zrání oocytů je druhově specifický. U některých druhů savců, například u myši a potkana, se MAPK nepodílí na znovuzahájení meiózy a její vyšší aktivita byla zjištěna až 2 hodiny po spontánním GVBD (Verlhac et al., 1993). V oocytech skotu je MAPK aktivována souběžně s MPF před GVBD (Fissore et al., 1996). V oocytech koz se nárůst aktivity MAPK objevil až po aktivaci MPF (Dedieu et al., 1996).

V nezralých prasečích oocytech, zastavených v G2 fázi, je inaktivní MAPK lokalizována výlučně v cytoplazmě. Později, během G2/M přechodu, se část MAPK přesunuje do zárodečného váčku, a to ještě před jeho rozpadem. Bylo prokázáno, že MAPK zprostředkovává signál indukující meiotické zrání z cytoplazmy do jádra, indukuje

znovuzahájení meiózy a hraje důležitou roli v dynamice změn jaderné membrány (Stojkovic et al., 1999).

U prasete se názory na proces aktivace MAPK liší. Inoue et al. (1995) popisují, že v prasečích oocytech je aktivita MAPK nízká během GV fáze a MAPK je aktivována až po aktivaci MPF. Avšak podle Lee et al. (2000) už v době rozpadu GVBD dochází k aktivaci MAPK za účasti MPF. Podle dalšího názoru se uvádí, že MAPK je aktivovaná ještě před vlastní aktivací MPF (Inoue et al., 1998). Zatímco aktivita MPF klesá mezi metafází I a metafází II, aktivita MAPK zůstává vysoká až do stádia metafáze II. Aktivita MAPK klesá až po oplození (Oh et al., 1998).

Během meiotického zrání oocytů savců kontroluje MAPK řadu procesů. V oocytech, při znovuzahájení meiotického zrání, je MAPK lokalizována okolo dělicího vřeténka a je propojena s MTOC (microtubules organizing center) (Verlhac et al., 1994). V myších a prasečích oocytech je v metafázi I aktivní MAPK koncentrována okolo pólu dělicího vřeténka a v anafázi I se pohybuje do středu dělicího vřeténka. Během vydělení pólového tělíska je MAPK propojena s cytotkinetickým prstencem (Lee et al., 2000).

Úloha signální dráhy MAPK spočívá hlavně v kontrole dynamiky mikrotubulů a zejména je důležitá pro udržení chromatinu v metafázní struktuře a dále i pro vydělení prvního pólového tělíska (Verlhac et al., 1996). Vysoká aktivita MAPK je také nezbytná při přechodu z prvního do druhého meiotického dělení, kdy potlačuje nástup interfáze (Verlhac, 2000). MAP kináza je také schopna fosforylovat proteiny zodpovědné za udržování chromatinu v kondenzovaném stavu (Dekel, 1995). Jedním ze substrátů, který MAPK v oocytech aktivuje, je p90rsk. V prasečích oocytech během meiotického zrání je tato signální molekula lokalizována na stejných místech jako MAPK (Fan a Sun, 2004).

Přímým aktivátorem MAPK kaskády v oocytech žab rodu *Xenopus* i u savců je protein Mos. MAPK dosahuje maximální aktivity po mikroinjekci mos-RNA do cytoplazmy oocytu a injikovaný oocyt poté vystupuje z prvního metafázního bloku. Aktivace MAPK signální dráhy byla zjištěna 6 hodin po mikroinjekci c-mos mRNA do nezralých prasečích oocytů (Stojkovic et al., 1999). Cílovým proteinem mos není jen MAPK, ale i další signální molekuly v oocytu (Ohashi et al., 2003).

2.1.4.3. Vápníkové kationty

Vápníkové kationty jsou významnou signální molekulou, která v organismu slouží jako intracelulární posel při přenosu signálu. Vápníkové kationty jsou zapojeny nejen do svalového stahu nebo nervového vzruchu, ale také do regulace meiotického zrání a aktivace oocyty (Miyazaki, 1991; Homa et al., 1993).

Intracelulární vápník je v oocyty lokalizován hlavně v endoplazmatickém retikulu a v mitochondriích (Mehlmann et al., 1995). V prasečích oocytech byl nalezen především v mitochondriích, na povrchu lipidových granul, ve vakuolách i v karyoplazmě (Petr et al., 2001).

Uvolnění vápníkových kationtů v oocyty probíhá prostřednictvím dvou hlavních mechanismů. Jedním ze způsobů uvolnění vápníkových kationtů z endoplazmatického retikula je prostřednictvím inositol 1,4,5-trifosfátových (IP_3) receptorů. K tomu dochází při spuštění oscilací vápníkových iontů během zrání oocyty například u myši (Carrol a Swann, 1992) a prasete (Macháty et al., 1997). Fosfolipáza C hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5 bifosfát za vzniku diacylglycerolu a inositol 1,4,5-trifosfátu (IP_3). IP_3 opouští plazmatickou membránu, difunduje cytoplazmou a navázáním na IP_3 receptory iontových kanálů lokalizovaných například v membráně endoplazmatického retikulula, tyto kanály otevírá, což způsobuje vyplavení vápníkových kationtů do cytosolu (Berridge, 1993).

Další mechanismus, který se podílí na zvýšení koncentrace vápníkových kationtů v cytoplazmě, využívá ryanodinové receptory (RyR) lokalizované také na iontových kanálech v membráně endoplazmatického retikula. Jejich výskyt byl zaznamenán v oocytech skotu (Yue et al., 1995), myši (Ayabe e al., 1995) a prasete (Macháty et al., 1997). Ryanodinové receptory se vyskytují ve třech izoformách a jsou obecně regulovány fosforylací, redoxními modifikacemi, různými malými proteiny a ionty. Aktivita RyR1 receptorů například závisí na koncentraci vápníkových kationtů. Nízká koncentrace vápníkových kationtů receptory aktivuje a naopak vysoká koncentrace je inhibuje (Meissner, 1994).

Oscilace vápníkových kationtů byly zaznamenány ve zralých savčích oocytech po oplození, ale Carrol a Swann (1992) prokázali, že vápníkové kationty hrají také důležitou roli ve znovuzahájení meiotického zrání. Snížená koncentrace vápníkových kationtů významně potlačila GVBD. V přítomnosti inhibitoru vápníkových kanálů, verapamilu, nebo při kultivaci prasečích oocytů bez přidání vápníkových kationtů, sice došlo k GVBD, ale meiotický vývoj

byl zastaven v metafázi I (Kaufman a Homa, 1993). Zároveň přidání vápníkových kationtů v metafázi I mělo za následek urychlení meiotického zrání oocytů prasete (Petr et al., 1997) Jednou z molekul, která je regulována vápníkovými kationty, je kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII). CaMKII má čtyři homologní izoformy. Je udržována v neaktivním stavu pomocí interakce mezi katalytickou a autoinhibiční doménou. Vápníkové kationty společně s kalmodulinem jsou schopné aktivovat CaMKII (Baitinger et al., 1990). Kalcium/kalmodulin dependentní dráha je v oocytech zapojena i do regulace tvorby dělicího vřeténka, vydělení prvního pólového tělíska, což tato dráha pravděpodobně ovlivňuje prostřednictvím regulace aktivity MPF a MAPK (Fan et al., 2003).

2.1.4.4. cAMP (cyklický adenosin monofosfát)

K dalším regulačním faktorům meiotického zrání patří i cyklické nukleotidy. Důležitou roli má především cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Cyklický AMP se tvoří z ATP (adenosintrifosfát) cyklizační reakcí, která z ATP odstraní difosfátovou skupinu a připojí volný konec zbývající fosforylované skupiny k sacharidové části molekuly ATP. Cyklický AMP se v buňce rychle odbourává a jeho koncentrace se může měnit během sekund, a proto funguje jako regulační molekula, dokonce i v meiotickém zrání (Alberts et al., 1998). Cyklický AMP se podílí na udržení oocytu v prvním meiotickém bloku (Cho, 1974). Cyklický AMP ovlivňuje aktivitu proteinkinázy A (PKA), která má na meiotické zrání inhibiční vliv. Vysoká hladina aktivované PKA inhibuje translaci genu *c-mos* a tedy brání aktivaci signální kaskády MAPK. Tímto mechanismem se cAMP aktivně účastní inhibice rozpadu zárodečného váčku. Naopak pokles aktivity PKA má za následek fosforylaci Cdc25, která aktivuje komplex MPF, dochází k rozpadu zárodečného váčku a oocyt je znovu schopen pokračovat v meiotickém zrání do stádia metafáze II (Mehlmann, 2005).

2.1.4.5. Cytostatický faktor (CSF)

Neoplozený oocyt je zastaven v metafázi druhého meiotického dělení tzv. cytostatickým faktorem, který udržuje stabilní vysokou aktivitu MPF (Murray et al., 1989). Poprvé byl tento faktor popsán u oocytů skokana a je definován jako aktivita schopná inhibice přechodu z metafáze II do anafáze II (Masui a Markert, 1971). CSF není pouze jedna specifická molekula, ale soubor několika molekul. Mnohé z nich již byly identifikovány, zatímco některé z nich jsou dosud neznámé (Fan a Sun, 2004). Na aktivitě CSF se podílí několik komponentů,

například protein Mos (Colledge et al., 1994), Cdk1 (Gabrieli et al., 1993), proteiny rodiny Emi/Erp (Tunquist, 2003).

Klíčové proteiny cytostatického faktoru jsou degradovány přes anafázi podporující komplex/cyklozom (APC/C). APC/C komplex řídí polyubikvitinizaci proteinů, která vede k jejich následné proteolýze prostřednictvím 26S proteasomu. Tímto mechanismem se sníží hladina komponentů cytostatického faktoru a oocyt, který byl doposud ve stádiu metafáze II, může pokračovat ve svém dalším vývoji. Proto k udržení druhého metafázního bloku je APC/C hlavním cílem cytostatického faktoru (Jones, 2005).

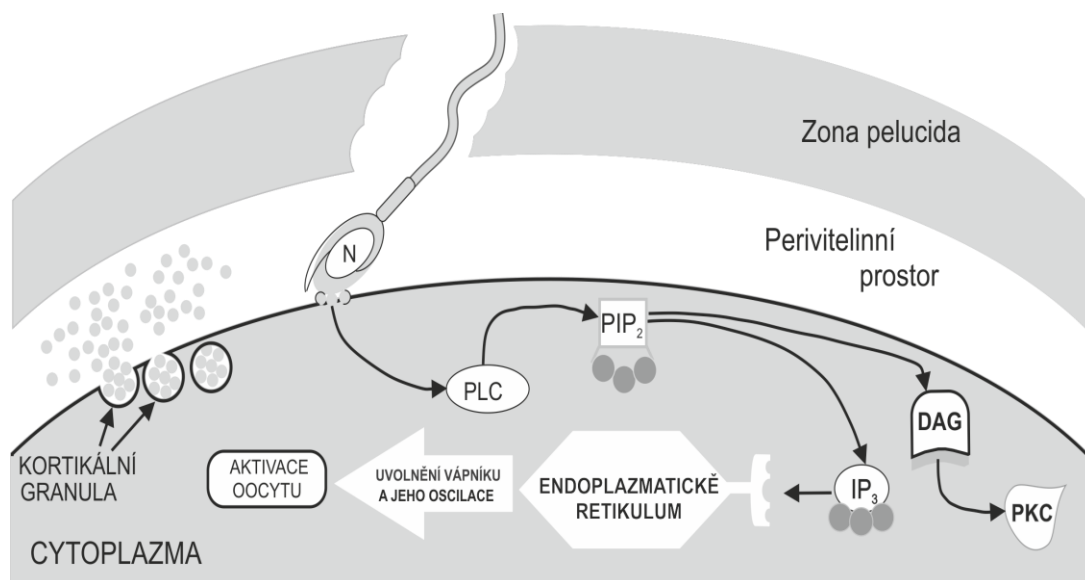
2.1.5. Oplození a aktivace

Během oplození je další vývoj oocyty spouštěn oscilacemi vápníkových kationtů. Otevření vápníkových kanálů je vyvoláno navázáním inositol 1,4,5-trifosfátu (IP₃) na receptory těchto kanálů. IP₃ vzniká štěpením fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu. Za vznik IP₃ zodpovídá fosfolipáza C zeta (PLCζ), kterou do oocyty vnáší při oplození spermie (Saunders et al., 2002; Swann et al., 2006).

Aktivace oocyty zahrnuje četné změny v morfologii i v biochemických procesech, které se objevují již za několik sekund po oplození a trvají od několika minut až po několik hodin po splynutí spermie s oocytem (Yanagimachi, 1994). Jeden z prvních kritických momentů během aktivace oocyty je vzestup koncentrace intracelulárního vápníku. U savců hladina intracelulárního vápníku periodicky osciluje po splynutí spermie a oocyty (Miyazaki et al., 1992; 1993). Vzrůst hladiny vápníkových kationtů postupuje ve formě repetitivních vln z jedné strany oocyty na druhou (Miyazaki et al., 1986, Deguchi et al., 2000) a je provázen zvýšením koncentrace vápníkových kationtů v cytoplazmě ze základní hodnoty 50-100 nmol/l až na 600-1000 nmol/l v závislosti na druhu zvířete. V návaznosti na počáteční vlnu vápníkových kationtů se opakující vlna těchto kationtů objevuje periodicky mezi 2 a 30 minutami (Miyazaki et al., 1993). Vztah mezi úspěšnou aktivací oocyty a hladinou vápníkových kationtů byl studován pomocí přesně definovaných elektrických impulsů. Oocytům, které byly vystaveny buď abnormálně vysoké, nebo nízké amplitudě oscilací vápníkových kationtů, se nepodařilo vytvořit prvojádro. Navíc oocyt, u kterých byla navozena nízká amplituda oscilací vápníkových kationtů, nepokračovaly ve svém vývoji za stádium metafáze II a v oocyttech s vysokou amplitudou oscilací vápníkových kationtů byly indukovány abnormální změny v oocyttech (Gordo et al., 2000). Výše uvedené pokusy

dokazují, že při aktivaci oocytů je nezbytná přesná frekvence i amplituda oscilací vápníkových kationtů (Williams, 2002).

Průběh oplození a aktivace oocyty je schématicky znázorněn na obrázku č.1.



Obrázek č.1: Schématické znázornění aktivace oocyty po oplození. (Převzato a upraveno z Ramadan et al., 2012).

2.1.5.1. Partenogenetická aktivace

V podmínkách *in vitro* je možné umělými stimuly navodit tzv. partenogenetickou aktivaci, časný vývoj embrya bez jakékoliv účasti spermie. Partenogenetickou aktivaci lze navodit látkami, které dokáží spustit vápníkovou signalizaci. Mezi tyto látky patří například etanol (Petr et al., 1996), kalcium ionofor (Jílek et al., 2000), forbolestery (Sun et al., 1997) nebo donory oxidu dusnatého (Petr et al., 2005). K partenogenetické aktivaci lze použít i elektrické impulsy (Procházka et al., 1992). Tyto metody se často kombinují s postupy, které zvyšují úspěšnost partenogenetické aktivace. Často se používají inhibitory proteosyntézy (cykloheximid), inhibitory aktinových mikrofilament (cytochalasin B) a inhibitory protein kináz (6-dimetyl aminopurin).

Petr et al. (1996) dosáhli nejvyššího procenta aktivovaných prasečích oocytů, když oocyty ošetřili 10% etanolem po dobu 1 minuty a následně je kultivovali s cykloheximidem. Později

Yi a Park (2005) hledali také optimální koncentraci etanolu, která je nutná k aktivaci prasečích oocytů. Zjistili, že úspěšné partenogenetické aktivace lze dosáhnout při vystavení prasečích oocytů 8% etanolu po dobu 10 minut a následné kultivovaci oocytů v médiu NCSU-23 doplněném o cykloheximid, cytochalasin B a 6-dimetyl aminopurin.

V roce 2000 Jílek et al., partenogeneticky aktivovali prasečí oocyty pomocí kalcium ionoforu. Nejvyšší podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů byl patrný po vystavení oocytů 50 μM kalcium ionoforu.

Cheng et al. (2007) úspěšně partenogeneticky aktivovali prasečí oocyty elektrickými impulzy v kombinaci s vystavením oocytů cytochalasinu B a 6-dimetyl aminopurinu.

2.1.6. Stárnutí oocytu

Proces stárnutí oocytů je složitý komplex funkčních a strukturních změn, ke kterým v oocytu postupně dochází. Vlastní průběh stárnutí je intenzivně studován, protože doposud nejsou přesně popsány všechny procesy probíhající během stárnutí. Stárnutí oocytů vyúsťuje ve spontánní partenogenetickou aktivaci oocytů, fragmentaci oocytů či lýzu oocytů (Petrová et al., 2004).

Morfologické změny stárnoucích oocytů

V průběhu stárnutí oocytu prochází mnoha morfologickými a buněčnými změnami, například dochází ke změnám ve struktuře plazmatické membrány, ve stavbě *zóny pellucidy*, cytoskeletu, mitochondrií, mění se struktura dělicího vřeténka a objevují se abnormality v utváření pólového tělíska. Morfologie pólového tělíska je přitom jedním z markerů kvality oocytů určených pro biotechnologické postupy. U oocytů, u nichž je pólové tělísko přilehlé k dělicímu vřeténku metafázní figury a má neporušenou strukturu, se zvyšuje fertilizační stupeň a následně i kvalita embryí. Zatímco u stárnoucích oocytů, u nichž je pólové tělísko degenerované, či abnormálně lokalizované, klesá úspěšnost jejich oplození i jejich vývojový potenciál (Miao et al., 2009).

Další změny, které provázejí proces stárnutí, jsou viditelné v uspořádání mikrofilamentární sítě v oocytu. V nestárnoucích oocytech jsou mikrofilamenta rozmístěna podél kortexu oocytu. Naopak ve stárnoucích oocytech jsou jednotlivé shluky mikrofilament často roztroušeny volně v cytoplazmě oocytu nebo dokonce mikrofilamentární síť úplně chybí (Pickering et al., 1988; Kim et al., 1996).

Stárnutí oocytů má vliv i na strukturu *zóny pellucidy*. U nestárnoucích oocytů má *zóna pellucida* rovnoměrnou granulo-fibrilární strukturu s četnými póry, zatímco u stárnoucích oocytů je *zóna pellucida* uspořádána do vzájemně oddělených granulo-fibrilárních shluků (Longo, 1981; Miao et al., 2009).

Další změny jsou patrné i v rozložení kortikálních granulí v oocytu. Kortikální granula v nestárnoucích oocytech jsou lokalizována pod plazmatickou membránou oocytu a po oplození je jejich obsah uvolněn do perivitellinního prostoru, což brání polyspermii. U stárnoucích oocytů probíhá kortikální reakce spontánně i bez oplození a kortikální granula jsou často pod plazmatickou membránou uspořádána nerovnoměrně (Szollosi, 1971; Longo, 1974; Gulyas, 1979; Dodson et al., 1989; Xu et al., 1997; Goud et al., 2005).

Pro korektní segregaci chromozómů po oplození je důležitá i správná funkce dělicího vřeténka, neboť meiotické dělicí vřeténko je klíčové pro přesnou distribuci chromozómů do dělicích se blastomer. U většiny savců jsou centrioly spermie odpovědné za organizaci mikrotubulů, které se podílejí na migraci samčího prvojádra (Schatten, 1994; Simerly et al., 1995; Sutovsky et al., 1996). Struktura dělicího vřeténka se ve stárnoucích oocytech často rozpadá a dokonce dochází k utváření tri- až multi- polárních dělicích vřetének, což je pak příčinou mnohých aneuploidií a dalších abnormit v chromozomální segregaci (Sun a Schatten, 2007; Schatten, 2008). Jednou z příčin těchto abnormit může být i nízká aktivita proteinu MAD2 (mitotic arrest deficient protein 2) ve stárnoucích oocytech. MAD2 je totiž klíčovým faktorem kontrolního bodu zodpovědného za korektní napojení chromozómů na mikrotubuly dělicího vřeténka (Shonn et al., 2000; Ma et al., 2005).

Další změny jsou pozorovatelné i v samotném uspořádání chromozómů ve stárnoucím oocytu. U nestárnoucích oocytů jsou chromozómy intaktní, plně kondenzované a symetricky uspořádané v metafázní figuře. Zatímco u stárnoucích oocytů jsou chromozómy často dispergované, částečně nebo zcela dekonzenzované a mohou vytvářet až jednolitou masu chromatinu (Rodman, 1971; Szollosi, 1971; Eichenlaub-Ritter et al., 1988; Van Wissen et al., 1991; Zenzes a Casper, 1992; Mailhes et al., 1998; Steuerwald et al., 2005).

K významným změnám dochází během stárnutí oocytů i v mitochondriích (Liu et al., 1996; Susin et al., 1999). V mitochondriích jsou lokalizovány důležité proapoptotické i antiapoptotické komponenty a mitochondrie také slouží jako bioenergetické centrum buňky, vytvářející ATP. Proteiny, zapojené do regulace apoptózy, jsou běžně uloženy, v mezimembránovém prostoru mitochondrií a jsou uvolněny do cytosolu po různých apoptotických stimulech (Wang, 2001). Narušení mitochondriální membrány nebo snížení

schopnosti vytvářet ATP má vliv na buněčnou proliferaci a přežití buňky (Wang, 2001). Prodloužená kultivace zvyšuje v oocytech membránový potenciál mitochondrií (Wilding et al., 2001), což způsobuje narušení homeostázy mitochondriální matrix. Tento jev pak vyvolá prasknutí mitochondriální membrány, vylití cytochromu c a dalších proapoptotických faktorů (Wang, 2001).

Signalizace během stárnutí oocytů

Bylo pozorováno výrazné narušení vápníkové signalizace a stárnoucích oocytů. Ve stárnoucích myších oocytech bylo patrné zvýšení frekvence oscilací vápenatých kationtů, oproti nestárnoucím oocytům, avšak amplituda těchto oscilací ve stárnoucích oocytech byla signifikantně nižší (Igarashi et al., 1997).

Také během stárnutí oocytů dochází k výraznému narušení regulace aktivity MPF a MAPK. Buněčný cyklus je kontrolován rovnováhou mezi aktivitami kináz a fosfatáz, které regulují buněčné procesy (Williams, 2002). V nestárnoucích oocytech, ve stádiu MII, je aktivní jak MPF, tak i MAPK (Xu et al., 1997; Tian et al., 2002; Fan a Sun, 2004; Tatone et al., 2006; Liang et al., 2007). Liu et al. (1998) prokázali, že pokles aktivity MPF je spojen s počátkem aktivace oocytu skotu (tedy s výstupem z metafáze II), zatímco pokles aktivity MAPK koreluje s formací prvojádra. Inaktivace MPF a MAPK jsou tedy pravděpodobně dva na sobě nezávislé procesy, ale pro vývoj oocytu do dalších fází, je důležitá inaktivace obou kináz. Ve stárnoucích oocytech však dochází k dřívějšímu poklesu jejich aktivity, což může vyústit ve spontánní partenogenetickou aktivaci či fragmentaci stárnoucích oocytů (Liang et al., 2007).

Do regulace procesu stárnutí významným dílem zasahuje i samotný MPF. Vysoká koncentrace aktivního MPF byla identifikována ve stádiích metafáze I a metafáze II. Avšak po oplození (Choi et al., 1991; Fulka et al., 1992) nebo partenogenetické aktivaci aktivita MPF klesá (Collas et al., 1993; Kikuchi et al., 1995; Taieb et al., 1997; Kikuchi et al., 1999). Kikuchi et al. (1999) zjistili, že ve stárnoucích prasečích oocytech je MPF inaktivován degradací regulátorové podjednotky cyklinu B. Bylo prokázáno, že stárnutí oocytů lze ovlivnit prostřednictvím regulace aktivity MPF. K tomuto účelu Kikuchi et al. (1999) využili dvě látky, vanadát a kofein. Předchozí studie popisují, že vanadát je účinným inhibitorem tyrosin fosfatáz, tedy Cdc25 (Leis a Kaplan, 1982) a kofein může inhibovat aktivitu

Myt1/Wee1 kináz (Smythe a Newport, 1992). Použití kofeinu indukovalo defosforylaci katalytické podjednotky MPF, čímž zvýšilo aktivitu MPF a s tím pokleslo procento spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů i procento fragmentovaných stárnoucích oocytů. Naopak, oocyty inkubované s inhibítorem vanadátem vykazovaly zvýšenou fosforylaci podjednotky p34^{cdc2} a s poklesem aktivity MPF stoupalo procento spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů a procento fragmentovaných stárnoucích oocytů. Z výše uvedených pokusů vyplývá, že vanadát může akcelarovat průběh stárnutí oocytů, zatímco kofein může průběh stárnutí zpožďovat (Kikuchi et al., 2000, 2002).

Dalším regulačním faktorem, kterým je možné ovlivnit průběh stárnutí, je MAPK. MAPK je částečně zapojena do regulace výstupu oocyty ze stádia metafáze II a pokles její aktivity se podílí na vyloučení druhého pólového tělíska. Prasečí oocyty ve stádiu metafáze II byly kultivovány v médiu, do kterého byl přidán inhibitor MAPK, MEK U0126. Oocyty prolomily druhý meiotický blok, kompletně dokončily druhé meiotické dělení a vytvořily prvojádro, ale nedokázaly vyloučit druhé pólové tělísko (Tatemoto a Muto, 2001).

V prasečích a myších oocytech byl také studován vliv CAMKII na aktivitu MPF a MAPK.

V myších oocytech aktivace CAMKII následuje po zvýšené vlně intracelulární koncentrace vápníku, která je indukována buď kalcium ionoforem A23187 (Johnson et al., 1998), etanolem (Winston a Maro, 1995) při partenogenetické aktivaci nebo penetrací spermie (Tatone et al., 2002). V prasečích oocytech byla také zjištěna zvýšená aktivita CAMKII po aktivaci elektrickým impulzem. Při použití inhibitoru nebo antagonisty CAMKII došlo k inhibici funkce CAMKII. Tato studie prokázala, že CAMKII je přímým cílem vápníkové signalizace při prolomení meiotického bloku. V prasečích oocytech ve stádiu metafáze II byla detekována základní hladina CAMKII. Elektrická stimulace způsobila strmé zvýšení kinázové aktivity CAMKII a tato vysoká koncentrace byla udržena po dobu jedné hodiny a po 2 hodinách se opět zvýšila. Poté zvýšená aktivita CAMKII byla naměřena ještě i v oocytech, které již byly ve fázi telofáze II (Fan et al., 2003). Antagonisté CAMKII inhibují buněčný cyklus přes potlačení degradace cyklinu B v oplozených a partenogeneticky aktivovaných oocytech. Lorca et al. 1993 poskytli důkazy, že CAMKII řídí i MPF aktivitu. Cyklin B, podjednotka MPF, je označena pro degradaci komplexem APC/C. Jedním z klíčových regulátorů APC/C je protein Emi 2, který brání APC/C komplexu ve své funkci (Liu et al., 2006). Vápníková oscilace aktivuje kinázu CAMKII, která inhibuje fosforylační vliv Emi2 na APC/C, čímž je podpořena degradace cyklinu B a aktivita MPF klesá (Tung et al., 2007). Myší oocyty byly schopny podstoupit partenogenetickou aktivaci až po inhibici Emi2 (Shoji

et al., 2006). Tyto výsledky ukazují, že k uvolnění inhibice APC/C je způsobeno inhibicí aktivity proteinu Emi 2 přes aktivitu CAMKII (Fan et al., 2003). Současně v prasečích a myších oocytech byla detekována CAMKII spolu s MAPK v okolí dělicí vřeténka, což naznačuje jejich vzájemnou spolupráci (Hatch et al., 2001; Fan et al., 2003). CAMKII může podpořit aktivaci MAPK a p90rsk po aktivaci oocytu, protože součástí primární sekvence ERK2 je vazebné místo pro CAMKII. Potlačení aktivity CAMKII způsobilo též snížení úrovně aktivity MAPK (Hatch et al., 2001).

2.2. Oxid dusnatý (NO)

Dlouhou dobu bylo známo, že reprodukční procesy jsou řízeny hormony a enzymy. Ukázalo se ovšem, že do fyziologie reprodukce zasahují i mnohem menší plynné molekuly – gasotransmitery. Cestu k poznání gasotransmiterů v regulaci fyziologických procesů otevřel zásadní objev amerického fyziologa Dr. Furchgotta. Ten v roce 1978 zjistil, že buňky cévního endotelu produkují neznámou látku, která má schopnost rozšiřovat cévy. V roce 1987 bylo zjištěno, že touto látkou je oxid dusnatý (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

Oxid dusnatý (NO) vzniká oxidací L-argininu (Ignarro et al., 1987; Stuehr et al., 1999). Tato reakce je katalyzována enzymem NO-syntázou (NOS), která se v buňkách vyskytuje ve třech hlavních izoformách (Ignarro, 1999; Furchgott, 1999; Murad, 1999). Isoformy NOS se od sebe liší závislostí na vápníku a kalmodulinu a také množstvím vyprodukovaného NO a závislostí produkce na faktorech z vnějšího prostředí (Moncada, 1992; Lamas et al., 1992; Nathan, 1992; Lowenstein, 1994; Dixit a Parvizi, 2001). Na vápníku a kalmodulinu závislé izoformy, nervová NOS (nNOS) a endoteliální NOS (eNOS), produkují pouze malá množství NO po omezenou dobu. Indukovatelná NOS (iNOS), která je naopak na vápníku a kalmodulinu nezávislá, produkuje NO ve velké míře po mnohem delší čas po stimulaci proinflamačními cytokiny a endotoxiny (Moncada et al., 1991; Lamas et al., 1992; Nathan, 1992; Moncada et al., 1993; Ignarro et al., 1999; Hattori et al., 2000).

Isoformy NOS

Nervová NO-syntáza

Nervová NO-syntáza (nNOS) byla poprvé zjištěna v mozkové tkáni (Bredt a Snyder, 1990) a o rok později i v periferním nervovém systému (Bredt et al., 1991). Kromě těchto tkání byla nNOS objevena například v ledvinách, v buňkách pankreatu (Forstermann et al., 1994) i v kosterní svalovině a dalších tkáních (Nakane et al., 1993).

Indukovatelná NO-syntáza

Tento enzym byl poprvé detekován v makrofázích u myši (Xie et al., 1992). Tento enzym je buňkami produkován pouze po stimulaci. Stimulátorem jsou nejčastěji endotoxiny, ale mohou to být i látky jiného charakteru (Forstermann et al., 1994).

Endoteliální NO-syntáza

Tato izoforma byla poprvé objevena v buňkách endotelu cév (Pollock et al., 1991). Exprese této formy enzymu byla prokázána i v dalších tkáních. Důležitou funkci hraje v buňkách srdeční svaloviny, v ledvinách, v mozku a v krevních destičkách (Fostermann a Sessa, 2012)

Fyziologická funkce NO

NO má v savčím těle rozmanité funkce - slouží jako neurotransmitter, regulátor krevního tlaku i jako jedna ze zbraní, které imunitní systém používá k boji s bakteriální infekcí, invazí parazitů a k inhibici replikace virů. Jeho využití závisí na místě jeho produkce a zejména na koncentracích produkovaného NO (Ignarro et al., 1999; Hattori et al., 2000).

Ve fyziologických podmínkách je NO většinou syntetizován izoformami eNOS a nNOS v nižších koncentracích, kdy je oxidace NO pomalá a většinou převládá regulační působení NO. NO produkovaný především izoformou eNOS se často váže k hemu v enzymu guanylát cykláze, která je zodpovědná za syntézu druhého posla, cyklického guanosin monofosfátu cGMP (Denninger a Marletta, 1999). Přes tuto dráhu NO způsobuje uvolnění hladké svaloviny krevních cév, relaxaci srdeční či příčně pruhované svaloviny (Diamond et al., 1976, Papp et al., 2004). K uvolnění svaloviny dochází díky snížení koncentrace vápenatých kationtů v buňkách prostřednictvím proteinkinázy G, která je aktivována právě zmíněným cGMP. Zajímavé ale je, že NO může způsobovat snížení koncentrací vápenatých kationtů také nezávisle na cGMP (Adachi et al., 2001). V mozku NO, syntetizovaný izoformou nNOS, často vytváří S-nitrosyly, které se účastní přenosu stimulů v mozku včetně utváření paměti. Dále se NO, pomocí S-nitrosothiolů, účastní zánětu v rámci přirozené obrany proti patogenům a také při kontrole tlaku v cévách (Broillet, 1999). Mimo utváření S-Nitrosylů, NO často modifikuje různé proteiny, především hemoproteiny (Hanafy et al., 2001). Samotný NO také snižuje riziko vzniku trombů, ovlivněním shlukování trombocytů a brání nádorovému bujení, prostřednictvím indukce programované buněčné smrti (apoptózy) (Huang a Fishman, 1996). Na vyšší produkci NO má zásluhu většinou indukovatelná izoforma iNOS, která začne NO produkovat na základě působení signálních proteinů, jež se účastní imunitní odpovědi (Beckman a Koppenol, 1996). Je-li NO produkován ve velkých koncentracích, většinou reaguje s kyslíkem, peroxonitry nebo s volnými radikály a může působit toxicky jak na bakterie, tak ovšem i na vlastní buňky. NO má také zásadní vliv na hormonální řízení

reprodukce samců a je nezbytný pro jejich sexuální aktivitu (Mani et al., 1994). NO ovlivňuje regulační dráhu hormonu uvolňující luteinizační hormon LHRH (Mc Cann, 1982), který u samců indukuje spermatogenezi. Produkovaný NO stimuluje vznik LHRH pomocí aktivace enzymu guanylát cyklázy. Dále NO ovlivňuje chování samců pomocí regulace samčího pohlavního hormonu testosteronu (Davidoff et al., 1997).

Mezi prvními objevenými funkcemi v reprodukční soustavě samce byla jeho schopnost regulace erekce penisu (Ignarro et al., 1990). NO se při sexuální stimulaci uvolňuje z nervových zakončení a z endotelialních buněk cév penisu. Vzniklý NO aktivuje enzym guanylát cyklázu, zodpovědný za syntézu cyklického guanosin monofosfátu cGMP, což vede ke zvýšení koncentrace vápníku v buňkách hladké svaloviny přívodných arterií a kavernózních těles penisu. Díky tomu dojde k rozšíření průměru těchto cév a zvýší se přítok krve do erektilní tkáně (Gupta et al., 1995).

Oxid dusnatý a reprodukce samic

NOS izoformy se vyskytují v samičích pohlavních orgánech i v oocytech u všech druhů savců. K důležitým funkcím NO v reprodukci patří jeho vliv na kontraktilitu dělohy, a to jak v době březosti, tak při patologických stavech. NO se účastní udržení březosti jak laboratorních (Buhimschi et al., 1996), tak i hospodářských zvířat, jako je prase (Andronowska a Chruściel, 2008) klisna (Roberto da Costa et al., 2008) a ovce (Yallampalli et al., 1993). Během březosti, fyziologicky produkovaný NO, inhibuje kontrakce hladké svaloviny stěny děložní a jeho koncentrace klesá až v období kolem porodu (Buhimschi et al., 1996). Na základě těchto zjištění byl vyvinut přípravek na udržení březosti u ovcí v podobě poševního čípku s NO donory (Blasi et al., 2008). NO donory, pomáhající udržet těhotenství, je možno aplikovat také u člověka (Yallampalli et al., 1996).

Stejně jako u dělohy, NO způsobuje také kontrakce vejcovodu, a to u člověka a pravděpodobně také u skotu a potkana, u kterých byl nalezen enzym NOS (Ekerhovd et al., 1997, Rosselli et al., 1996). Nízká koncentrace NO, produkovaného ve vejcovodu, může stimulovat motilitu procházejících spermií a chránit pohlavní buňky před poškozením volnými radikály. NO stimuluje uvolňování luteinizačního hormonu a reguluje také steroidogenezi v ováriu (Van Voorhis et al., 1994).

Oxid dusnatý byl zjištěn také ve vývodných pohlavních cestách samice. NOS byla nalezena ve vagině potkana, kde pravděpodobně ovlivňuje vaginální sekreci (Musicki et al., 2010).

Enzym NOS byl dále nalezen v děložním krčku potkana (Buhimschi et al., 1996), člověka (Chatterjee et al., 1996) a králíka (Batra a Al-Hijji, 1998).

Oxid dusnatý je také významným regulátorem vývoje samičích pohlavních buněk - oocytů. Enzymy NOS byly nalezeny jak ve vlastní samičí pohlavní buňce, oocytu, tak v okolních buňkách vaječníku u laboratorních hlodavců (Van Voohris et al., 1995, Jablonka- Shariff a Olson, 1997; Mitchell et al., 2004), skotu (Tesfaye et al., 2006; Pires et al., 2009) a prasete (Takesue et al., 2003; Tao et al., 2004; Chmelíková et al., 2009; Chmelíková et al., 2010).

Mnoho studií ukázalo, že NO je nezbytný jak pro růst, tak i pro následné meiotické zrání oocytu (Jablonka-Shariff a Olson, 1997; Tao et al., 2004). Bez funkčního enzymu NOS mají samice myši významně méně mláďat a vyšší úmrtnost narozených mláďat (Jablonka-Shariff a Olson, 1998). Nicméně se v literatuře objevilo i několik názorů, že NO naopak inhibuje správný vývoj oocytů u králíka (Yamauchi et al., 1997) a myši (Nakamura et al., 2002; Sela-Abramovich et al., 2008). Vědecké pokusy potvrdily, že vysoké koncentrace NO jsou toxické pro oocyty myši (Sengoku et al., 2001), skotu a prasete (Tao et al., 2004; Tao et al., 2005). Postupně bylo zjištěno, že stejně jako u spermatogeneze, také ve vývoji oocytu, hraje NO dvojí roli. Oxid dusnatý ovlivňuje regulační pochody v buňkách v závislosti na své koncentraci - stimulačně i inhibičně. Při vysokých koncentracích má cytotoxický účinek, vyvolává v buňkách apoptózu (Messmer et al., 1995). Na druhou stranu v nízkých koncentracích dokáže chránit buňky před oxidativním stresem (Kanner et al., 1991; Kuo et al., 1996). Vysoké koncentrace NO inhibují meiotické zrání oocytů myši (Jablonka-Shariff a Olson, 1998) a potkana (Jablonka-Shariff et al., 1999), zatímco nízké koncentrace NO zrání oocytů v *in vitro* podmínkách meiotické zrání stimulují (Sengoku et al., 2001; Bu et al., 2004; Huo et al., 2005; Tao et al., 2004; 2005). Mechanismus, jakým působí NO na vývoj oocytů, není ještě zcela objasněn. Předpokládá se, že NO působí přes kaskádu cGMP podobně jako u svalového stahu (Jablonka-Shariff a Olson, 1998), nebo přes kaskádu aktivující kinázy, které jsou nezbytné pro znovuzahájení meiotického zrání (Tranguch et al., 2003; Sela-Abramovich et al., 2008).

Oxid dusnatý a partenogenetická aktivace

Aktivace savčích oocytů je považována obecně za kalcium-dependentní proces, protože spermie je schopna vyvolat v oplozeném vajíčku oscilace intracelulárních hladin volných

vápníkových iontů (Swann a Ozil, 1994). Na druhé straně byl představen u ježovek v roli intracelulárního signálu oxid dusnatý (Kuo et al., 2000). Oxid dusnatý je s to vyvolat aktivaci i u savčích oocytů (Petr et al., 2005a).

Mechanismus působení NO-dependentní signální kaskády při aktivaci savčích oocytů není jasný. O tom, že NO-dependentní kaskáda není v procesu aktivace oocytu primárním stimulem, svědčí studie, které prokázaly, že při aktivaci oocytů ježovek (Leckie et al., 2003), sumek a myši (Hyslop et al., 2001) nastupuje nejprve vzestup intracelulárních hladin volných vápníkových iontů v oocytu a teprve následně je patrný vzestup intracelulárních hladin NO. NO-dependentní signální kaskáda je v savčích oocytech funkční a je aktivována při aktivaci oocytu při oplození i partenogenezi (Hyslop et al., 2001), ale sama o sobě k plnohodnotné aktivaci nestačí. Po aktivaci donory oxidu dusnatého nedochází k exocytóze kortikálních granul a partenogenetický vývoj embryí nepokračuje za stádium čtyř blastomer (Petr et al., 2005a). Prasečí oocyty jsou aktivovány donory oxidu dusnatého až po kontinuálním ošetření trvajícím déle než 10 hod (Petr et al. 2005a; Petr et al, 2007a) a jejich vývojová schopnost je výrazně snížena (Petr et al., 2005a; Petr et al., 2007a).

Během předávání informací v živých systémech nebývá typický kontinuální signál, ale spíše oscilační nebo také pulsační vzor (Krsmanovic et al., 1996; Gudmundsson a Cannes, 1997; Terasawa et al., 2001; Porksen 2002). Proto jsou pulsační ošetření považována za bližší fyziologickým podmínkám (Hornick a Taylor, 1997; Medlicott a Tucker, 1999; Bussemer et al., 2001). Aktivační stimul vápníku má při oplození savčího oocytu také pulsační charakter, protože při něm dochází k oscilaci intracelulární koncentrace vápníkových iontů (Jones 2005; Malcuit et al., 2006a; Whitaker 2006). O vývoji aktivovaného savčího oocytu rozhoduje vzor této oscilace – tj. délka a počet jednotlivých vzestupů intracelulární koncentrace vápníkových iontů i jejich celková sumace (Ducibella et al., 2002; Ozil et al., 2005; Tóth et al., 2006). Pulsační vápníkový signaling během aktivace je důležitý pro děje, které se odehrávají bezprostředně po průniku spermie do oocytu, tj. exocytózu kortikálních granulí, výstup ze spontánního meiotického bloku v metafázi II a vstup do prvního mitotického dělení (Kline a Kline, 1992, Xu et al., 1994). Neméně důležité jsou však i pro další následný vývoj raných embryí a vývoj embrya v mládě (Malcuit et al., 2006b; Morozumi et al., 2006; Ozil et al., 2006; Rogers et al., 2006;).

Pulsační charakter byl zjištěn také u oxidu dusnatého generovaného jeho syntázami (Salerno, 2008). Význam pulsačního signalingu oxidu dusnatého pro savčí oocyty je však prozkoumán jen málo. Bylo potvrzeno, že tzv. pulsační ošetření oocytů prasete donorem oxidu dusnatého

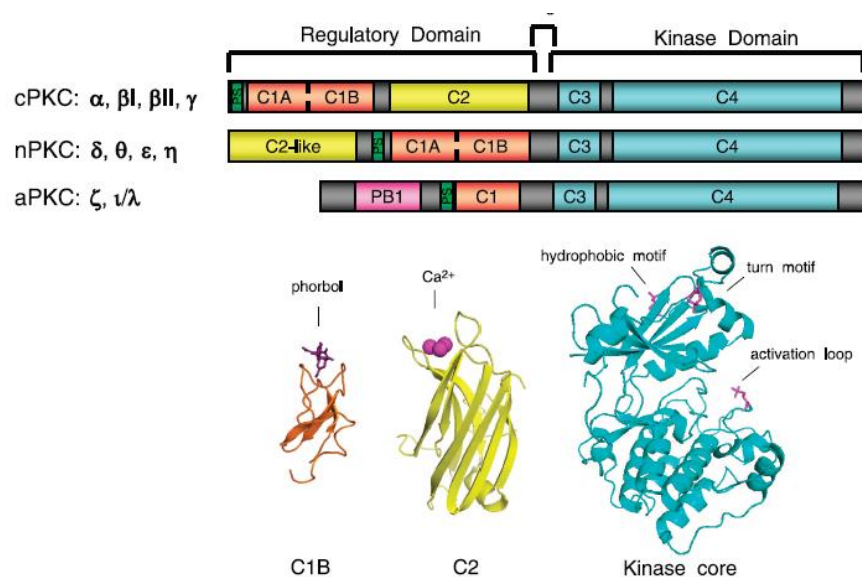
(+) –S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), tj. opakované krátkodobé vystavení oocytů účinkům SNAP střídaného krátkodobou kultivací oocytů v médiu bez donoru oxidu dusnatého, je výrazně účinnější než kontinuální ošetření oocytů donorem oxidu dusnatého (Petr et al., 2010). Efektivita pulsačního ošetření však především s ohledem na embryonální vývoj nedosahuje úrovně obvyklé u tradičních systémů partenogenetické aktivace založené na ošetření kalcium ionoforem (Petr et al., 2005a; Petr et al., 2007a).

2.3. Protein kináza C (PKC)

Protein kináza C patří k serin/treonin kinázám, které hrají důležitou funkci v regulaci mnoha signálních drah (Mellor a Parker, 1998). PKC je tradičně známa jako enzym, jenž je aktivován receptorem růstového faktoru, stimulujícím fosfolipázu C. Tento enzym následně hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5 bisfosfát na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP_3). DAG pak aktivuje PKC a inositol trifosfát (IP_3) pak mobilizuje v buňce vápníkové ionty (Steinberg, 2008).

Rodina PKC má řadu izotypů členěných do tří skupin. Konvenční PKCs (cPKCs), reprezentované izotypy PKC- α , $-\beta_I$, $-\beta_{II}$ a $-\gamma$ jsou aktivovatelné volnými vápníkovými ionty a diacylglyceroly (DAG). Tzv. novel PKCs (nPKCs) představované izotypy PKC- δ , $-\epsilon$, $-\eta$, $-\mu$ a $-\theta$ jsou nezávislé na vápníkových iontech, ale jsou aktivovatelné prostřednictvím DAG. Atypické PKCs (aPKCs), reprezentované izotypy PKC- ζ , $-\lambda$ a $-\tau$ jsou nezávislé jak na vápníkových iontech, tak na DAG (Liu a Heckman, 1998). Avšak v jejich aktivaci může hrát důležitou roli fosforylace.

Protein kináza C se skládá z konzervativní katalytické domény (obsahuje sekvence důležité pro spojení s ATP/substrátem a katalýzu) a regulátorové domény, která udržuje enzym v inaktivní konformaci. Během studií byly objeveny 4 stabilní domény enzymu (C1-C4), mezi kterými se nacházejí domény variabilní. Doména C1 obsahuje molekulární sekvenci, na kterou se váže aktivátor forbol 12-myristyl 13-acetát (PMA)/diacylglycerol (DAG) v cPKC a v nPKC. Kinázy aPKC toto vazebné místo nemají. Doména C2, která je charakteristická pro cPKC, má vazebné místo pro vápník. Domény C3 a C4 jsou důležité pro spojení s ATP a substrátem (obr. č.2) (Newton, 1995).



Obrázek č. 2: Struktura PKC a její domény (Převzato z Steinberg, 2008).

Lokalizace izoforem PKC v oocytech

Jako ve většině somatických buněk, tak i v savčích oocytech, byly identifikovány izoformy všech třech skupin PKC. Exprese jednotlivých izotypů PKC závisí na typu buněk a jejich vývojovém stádiu (Alderem, 1995). V oocytech hlodavců ve stádiu metafáze II byla zjištěna přítomnost kalcium-dependentních izotypů PKC- α , $-\beta_I$, $-\beta_{II}$, $-\gamma$, dále pak přítomnost kalcium-idenpendentních izotypů PKC- δ , $-\varepsilon$, $-\mu$ i přítomnost atypických izotypů PKC $-\lambda$ a $-\zeta$ (Gangeswaran a Jones, 1997; Raz et al., 1998; Luria et al., 2000; Downs et al., 2001; Eliahu et al., 2001; Eliyahu a Shalgi, 2002; Viveiros et al., 2003). Ve zralých oocytech prasete prokázali Fan et al., (2002a,b) přítomnost kalcium-dependentních isotypů PKC- α , $-\beta_I$, $-\gamma$. V prasečích oocytech bylo zjištěno, že PKC se částečně podílí na regulaci znovuzahájení meiotického zrání (Jung et al., 1992; Coskun a Lin, 1995; Kim a Menino, 1995; Su et al., 1999; Shimada et al., 2001). V roce 2006, Sedmíková et al., prokázali u zralých prasečích oocytů také přítomnost kalcium-independentní PKC- δ .

Vliv protein kinázy C na aktivaci oocytů

Během aktivace oocyt podstupuje tři důležité pochody: 1) periodický vzestup intracelulárního vápníku; 2) uvolnění kortikálních granulí a 3) uvolnění oocytu z druhého meiotického bloku. Četné studie prokázaly, že do procesu aktivace oocytu je zapojena PKC (Gangeswaran a Jones, 1997; Raz et al., 1998b; Pauken a Capco, 2000; Luria et al., 2000; Eliyahu et al., 2001). Jakmile je fosfolipáza C, pocházející ze spermie, v oocytu, hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5 bisfosfát na IP_3 a DAG. IP_3 dále difunduje a spojuje se s IP_3 receptory, což zahájí oscilaci vápníkových iontů (Eliyahu et al., 2001). Volný intracelulární vápník je esenciálním kofaktorem pro aktivaci konvenčních PKCs. Po oplození nebo partenogenetické aktivaci se cPKC translokují směrem k plasmatické membráně oocytu a navozují exocytózu kortikálních granulí (Gallicano et al., 1995). V oocytech, do kterých byla injikována specifická protilátka proti cPKC, exocytóza kortikálních granulí po ošetření PMA neproběhla. Výsledky prokazují, že speciálně izoforma PKC- α reguluje exocytózu kortikálních granulí v prasečích oocytech (Fan, 2002). Také Eliyahu et al. (2005) tento fakt potvrdili. Prokázali interakci mezi aktinem, který se podílí na exocytóze kortikálních granulí a také na vyloučení druhého pólového tělíska (Terada et al., 2000) a PKC- α v aktivovaných oocytech. Aktin byl distribuován především okolo kortexu a plasmatické membrány. Po oplození nebo po partenogenetické aktivaci byl detekován vzestupný signál aktinu a zároveň se objevila také aktivována PKC- α . Tento provedený pokus značí, že PKC je zapojena do exocytózy kortikálních granulí. Avšak podle výsledků Sedmíková et al., (2006), po ošetření prasečích oocytů pomocí inhibitorů PKC- α , - β I (Go6976) a PKC- β (hispidin), nedochází k potlačení aktivace oocytu. Tyto izoformy PKC do regulace aktivace prasečích oocytů patrně přímo nezasahují. Tatone et al., (2003) zjistili, že na aktivaci oocytů myši se podílí především PKC- δ . Zjistili, že během přechodu oocytu z metafáze II do anafáze II dochází k translokaci PKC δ k dělicímu vřetenku. Toto zjištění potvrzuje zapojení PKC do signalizačních drah během oplození v myších oocytech (Tatone et al., 2003). Zároveň detekční metody ukázaly, že PKC δ je difúzně rozptýlena v cytoplazmě během meiotického zrání a následně během *in vitro* oplození nebo po partenogenetické aktivaci je PKC defosforylována a je akumulována v jádře časného embrya (Viveiros et al., 2003). Také podle Sedmíková et al. (2006) v procesech aktivace hraje významnou roli právě PKC- δ .

Aktivace PKC v oocytech vyvolala jak kortikální reakci, tak i modifikovala *zonu pellucidu*, což zabránilo polyspermii. Už v roce 1987, Endo et al., prokázali, že přidáním forbol esterů

aktivují PKC u *zony pellucidy* myších oocytů a zabrání tak penetraci spermií do oocytu. Zvýšená molekulární hladina aktivátoru PKC - TPA způsobila změnu ve struktuře glykoproteinu *zony pellucidy* ZP2 po oplození. Ducibella et al. (1993) měřili snížení množství kortikálních granulí v cytoplazmě oocytu a zjistili, že po přidání TPA se sníží počet kortikálních granulí o 25 -33%, oproti kontrole. Navíc aktivátor PMA byl schopen spustit translokaci cPKC k plazmatické membráně v myších oocytech, spustit exocytózu kortikálních granulí a modifikovat *zonu pellucidu* bez vzestupu vápníku v oocytu. Kromě toho PMA je zapojen do regulace výstupu oocytu z metafáze II, formace prvojader a iniciuje vyloučení pólového tělíska v myších oocytech. Naopak inhibice PKC redukovala vyloučení druhého pólového tělíska a formaci prvojader (Abbot a Ducibella, 2001).

Uvedené studie vedou k faktu, že PKC je hlavní regulátor exocytózy kortikálních granulí, ale jiní autoři jsou opačného názoru. Colonna a Tatone (1993) pomocí aktivátoru OAG vyvolali exocytózu kortikálních granulí, ale při použití inhibitorů PKC potlačena nebyla. V dalších pokusech se opět Ducibella a LeFevre (1997) nepodařilo zablokovat exocytózu kortikálních granulí, která byla vyvolána forbol estery.

Interakce spermie s oocytem má za následek aktivaci drah závislých i nezávislých na vápníku a tyto signální dráhy vedou k stimulaci PKC, která ovlivňuje pochody během aktivace.

3. Cíle disertační práce

Byly stanoveny hypotézy:

- 1) Oxid dusnatý je zapojen do regulace fáze růstu a nabývání meiotické kompetence prasečích oocytů.
- 2) Oxid dusnatý je zapojen do regulace aktivace oocytů a použitím cykloheximidu a 6-dimetyl aminopurinu v kombinaci s donorem oxidu dusnatého je možné zlepšit partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí.
- 3) Protein kináza C je zapojena do regulace procesu stárnutí prasečích oocytů.

Pro ověření hypotéz byly stanoveny následující cíle:

- 1) sledovat úlohu oxidu dusnatého NO v růstové fázi oocytu prasete při nabývání meiotické kompetence.
- 2) popsat vliv cykloheximidu a 6-dimetyl aminopurinu na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.
- 3) ověřit vliv aktivace protein kináz C na stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách.

4. Materiál a metodika

4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a zisk meiotické kompetence prasečích oocytů

Odběr vaječníků

Prasečí vaječníky byly získávány na jatkách z prasniček v neznámém stádiu estrálního cyklu. Vaječníky byly během jedné hodiny po porážení transportovány do laboratoře v roztoku 0,9% chloridu sodného o teplotě 39°C.

Zisk rostoucích oocytů a jejich kultivace

Rostoucí oocyty byly získávány z folikulů menších než 2 mm z tenkých pruhů z kůry vaječniku. Pruhy tkáně vaječniku byly dány do 3,5 cm Petriho misky (Nunc, Roskilde, Dánsko) s modifikovaným kultivačním médiem M199 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Skotsko) obsahujícím hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7% roztoku na 1 ml média), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1.5 mg/ml), 13.5 IU eCG : 6.6 IU hCG/ml (P.G. 600, Intervet Boxmeer, Holland) a 10% fetální telecí sérum (GibcoBRL, Life Technologies, Německo). Oocyty byly uvolňovány z folikulů za použití jehly 25G protržením folikulární stěny. Vyizolované rostoucí oocyty byly pomocí okulárového mikrometru rozděleny podle velikosti vnitřního průměru, tj. bez vrstvy *zona pellucida*, do třech skupin: 80 - 89 μm, 90 - 99 μm a 100 - 110 μm.

Před kultivací byly všechny oocyty třikrát promyty v kultivačním médiu M199. Oocyty byly kultivovány při 39°C a 5% CO₂ v Petriho miskách obsahujících 3 ml modifikovaného média M199.

Zisk a kultivace plně dorostlých oocytů

Oocyty s ukončeným růstem byly získávány aspirací folikulů velkých 2-5 mm pomocí jehly 20G. Pro další experimenty byly vybírány pouze oocyty s nepoškozenou cytoplazmou, celistvým obalem kumulárních buněk a před kultivací byly všechny oocyty třikrát promyty v kultivačním médiu M199. Oocyty byly kultivovány při 39°C a 5% CO₂ v Petriho miskách obsahujících 3 ml modifikovaného média M199.

Hodnocení stádia meiotického zrání oocytů

Po kultivaci byly oocyty zbaveny okolních buněk opakovaným pipetováním úzkostěnnou skleněnou pipetou. Poté byly montovány na podložní skla, fixovány octovou kyselinou a alkoholem (1:3, v:v) po dobu nejméně 24 hod a poté byly barveny 1 % orceinem. Oocyty byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Jako aktivované byly hodnoceny oocyty v pronukleárním stádiu s viditelným vyděleným pólovým tělískem.

4.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.

Izolace a kultivace zrajících oocytů

Metodika totožná jako v předchozím experimentu (viz. kapitola 4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů).

Kultivace embryí

Po kultivaci byly dozrálé oocyty zbaveny okolních buněk opakovaným pipetováním úzkostěnnou skleněnou pipetou. Poté byly partenogeneticky aktivovány donorem oxidu dusnatého (2 mM SNAP) v kombinaci s cykloheximidem nebo 6-dimetyl aminopurinem dle schématu příslušných experimentů (viz. kapitola 4.4. Experimentální schéma), kontrolní skupina oocytů byla partenogeneticky aktivována pomocí 25 μ M kalcium ionoforu A23187 po dobu 5 minut v médiu M199. Kalcium ionofor A23187 byl rozpuštěn bez fetálního séra a bez bovinního sérového albuminu. Následovala kultivace oocytů další dvě hodiny v médiu s 2 mM 6-dimetyl aminopurinem. Aktivované oocyty byly dále kultivovány v médiu NCSU23 (Petters a Wells, 1993) ve čtyřdůlkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Denmark) v 1 ml kultivačního média při teplotě 39°C, ve směsi 5% CO₂ se vzduchem po dobu 7 dní. NCSU 23 obsahuje NaCl (0,636 mg/ml), KCl (0,355 mg/ml), CaCl₂ · 2H₂O (0,25 mg/ml), KH₂PO₄ (0,16 mg/ml), MgSO₄ · 7H₂O (0,3 mg/ml), NaHCO₃ (2,01 mg/ml), glukóza (1 mg/ml), glutamin (0,145 mg/ml), taurin (0,675 mg/ml), BSA (4 mg/ml).

Hodnocení oocytů a embryí

Po skončení kultivace byly oocyty a embrya namontovány na sklíčka, fixovány v roztoku ethanol : kyselina octová (3 : 1) nejméně po dobu 24 hodin. Oocyty a embrya byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem po obarvení 1 % orceinem. Byla hodnocena fáze meiotického zrání a vývojová fáze embryí.

Při hodnocení aktivace se používalo následující hodnocení:

Kategorie - aktivované: oocyty mají prvojádro

Kategorie - neaktivované: oocyty zůstávají v metafázi II nebo v anafázi II a telofázi II.

Při hodnocení časného embryonálního vývoje partenogenetických embryí se používalo následujícího hodnocení:

Kategorie - Rýhování:

Kategorie - Morula:

Kategorie - Blastocysta:

4.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů

Izolace a kultivace zrajících oocytů

Metodika totožná jako v předchozím experimentu (viz. kapitola 4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů).

Kultivace embryí

Po kultivaci byly dozrálé oocyty zbaveny okolních buněk opakovaným pipetováním úzkostěnnou skleněnou pipetou. Poté byly partenogeneticky aktivovány pomocí 25 μM kalcium ionoforu A23187 po dobu 5 minut v médiu M199. Kalcium ionofor byl rozpuštěn bez fetálního séra a bez bovinního serového albuminu. Následovala kultivace oocytů další dvě hodiny v médiu s 2 mM 6-dimetyl aminopurinu. Aktivované oocyty byly dále kultivovány v médiu NCSU23 (Petters a Wells, 1993) ve čtyřdůlkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Denmark) v 1 ml kultivačního média při teplotě 39°C, ve směsi 5% CO₂ se vzduchem po

dobu 7 dní. NCSU 23 obsahuje NaCl (0,636 mg/ml), KCl (0,355 mg/ml), CaCl · 2H₂O (0,25 mg/ml), KH₂PO₄ (0,16 mg/ml), MgSO₄ · 7H₂O (0,3 mg/ml), NaHCO₃ (2,01 mg/ml), glukóza (1 mg/ml), glutamin (0,145 mg/ml), taurin (0,675 mg/ml), BSA (4 mg/ml).

Hodnocení oocytů a embryí

Oocyty a embrya byly hodnoceny stejným způsobem jako v předchozím experimentu (viz. kapitola 4.2. Vliv cykloheximidu nebo 6-dimetyl aminopurinu na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého).

Statistické vyhodnocení

Data všech provedených experimentů byla podrobena statistické analýze. Každá experimentální skupina obsahovala celkem 120 oocytů. Všechny experimenty byly 4x opakovány. Data byla podrobena analýze rozptylu s využitím programu Statistica verze 6.0. Rozdíly mezi skupinami oocytů byly podrobněji hodnoceny pomocí Tukeyho HSD testu. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Statisticky významné rozdíly ve stádiích meiotického zrání mezi jednotlivými kategoriemi oocytů jsou označeny různými písmennými superskripty.

4.4. Experimentální schéma

4.4.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a zisk meiotické kompetence prasečích oocytů

Experiment 1: Vliv inhibice NO-syntázy na meiotické zrání prasečích oocytů s různým stupněm meiotické kompetence

V tomto experimentu byl sledován účinek inhibitorů NOS na průběh meiotického zrání rostoucích prasečích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a plně dorostlých prasečích

oocytů. Rostoucí oocyty a oocyty s ukončeným růstem byly kultivovány s přidavkem iNOS specifického inhibitoru aminoguanidinu (AG) anebo s nespecifickým NOS inhibitorem L-NAME (N^{ω} -nitro-L-arginin methyl ester), který inhibuje všechny NOS izoformy, ale nejvyšší specifitu má k eNOS izoformě. Oba inhibitory byly použity v koncentracích 2,5 mM, 5 mM, a 10 mM. Jako kontrola specifity inhibitoru L-NAME byl použit jeho neúčinný konformer D-NAME (N^{ω} -nitro-D-arginine methyl ester). Vzhledem k tomu, že aminoguanidin, na rozdíl od L-NAME, nemá neúčinný konformer, byla provedena reverze jeho účinku pro vyloučení možného toxického působení inhibitoru. Oocyty byly nejprve kultivovány 48 hodin s nejvyšší koncentrací inhibitoru a poté 24 hodin v čistém médiu.

Dalším cílem bylo zjistit, jak nedostatek NO, způsobený inhibicí NOS, ovlivňuje u oocytů s již ukončenou růstovou periodou přechod mezi první a druhou meiotickou metafází. Oocyty s ukončeným růstem byly nejprve kultivovány 24 hodin v čistém médiu a poté 24 hodin v médiu s přidavkem 10 mM aminoguanidinu. Kontrolní skupina oocytů byla po 24 hodinách kultivace v čistém médiu přenesena do nové Petriho misky s čistým médiem pro vyloučení vlivu mechanického poškození oocytů.

Inhibitor byl v médiu rozpuštěn vždy 30 minut před začátkem kultivace oocytů.

Experiment 2: Vliv donoru oxidu dusnatého na meiotické zrání prasečích oocytů s různým stupněm meiotické kompetence

Rostoucí oocyty a oocyty s ukončeným růstem byly kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 s donorem NO SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) v koncentraci 2 mM, 0,1mM a 0,03 mM. Pro ověření, zda přidaný donor oxidu dusnatého dokáže zvrátit účinek inhibitoru NOS, byly rostoucí oocyty a oocyty s ukončeným růstem kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 s přidavkem nejnižší účinné dávky aminoguanidinu (5 mM) společně s různou koncentrací donoru SNAP (2 mM, 1 mM, 0,1 mM a 0,03 mM).

Donor NO, případně inhibitor, byl v médiu rozpuštěn 30 minut před kultivací oocytů.

4.4.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.

Experiment 1: Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů kontinuálním ošetřením donorem oxidu dusnatého

Tento experiment měl za cíl prověřit účinky kontinuálního ošetření *in vitro* dozrálých prasečích oocytů donorem oxidu dusnatého SNAP a účinky CHX a 6-DMAP v kombinaci s kontinuálním ošetřením donorem NO. Prasečí oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, pak byly zbaveny kumulárních buněk pipetováním úzkou skleněnou pipetou a dále kultivovány v médiu bez P.G.600 obohaceném o 2,0 mM SNAP. Oocyty byly vystaveny účinku SNAP po dobu 1, 2, 3, 4, 8, 12 a 24 hodin. Po kultivaci se SNAP byly oocyty kultivovány v médiu bez SNAP tak, aby celková doba kultivace činila 24 hodin.

V další části experimentu byly oocyty kultivovány stejným způsobem, jen navíc bylo během prvních 2 hodin médium obohaceno o 2 mM 6-DMAP nebo o 2 μ M CHX.

Na konci experimentu byl stanoven podíl oocytů, u kterých byla navozena partenogenetická aktivace.

Experiment 2: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů

V tomto experimentu byl zjišťován vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, pak byly zbaveny kumulárních buněk pipetováním úzkou skleněnou pipetou a podrobeny pulsačnímu ošetření donorem SNAP. Oocyty byly vystaveny donoru oxidu dusnatého SNAP v koncentraci 2 mM po dobu 10, 20 nebo 30 minut. Každé ošetření bylo následováno stejně dlouhým časovým intervalem, po který byly oocyty kultivovány v médiu bez SNAP. Kultivace v médiu se SNAP následovaná kultivací v médiu bez SNAP byla opakována tak, aby celková doba expozice oocytů donoru oxidu dusnatého dosáhla 60, 120, 180 a 240 minut. Po každém pulsačním ošetření byly oocyty kultivovány v médiu bez SNAP tak, aby celková

doba kultivace trvala 24 hodin. To znamená, že experimenty byly dokončeny za 72 hodin od začátku kultivace.

Experiment 3: Vliv cykloheximidu (CHX) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého

V experimentu 3 bylo testováno, zda se výsledky aktivace pulsačním ošetřením donorem oxidu dusnatého zlepši současnou inhibicí protein syntézy. Uspořádání experimentu bylo stejné jako u experimentu 2 s tím rozdílem, že během dvou prvních hodin bylo médium s donorem oxidu dusnatého i médium, které tento donor neobsahovalo, navíc obohaceno o 2 μ M cykloheximidu. Poté bylo pokračováno v režimu každého konkrétního experimentu s médii bez cykloheximidu.

Experiment 4: Vliv 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého

V experimentu 4 se testovalo, zda se po ošetření inhibitorem kináz 6-dimetyl aminopurinem zlepši výsledky aktivace pulsačním ošetřením donorem oxidu dusnatého SNAP. Uspořádání experimentu bylo stejné jako u experimentu 2 s tím rozdílem, že během prvních dvou hodin bylo jak médium s donorem oxidu dusnatého SNAP, tak i médium bez tohoto donoru, navíc obohaceno o 2 mM 6-DMAP. Následně bylo pokračováno v režimu konkrétního experimentu s médii bez 6-DMAP.

Experiment 5: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP v kombinaci s cykloheximidem nebo 6-dimetyl aminopurinem na časný vývoj partenogenetických embryí

V tomto experimentu se prověřovala vývojová schopnost partenogenetických embryí získaných po kontinuálním a pulsačním ošetření oocytů donorem oxidu dusnatého SNAP. Pro pokus byla vybrána ta ošetření z předchozích experimentů, při kterých přesáhl průměrný podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů 50%. Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, pak byly zbaveny kumulárních buněk pipetováním úzkou skleněnou pipetou a dále kultivovány ve

vybraném režimu. Následně byly oocyty kultivovány 7 dní v médiu NCSU, jak je popsáno výše.

Jako pozitivní kontrola byly použity oocyty aktivované kalcium ionoforem (25 μ M kalcium ionofor A23187 po dobu 5 min) v kombinaci s 6-DMAP (2 mM 6-DMAP v kultivačním médiu po dobu 2 hodin) (Jílek et al., 2001). Po aktivaci byly i tyto kontrolní oocyty kultivovány v médiu NCSU23 po dobu 7 dnů.

Součástí každého dílčího experimentu bylo několik kontrolních experimentů. První kontrolní experiment byl zaměřen na zhodnocení meiotického zrání oocytů v našich kultivačních podmínkách. Po 48 hodinách kultivace *in vitro* v modifikovaném médiu M199 byla část oocytů nafixována a bylo sledováno stádium meiotického zrání oocytů. Statisticky hodnoceny byly pouze ty experimenty, kde více než 85% oocytů dosáhlo stádia metafáze druhého meiotického dělení (MII).

Druhý kontrolní experiment byl zaměřen na vyloučení možnosti spontánní partenogenetické aktivace v našich kultivačních podmínkách. Oocyty byly po dosažení stádia MII (48 hod kultivace) zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 24 hodin v čistém modifikovaném médiu M199 bez P.G. 600. Na konci experimentu byl stanoven podíl oocytů, u kterých byla navozena partenogenetická aktivace.

Třetí kontrolní experiment měl zhodnotit aktivační schopnost oocytů v našich kultivačních podmínkách. Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II, dále byly zbaveny kumulárních buněk a kultivovány v modifikovaném médiu M199 bez P.G. 600 s přídatkem 25 μ M kalcium ionoforu A23187 po dobu 5 minut. Poté následovala kultivace v modifikovaném médiu M199 bez P.G. 600 s přídatkem 2mM 6-DMAP po dobu 2 hodin (Jílek et al., 2001).

U všech dílčích experimentů s pulsačním schématem působení donoru SNAP sloužil, k vyloučení možnosti, že partenogenetická aktivace po pulsačním působení je výsledkem intenzivní manipulace s oocyty, kontrolní experiment, kde bylo napodobováno schéma nejintenzivnějšího pulsačního působení (24krát 10minutová expozice 2 mM SNAP + 10 minutová kultivace v médiu bez SNAP). Proto byly oocyty 48krát přeneseny mezi miskami s médiem bez SNAP a v každé byly kultivovány 10 minut. Následně byly kultivovány dalších 16 hodin v médiu bez SNAP, aby celková doba kultivace dosáhla 24 hodin.

4.4.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů

Experiment 1: Vliv aktivátoru PKC, phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 1 byl sledován účinek phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA) na stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro* do stádia metafáze II v modifikovaném médiu M199. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 3 dny, v médiu M199 s přidavkem aktivátoru PKC - phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA). PMA je aktivátorem kalcium-dependentních i kalcium-independentních PKC a byl použit v koncentracích 0 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM a 100 nM.

Experiment 2: Vliv aktivátoru PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 2 byl sledován účinek specifického aktivátoru kalcium-dependentních PKC - 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) na stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro* do stádia metafáze II v modifikovaném médiu M199. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 3 dny, v médiu M199 s přidavkem aktivátoru PKC - 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) v koncentracích 0 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M a 100 μ M.

Experiment 3: Vliv aktivátoru PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 3 byl sledován účinek aktivátoru kalcium-independentních PKC - dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM) na stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro* do stádia metafáze II v modifikovaném médiu M199. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále

kultivovány 3 dny, v médiu M199 s přidavkem aktivátoru PKC – DIPALM. Ten byl použit v koncentracích 0 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM a 100 nM.

Experiment 4: Vliv aktivátoru PKC, 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerolu (STEAR), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 4 byl sledován účinek aktivátoru kalcium-dependentních i kalcium-independentních PKC - 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerolu (STEAR) na stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro* do stádia metafáze II v modifikovaném médiu M199. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 3 dny, v médiu M199 s přidavkem aktivátoru PKC – STEAR. Ten byl použit v koncentracích 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M a 200 μ M.

Experiment 5: Vliv kombinace aktivátorů PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) a dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu byl testován kombinovaný efekt aktivace kalcium-dependentních a kalcium-independentních PKC. Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro* do stádia metafáze II v modifikovaném médiu M199. Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 3 dny, v médiu M199 s přidavkem aktivátorů PKC – OLE a DIPALM. Tyto aktivátory byly použity v následujících koncentracích: 10 μ M OLE a 100 nM DIPALM.

Všechny aktivátory byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně naředěny v kultivačním médiu na potřebnou koncentraci. Koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 0,3%. V kontrolních experimentech jsme ověřili, že DMSO v koncentracích nižších než 1% nemá vliv na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*. V každém experimentu byly použity jako kontrola jak oocyty stárnoucí v médiu bez přidavku DMSO, tak i oocyty stárnoucí v médiu s odpovídající koncentrací DMSO. Výsledky kontrolních experimentů se od sebe statisticky významně nelišily a ve výsledcích jsou pod označením „kontrola“ uváděny výsledky kontrolní skupiny oocytů kultivované v médiu bez DMSO.

Experiment 6: Časný embryonální vývoj partenogeneticky aktivovaných stárnoucích oocytů, vystavených během stárnutí účinkům aktivátoru PKC

V experimentu 6 byla sledována vývojová schopnost stárnoucích prasečích oocytů po partenogenetické aktivaci kalcium ionoforem, a to u stárnoucích prasečích oocytů vystavených během stárnutí účinkům 100 nM PMA. *In vitro* dozrálé oocyty byly zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány 1 den v přítomnosti 100 nM PMA. Poté byly oocyty aktivovány kalcium ionoforem A23187 v kombinaci s 6-DMAP (Jilek et al., 2001). Následně byly oocyty kultivovány v médiu NCSU23 po dobu 7 dní.

5. Výsledky

5.1. Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a zisk meiotické kompetence prasečích oocytů.

Experiment 1: Vliv inhibice NO-syntázy na meiotické zrání prasečích oocytů s různým stupněm meiotické kompetence

V tomto experimentu jsme sledovali, jak na prasečí oocyty s různým stupněm meiotické kompetence působí inhibitory NOS – aminoguanidin (AG) a L-NAME.

Prokázali jsme, že inhibitory NOS – aminoguanidin (AG) a L-NAME opravdu ovlivňují meiotické zrání oocytů s různým stupněm meiotické kompetence. Zjištěné výsledky jsou shrnuty v tabulkách č.1 a č.2. Je patrné, že koncentrace 2,5 mM obou inhibitorů neměla vliv na průběh meiotického zrání oocytů s různým stupněm meiotické kompetence. Dále jsme oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a plnou meiotickou kompetencí kultivovali v kultivačním médiu, které obsahovalo AG v koncentracích 5 mM a 10 mM (viz. Tabulka č.1). Při těchto koncentracích bylo prokázáno, že AG blokoval vývoj oocytů do stádia metafáze II. Z tabulky č.1 je patrné, že u většiny kultivovaných oocytů zůstal vývoj zastaven ve stádiu zárodečného váčku (GV). Ve stádiu zárodečného váčku bylo zjištěno 89,8 % oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a 90,2 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí při koncentraci inhibitoru 5 mM a 92,3 % oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a 92,6 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí při koncentraci inhibitoru 10 mM.

Tab. č.1.: Vliv aminoguanidinu (AG) na meiotické zrání oocytů s částečnou (100 – 110 μm) a plnou meiotickou kompetencí (120 μm) kultivovaných 48 hodin *in vitro*.

Stupeň meiotické kompetence	Stádium meiotického zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání			
		Kontrola 0 mM AG	2.5 mM AG	5 mM AG	10 mM AG
Částečná meiotická kompetence	GV	11.0 ± 1.0 ^A	7.2 ± 2,0 ^A	89.8 ± 2.9 ^B	92.3 ± 5.1 ^B
	MI	87.7 ± 5.1 ^A	91.5 ± 4,7 ^A	9.2 ± 3.9 ^B	7.4 ± 1.2 ^B
	MII	1.3 ± 1.1 ^A	1.3 ± 0,3 ^A	1.0 ± 0.8 ^A	0.3 ± 0.1 ^A
Plná meiotická kompetence	GV	2.8 ± 2.0 ^A	2.3 ± 2.9 ^A	90.2 ± 4.9 ^B	92.6 ± 4.7 ^B
	MI	7.8 ± 2.1 ^A	5.8 ± 2.4 ^A	5.9 ± 2.6 ^A	3.0 ± 3.1 ^A
	MII	89.4 ± 5.1 ^A	91.9 ± 4.1 ^A	3.9 ± 3.3 ^B	4.4 ± 3.5 ^B

^{A,B} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v podílu oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými koncentracemi inhibitoru (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

Podobný efekt byl pozorován i ve skupinách oocytů vystavených meiotickému zrání v přítomnosti inhibitoru L-NAME v koncentracích 5 mM a 10 mM. Výsledky shrnuje tabulka č.2. Ve stádiu zárodečného vaku bylo zjištěno 91,6 % oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a 94,7 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí při koncentraci inhibitoru 5 mM a 91 % oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a 92,7 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí při koncentraci inhibitoru 10 mM. Neúčinný konformer D-NAME nemá žádný vliv na průběh meiotického zrání oocytů s různým stupněm meiotické kompetence.

Tab. č.2: Vliv L-NAME a D-NAME na meiotické zrání oocytů s částečnou (100 – 110 μm) a plnou meiotickou kompetencí (120 μm) kultivovaných 48 hodin *in vitro*

Stupeň meiotické kompetence		Stádium meiotického zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání			
			Kontrola	2.5 mM	5 mM	10 mM
Částečná meiotická kompetence	L-NAME	GV	8.01 ± 7.1 ^A	6.1 ± 3.0 ^A	91.6 ± 2.6 ^B	94.7 ± 3.5 ^B
		MI	90.4 ± 1.0 ^A	93.4 ± 3.1 ^A	8.4 ± 2.6 ^B	5.3 ± 0.5 ^B
		MII	1.6 ± 0.2 ^A	0.6 ± 0.4 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
	D-NAME	GV	8.01 ± 0.7 ^A	7.7 ± 1.7 ^A	8.4 ± 1.8 ^A	6.5 ± 2.8 ^A
		MI	90.4 ± 1.0 ^A	92.3 ± 0.7 ^A	91.6 ± 1.8 ^A	93.5 ± 2.8 ^A
		MII	1.6 ± 2.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
Plná meiotická kompetence	L-NAME	GV	3.0 ± 0.3 ^A	4.5 ± 0.3 ^A	91.0 ± 2.2 ^B	92.7 ± 4.9 ^B
		MI	4.8 ± 1.5 ^A	5.4 ± 2.5 ^A	6.7 ± 1.2 ^A	4.4 ± 1.8 ^A
		MII	92.2 ± 6.1 ^A	90.2 ± 2.1 ^A	2.4 ± 0.2 ^B	2.9 ± 0.9 ^B
	D-NAME	GV	3.0 ± 0.3 ^A	3.0 ± 0.3 ^A	3.9 ± 0.1 ^A	4.8 ± 1.0 ^A
		MI	4.8 ± 0.5 ^A	4.6 ± 0.3 ^A	4.3 ± 0.4 ^A	2.9 ± 0.8 ^A
		MII	92.2 ± 6.1 ^A	93.7 ± 2.8 ^A	91.8 ± 1.7 ^A	92.5 ± 1.6 ^A

^{A,B} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) v podílu oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými koncentracemi inhibitoru (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

Vzhledem k tomu, že aminoguanidin (AG) nemá, na rozdíl od L-NAME, neúčinný konformer, otestovali jsme, zda tento inhibitor není pro oocyty toxický a zda je jeho efekt specifický. Oocyty byly nejprve kultivovány 48 hodin s nejvyšší koncentrací inhibitoru a poté 24 hodin v čistém médiu. Částečně meioticky kompetentní oocyty měly po reverzi AG obnovenou schopnost prolomit první meiotický blok. U plně meioticky kompetentních oocytů

měla reverze za následek vysoký nárůst podílu partenogeneticky aktivovaných embryí, 26 % oproti 3,1 % u kontrolní skupiny. Výsledky shrnuje tabulka č.3.

Tab. č.3: 24-hodinová reverze oocytů s částečnou (100 – 110 μm) a plnou meiotickou kompetencí (120 μm) po 48 hodinové kultivaci v médiu s AG v koncentraci 10 mM

Prasečí oocyty s různým stupněm meiotické kompetence byly nejprve kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 s přidavkem 10 mM AG a poté dalších 24 hodin v čistém modifikovaném médiu M199.

Stupeň meiotické kompetence	Stádium meiotického zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání		
		Kontrola 72 hod	10 mM AG	10 mM AG 48 hod
Částečná meiotická kompetence	GV	4.0 ± 0.2 ^A	92.3 ± 5.1 ^B	23.3 ± 5.0 ^A
	MI	96.0 ± 5.1 ^A	7.4 ± 1.2 ^B	71.7 ± 15.1 ^A
	MII	0.0 ± 0.0 ^A	0.3 ± 0.1 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
Plná meiotická kompetence	GV	6.1 ± 1.0 ^A	92.6 ± 2.1 ^B	18.9 ± 3.5 ^A
	MI	6.1 ± 3.0 ^A	2.9 ± 0.5 ^A	42.0 ± 6.2 ^B
	MII	84.7 ± 7.2 ^A	4.5 ± 4.0 ^B	13.1 ± 2.1 ^B
	aktivovaných	3.1 ± 2.1 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	26.0 ± 6.2 ^B

^{A,B} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) v podílu oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými způsoby ošetření (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

Dalším cílem experimentu bylo zjistit, jak nedostatek oxidu dusnatého, způsobený inhibicí NOS, ovlivňuje u oocytů s již ukončenou růstovou periodou přechod mezi první a druhou meiotickou metafází. Zjistili jsme, že inhibitor působí také na přechod mezi první a druhou meiotickou metafází. Po aplikaci aminoguanidinu došlo k zastavení oocytů v první meiotické metafázi, plně kompetentní oocyty neměly schopnost prolomit toto stádium a dosáhnout stádia metafáze II. Výsledky experimentu jsou shrnuty v tabulce č.4.

Tab. č.4: Vliv aminoguanidinu na přechod plně kompetentních oocytů z první do druhé meiotické metafáze.

Oocyty s ukončeným růstem byly nejprve kultivovány 24 hodin v čistém modifikovaném médiu M199 a poté 24 hodin v médiu s přidavkem 10 mM AG. Kontrolní skupina oocytů byla po 24 hodinách kultivace v čistém modifikovaném médiu M199 přenesena do nové Petriho misky, opět s čistým modifikovaným médiem M199, pro vyloučení vlivu mechanického poškození oocytů.

Stádium meiotického zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání	
	Kontrola	24 hod médium + 24 hod 10 mM AG
GV	0.0 ± 0.0 ^A	0.5 ± 0.1 ^A
MI	14.3 ± 2.1 ^A	46.9 ± 11.9 ^B
MII	85.7 ± 6.1 ^A	43.4 ± 6.8 ^B
atypické	0.0 ± 0.0 ^A	9.2 ± 1.5 ^A

^{A,B} Statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$) v podílu oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými způsoby ošetření (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

Experiment 2: Vliv donoru oxidu dusnatého na meiotické zrání prasečích oocytů s různým stupněm meiotické competence

V experimentu 2 bylo sledováno, zda oxid dusnatý, který je dodán oocytům ve formě donoru NO SNAPu (S-nitroso-N-acetylpenicillamin), ovlivňuje růstovou periodu a meiotickou kompetenci prasečích oocytů.

Přidání donoru SNAP do kultivačního média během meiotického zrání způsobilo snížení podílu oocytů ve stádiu první a druhé meiotické metafáze (Tabulka č.5). Zjistili jsme, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci 0,03 mM SNAP, a proto jsme se na tuto koncentraci zaměřili. Vysoké procento oocytů s částečnou a plnou meiotickou kompetencí zůstalo zastaveno v pozdní diaknezi (LD) - 36 % oocytů s částečnou meiotickou kompetencí a 67,9 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí. Tyto oocyty nebyly schopny prolomit blok

do metafáze II. Nakonec pouze 46,7% oocytů s částečnou meiotickou kompetencí (v pokusné skupině) oproti 91,9 % oocytů v kontrolní skupině dokončilo meiotické zrání v metafázi I. Jen 14,1 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí po 48 hodinách kultivace s 0,03 mM SNAP dosáhlo stádia metafáze II oproti kontrolní skupině, kde do stádia metafáze II dospělo 92,9 % oocytů.

Tab č.5.: Vliv donoru NO SNAP na meiotické zrání oocytů s částečnou (100 – 110 μm) a plnou meiotickou kompetencí (120 μm) kultivovaných 48 hodin *in vitro*

Stupeň meiotické kompetence		% oocytů v daném stádiu meiotického zrání			
		Kontrola	0.03 mM SNAP	0.1 mM SNAP	2 mM SNAP
Částečná meiotická kompetence	GV	8.1 ± 8.34 ^A	10.7 ± 2.8 ^A	8.2 ± 1.9 ^A	8.3 ± 14.4 ^A
	GVBD	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
	LD	0.0 ± 0.0 ^A	36.1 ± 2.6 ^C	63.6 ± 8.6 ^B	79.2 ± 36.0 ^B
	MI	91.9 ± 8.3 ^A	46.7 ± 8.7 ^C	23.3 ± 3.2 ^B	12.5 ± 1.7 ^B
	MII	0.0 ± 0.0 ^A	4.9 ± 0.5 ^A	4.9 ± 3.6 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
Plná meiotická kompetence	GV	2.3 ± 1.5 ^A	1.3 ± 0.5 ^A	25.0 ± 2.3 ^B	25.0 ± 2.3 ^B
	GVBD	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
	LD	0.0 ± 0.0 ^A	67.9 ± 10.6 ^B	75.0 ± 9.0 ^B	75.0 ± 20.2 ^B
	MI	4.7 ± 4.0 ^A	11.5 ± 2.6 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
	MII	92.96 ± 6.3 ^A	14.1 ± 1.5 ^B	0.0 ± 0.0 ^B	0.0 ± 0.0 ^B
	atypických	0.0 ± 0.0 ^A	5.1 ± 4.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A

^{A,B,C} Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v podílu oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO SNAP (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

V další části experimentu 2 jsme sledovali, zda je donor SNAP je schopen zvrátit vliv NOS inhibitoru. Výsledky bylo prokázáno, že donor SNAP je opravdu schopen zvrátit vliv NOS inhibitoru - aminoguanidinu (viz. Tabulka č.6). Oocyty s částečnou meiotickou kompetencí, které byly ošetřeny 0,03 mM koncentrací donoru SNAP během meiotického zrání, zůstaly v 89,9 % ve stádiu zárodečného váčku, zatímco v kontrolní skupině oocytů, podíl oocytů ve stádiu zárodečného váčku klesl na 6,86 % a 80,77 % oocytů pokračovalo v meiotickém zrání do stádia metafáze I. U oocytů s plnou meiotickou kompetencí kultivovaných v kombinaci 5 mM inhibitoru NOS - AG a 0,03 mM donoru NO – SNAP byl zpomalen průběh meiotického zrání a pouze 36,8 % oocytů dosáhlo, po 48 hodinách kultivace, stádia metafáze I a 10,5 % oocytů stádia metafáze II.

Tab. č.6: Vliv kombinace inhibitoru NOS a donoru NO na prasečí oocyty s částečnou (100 – 110 μ m) a plnou meiotickou kompetencí (120 μ m) kultivované 48 hodin *in vitro*

Stupeň meiotické kompetence	5 mM AG + SNAP					
	SNAP	Kontrola	0,03 mM	0.1 mM	1 mM	2 mM
Částečná meiotická kompetence	GV	6.86 \pm 5.1 ^A	89.8 \pm 2.1 ^B	13.8 \pm 1.2 ^A	28.6 \pm 15.4 ^C	55.8 \pm 1.8 ^B
	GVBD	0.0 \pm 0.0 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A	19.0 \pm 5.0 ^B	0.0 \pm 0.0 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A
	LD	4.04 \pm 5.1 ^A	8.2 \pm 2.6 ^A	15.7 \pm 6.6 ^A	59.3 \pm 35.9 ^B	39.6 \pm 4.6 ^B
	MI	80.77 \pm 11.0 ^A	0.0 \pm 0.0 ^B	47.2 \pm 17.5 ^C	9.1 \pm 15.7 ^B	4.5 \pm 0.4 ^B
	MII	7.88 \pm 9.8 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A	4.3 \pm 1.0 ^A	3.0 \pm 0.0 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A
Plná meiotická kompetence	GV	0.0 \pm 0.0 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A	13.8 \pm 1.2 ^A	4.3 \pm 0.5 ^A	26.7 \pm 2.1 ^B
	LD	0.0 \pm 0.0 ^A	21.1 \pm 6.3 ^C	3.6 \pm 0.3 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A	73.3 \pm 13.5 ^B
	MI	6.3 \pm 0.3 ^A	36.8 \pm 8.7 ^C	57.4 \pm 6.2 ^B	26.1 \pm 6.2 ^C	0.0 \pm 0.0 ^A
	MII	93.7 \pm 4.5 ^A	10.5 \pm 1.7 ^B	11.4 \pm 2.3 ^B	34.8 \pm 7.8 ^C	0.0 \pm 0.0 ^B
	Atyp	0.0 \pm 0.0 ^A	31.6 \pm 12.8 ^B	13.8 \pm 2.9 ^A	34.8 \pm 12.5 ^B	0.0 \pm 0.0 ^A

^{A,B,C} Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) v procentech oocytů v daném stádiu meiotického zrání mezi jednotlivými koncentracemi donoru NO SNAP (mezi řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty.

5.2. Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci a časný embryonální vývoj prasečích embryí po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého.

Ke každému dílčímu experimentu byl prováděn kontrolní experiment k vyloučení možnosti spontánní partenogenetické aktivace v našich kultivačních podmínkách. Po 24 hodinách prodloužené kultivace nedocházelo ke spontánní partenogenetické aktivaci prasečích oocytů (0% aktivovaných oocytů z celkového počtu 120 oocytů).

Další kontrolní experiment měl zhodnotit aktivační schopnost oocytů v našich kultivačních podmínkách. Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II, dále byly zbaveny kumulárních buněk a kultivovány v modifikovaném médiu M199 bez P.G. 600 s přidavkem 25 μM kalcium ionoforu A23187 po dobu 5 minut. Poté následovala kultivace v modifikovaném médiu M199 bez P.G. 600 s přidavkem 2mM 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) po dobu 2 hodin (Jílek et al., 2001). Kontrolní experiment prokázal, že v našich kultivačních podmínkách jsou oocyty schopné partenogenetické aktivace. Úspěšně se aktivovalo 82,3% oocytů z celkového počtu 120 oocytů.

Kontrolní experiment provedený u všech experimentů s pulsačním schématem působení donoru SNAP sloužil, k vyloučení možnosti, že partenogenetická aktivace po pulsačním působení je výsledkem intenzivní manipulace s oocyty, kde bylo napodobováno schéma nejintenzivnějšího pulsačního působení (24krát 10minutová expozice 2 mM SNAP + 10 minutová kultivace v médiu bez SNAP). Proto byly oocyty 48krát přeneseny mezi miskami s médiem bez SNAP a v každé byly kultivovány 10 minut. Následně byly kultivovány dalších 16 hodin v médiu bez SNAP, aby celková doba kultivace dosáhla 24 hodin. Nedošlo k aktivaci žádného z oocytů (0% aktivovaných ze 120 oocytů).

Experiment 1: Vliv cykloheximidu (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů kontinuálním ošetřením donorem oxidu dusnatého

V experimentu 1 byly oocyty ošetřeny kontinuálním způsobem donorem oxidu dusnatého SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamin). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.7 a pro přehlednost jsou ještě výsledky zaneseny do grafu č.1. S prodlužující se délkou kontinuálního ošetření donorem se zvyšoval počet partenogeneticky aktivovaných oocytů. Tento trend byl však patrný jen do doby ošetření 12 hodin donorem SNAP. Kultivace 24 hodin se SNAP už nepřinesla významný vzestup partenogeneticky aktivovaných oocytů. Při kontinuálním ošetření oocytů po dobu jedné hodiny bylo zjištěno 8,7 % partenogeneticky aktivovaných oocytů a při kontinuálním ošetření po dobu 12 hodin už 68,6 %. Počet partenogeneticky aktivovaných oocytů po dobu kultivace 24 hodin s donorem byl 70,4 %.

V dalších experimentech byl do média přidán inhibitor protein syntézy cykloheximid (CHX) nebo inhibitor protein kináz 6-dimetyl aminopurin (6-DMAP). Z grafu č.1 je jasně viditelné, že největší změny byly zaznamenány u 2-hodinového a 3-hodinového ošetření donorem SNAP. Když byly oocyty na počátku kontinuálního ošetření donorem NO vystaveny na dvě hodiny inhibitoru protein syntézy cykloheximidu, zvýšil se počet partenogeneticky aktivovaných oocytů o 19,9 % a když byly oocyty vystaveny inhibitoru na tři hodiny, zvýšilo se procento partenogeneticky aktivovaných oocytů o 27.6 % oproti skupině ošetřené pouze donorem SNAP.

Pokud jsme kultivační médium obohatili o inhibitor protein kináz 6-DMAP, zvýšené procento aktivovaných oocytů bylo zaznamenáno už při hodinové kultivaci s donorem SNAP. Bylo pozorováno, že při hodinové kultivaci se SNAP, zvýšil 6-DMAP podíl aktivovaných oocytů z 8,7 % na 26% a při 2-hodinové kultivaci ze 14,3 % na 40,7 % a při 3 hodinové kultivaci z 16,1% na 44,9 %.

Tab. č.7.: Efekt inhibitoru protein syntézy cykloheximidu CHX nebo inhibitoru protein kináz 6-DMAP na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů kontinuálním ošetřením donorem oxidu dusnatého SNAP.

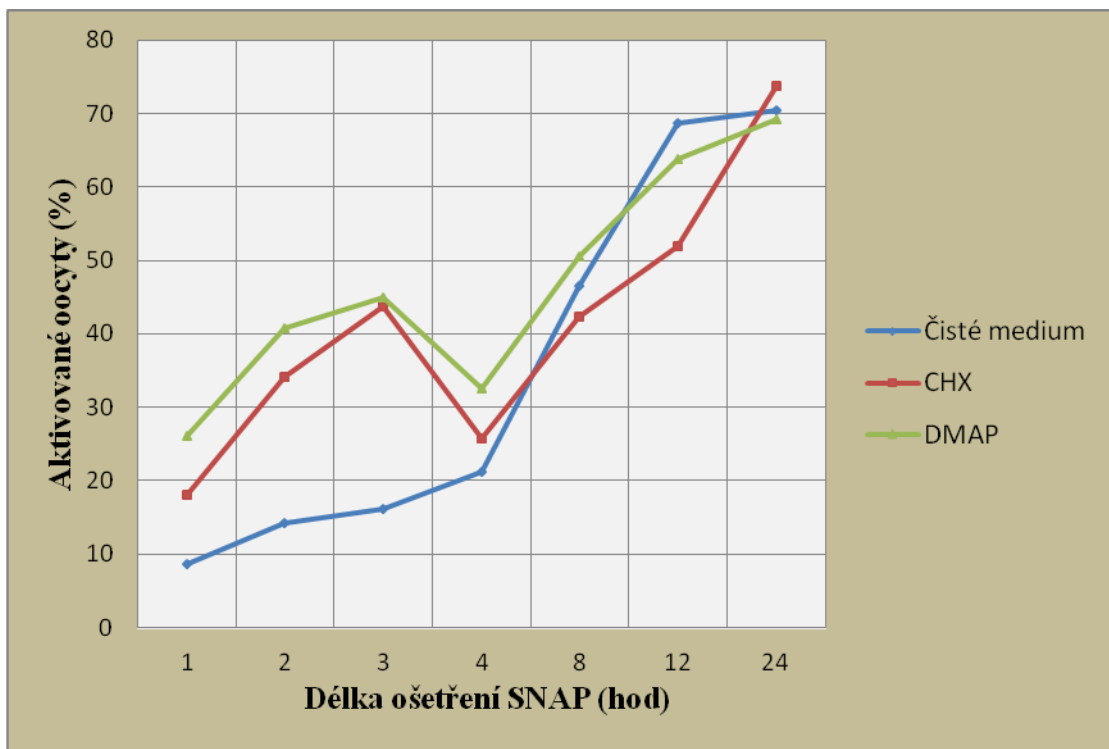
Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak vystaveny na různě dlouhou dobu účinku 2 mM SNAP. Po vyjmutí ze SNAP byly oocyty kultivovány v médiu bez SNAP tak, aby celkový čas kultivace byl 24 hodin. První dvě hodiny byly oocyty kultivovány buď jen podle níže uvedeného protokolu (0) nebo byl do média přidáván cykloheximid (2 μM) nebo 6-DMAP (2 mM).

Typ ošetření	Délka ošetření SNAP (hod)	Aktivované oocyty (%)
0	1	8.7 ± 2.6 ^a
0	2	14.3 ± 3.0 ^{ab}
0	3	16.1 ± 3.4 ^{abc}
0	4	21.2 ± 3.8 ^{abcd}
0	8	46.5 ± 3.6 ^{gh}
0	12	68.6 ± 2.9 ^j
0	24	70.4 ± 2.3 ^j
CHX	1	18.1 ± 2.5 ^{abcd}
CHX	2	34.2 ± 3.8 ^{cdefg}
CHX	3	43.7 ± 3.9 ^{fgh}
CHX	4	25.7 ± 3.1 ^{bcd}
CHX	8	42.3 ± 2.5 ^{efgh}
CHX	12	51.9 ± 2.7 ^{hi}
CHX	24	73.8 ± 2.2 ^j
6-DMAP	1	26.1 ± 4.1 ^{bcde}
6-DMAP	2	40.7 ± 3.9 ^{efgh}
6-DMAP	3	44.9 ± 3.1 ^{fgh}
6-DMAP	4	32.6 ± 3.5 ^{cdef}
6-DMAP	8	50.5 ± 3.6 ^{hi}
6-DMAP	12	63.8 ± 2.8 ^{ij}
6-DMAP	24	69.2 ± 3.7 ^j

^{a,b,c,d,e,f,g} Statisticky významné rozdíly v podílu partenogeneticky aktivovaných oocytů jsou vyznačeny odlišnými superskripty. Celkový počet oocytů v každé pokusné skupině byl 120.

Graf č.1.: Efekt CHX nebo 6-DMAP na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů kontinuálním ošetřením donorem oxidu dusnatého SNAP.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak vystaveny na různě dlouhou dobu účinku 2 mM SNAP. Po vyjmutí ze SNAP byly oocyty kultivovány v médiu bez SNAP tak, aby celkový čas kultivace byl 24 hodin. První dvě hodiny byly oocyty kultivovány buď jen podle níže uvedeného protokolu (0) nebo byl do média přidáván cykloheximid (2 μ M) nebo 6-DMAP (2 mM).



Experiment 2: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů

V experimentu 2 jsme testovali pulsační ošetření oocytů donorem oxidu dusnatého SNAP v koncentraci 2 mM. Tento pokus prokázal, že lepších výsledků v partenogenetické aktivaci oocytů je dosaženo při pulsačním ošetření donorem NO. Pulsační režim ošetření se ukázal jako průkazně efektivnější než stejně dlouhé kontinuální typy ošetření. Oocyty byly vystaveny pulsačnímu ošetření donorem SNAP po dobu 60 min, 120 min, 180 min a 240 min. Ve srovnání s kontinuálním ošetřením donorem z předchozího pokusu byl statisticky významný vliv zjištěn u oocytů, které byly vystaveny pulsačnímu ošetření po dobu 120 a 180 minut. Při kontinuálním ošetření donorem SNAP po dobu 120 minut bylo pozorováno 14,3 % partenogeneticky aktivovaných oocytů, zatímco při stejně dlouhém pulsačním ošetření bylo sledováno statisticky vyšší procento partenogeneticky aktivovaných oocytů v závislosti na typu a počtu jednotlivých ošetření (např. ošetření - SNAP 6 x 20 minut vedlo k partenogenetické aktivaci 45,8 % oocytů a ošetření – SNAP 12 x 10 minut indukovalo partenogenetickou aktivaci u 63,3 % oocytů. Při kontinuálním ošetření donorem NO po dobu 180 minut bylo pozorováno 16,1 % partenogeneticky aktivovaných oocytů, zatímco při stejně dlouhém pulsačním ošetření bylo opět sledováno statisticky významně vyšší procento partenogeneticky aktivovaných oocytů v závislosti na typu a počtu jednotlivých ošetření (např. ošetření – SNAP 6 x 30 minut vedlo k partenogenetické aktivaci 40,8 % oocytů a ošetření – SNAP 9 x 20 minut navodilo partenogenetickou aktivaci u 54,2 % oocytů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.8 a pro přehlednost jsou tabulky č.8, č.9, č.10 spojeny do grafu č.2.

Tab. č.8.: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin.

Celkový čas expozice (min)	Počet ošetření	Typ ošetření	Délka jednotlivého ošetření	Aktivované oocyty (%)
60	2	0	30 min	23.3 ± 3.8 ^{abcd}
60	3	0	20 min	20.0 ± 3.6 ^a
60	6	0	10 min	26.7 ± 4.0 ^{abcd}
120	4	0	30 min	53.3 ± 4.6 ^{fg}
120	6	0	20 min	45.8 ± 4.5 ^{def}
120	12	0	10 min	63.3 ± 4.3 ^g
180	6	0	30 min	40.8 ± 4.5 ^{def}
180	9	0	20 min	54.2 ± 4.5 ^{fg}
180	18	0	10 min	48.3 ± 0.5 ^{ef}
240	8	0	30 min	37.5 ± 4.4 ^{bcdef}
240	12	0	20 min	32.5 ± 4.2 ^{abcde}
240	24	0	10 min	35.0 ± 4.3 ^{bcde}

^{a,b,c,d,e,f,g} Statisticky významné rozdíly v podílu partenogeneticky aktivovaných oocytů jsou vyznačeny odlišnými superskripty. Celkový počet oocytů v každé pokusné skupině byl 120.

Experiment 3: Vliv cykloheximidu (CHX) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého

V experimentu 3 jsme testovali pulsační ošetření oocytů 2 mM donoru SNAP v kombinaci s ošetřením inhibitorem protein syntézy cykloheximidem (CHX). Pulsační režimy ošetření byly stejné jako v Experimentu 2 a pouze navíc byly doplněny o ošetření oocytů 2 μ M cykloheximidu během prvních dvou hodin kultivace. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.9.

Pulsační systém ošetření v kombinaci s cykloheximidem byl průkazně účinnější než kontinuální systém ošetření.

Při srovnání neúčinnějšího pulsačního ošetření s cykloheximidem (3 pulsy SNAP každý o délce 20 minut) s neúčinnějším pulsačním ošetřením bez cykloheximidu (Experiment 2 – 12 pulsů, každý o délce 10 minut), je podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů po ošetření cykloheximidem průkazně vyšší (83 vs. 63 %, $P < 0.05$). To dále potvrzuje, že ošetření cykloheximidem má na partenogenetickou aktivaci oocytů pulsačním režimem pozitivní vliv.

Tab. č.9: Vliv pulsačního ošetření NO-donorem SNAP v kombinaci s cykloheximidem na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin.

Celkový čas expozice (min)	Počet ošetření	Typ ošetření	Délka jednotlivého ošetření	Aktivované oocyty (%)
60	2	CHX	30 min	38.3 ± 2.9 ^{ab}
60	3	CHX	20 min	83.0 ± 4.1 ^e
60	6	CHX	10 min	32.7 ± 3.0 ^a
120	4	CHX	30 min	49.3 ± 4.4 ^{bc}
120	6	CHX	20 min	70.8 ± 4.2 ^d
120	12	CHX	10 min	59.3 ± 4.1 ^{cd}
180	6	CHX	30 min	43.8 ± 3.6 ^{ab}
180	9	CHX	20 min	45.2 ± 2.9 ^{abc}
180	18	CHX	10 min	72.3 ± 1.8 ^{de}
240	8	CHX	30 min	38.5 ± 3.5 ^{ab}
240	12	CHX	20 min	44.5 ± 4.4 ^{ab}
240	24	CHX	10 min	39.0 ± 3.7 ^{ab}

^{a,b,c,d,e} Statisticky významné rozdíly v podílu partenogeneticky aktivovaných oocytů jsou vyznačeny odlišnými superskripty. Celkový počet oocytů v každé pokusné skupině byl 120.

Experiment 4: Vliv 6-dimetyl aminopurinu (6-DMAP) na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů po pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého

V experimentu 4 jsme testovali pulsační ošetření oocytů 2 mM donoru SNAP v kombinaci s ošetřením inhibitorem protein kináz 6-dimetyl aminopurinem (6-DMAP). Pulsační režimy ošetření byly stejné jako v Experimentu 2 a navíc byly doplněny o ošetření oocytů 2 mM 6-DMAP během prvních dvou hodin kultivace. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č.10.

Bylo opět prokázáno, že kombinace pulsačního ošetření donorem SNAP v kombinaci s 6-DMAP je účinnější než kontinuální ošetření oocytů.

Při srovnání nejúčinnějšího pulsačního ošetření s 6-DMAP (3 pulsy SNAP každý o délce 20 minut) s nejúčinnějším pulsačním ošetřením bez 6-DMAP (Experiment 2 – 12 pulsů, každý o délce 10 minut), je podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů po ošetření s 6-DMAP průkazně vyšší (78 vs. 63 %, $P < 0.05$). Zmíněný efekt je dobře viditelný na grafu č.2. To dále potvrzuje, že ošetření donorem SNAP v kombinaci s 6-DMAP má na partenogenetickou aktivaci oocytů pulsačním režimem pozitivní vliv.

Tab. č.10.: Vliv pulsačního ošetření NO-donorem SNAP v kombinaci 6-DMAP na partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin.

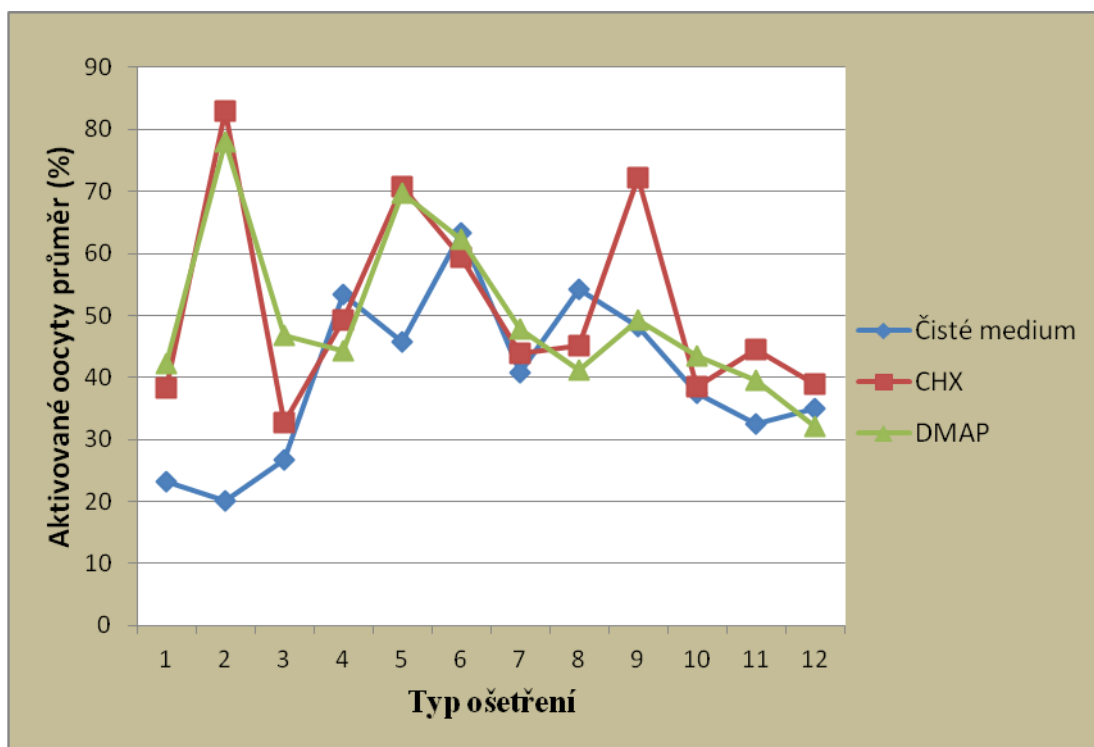
Celkový čas expozice (min)	Počet ošetření	Typ ošetření	Délka jednotlivého ošetření	Aktivované oocyty (%)
60	2	6-DMAP	30 min	42.3 ± 2.7 ^{ab}
60	3	6-DMAP	20 min	78.0 ± 2.9 ^d
60	6	6-DMAP	10 min	46.7 ± 3.1 ^b
120	4	6-DMAP	30 min	44.3 ± 4.2 ^{ab}
120	6	DMAP	20 min	69.8 ± 4.1 ^{cd}
120	12	DMAP	10 min	62.3 ± 4.0 ^c
180	6	DMAP	30 min	47.8 ± 3.8 ^b
180	9	DMAP	20 min	41.2 ± 4.4 ^{ab}
180	18	DMAP	10 min	49.3 ± 2.9 ^b
240	8	DMAP	30 min	43.5 ± 3.3 ^{ab}
240	12	DMAP	20 min	39.5 ± 3.7 ^{ab}
240	24	DMAP	10 min	32.0 ± 3.9 ^a

a,b,c,d. Statisticky významné rozdíly v podílu aktivovaných oocytů jsou vyznačeny odlišnými superskripty.

Celkový počet oocytů v každé pokusné skupině byl 120.

Graf č.2.: Porovnání vlivu pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP na partenogenetickou aktivaci oocytů v kombinaci s 6-DMAP nebo s CHX

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin.



Vysvětlivky ke grafu: Jednotlivá čísla na ose x zobrazují jednotlivé pulsační typy ošetření.

Typ ošetření	Celkový čas expozice (min)	Počet ošetření	Délka jednotlivého ošetření
1	60	2	30 min
2	60	3	20 min
3	60	6	10 min
4	120	4	30 min
5	120	6	20 min
6	120	12	10 min
7	180	6	30 min
8	180	9	20 min
9	180	18	10 min
10	240	8	30 min
11	240	12	20 min
12	240	24	10 min

Experiment 5: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP v kombinaci s cykloheximidem nebo 6-dimetyl aminopurinem na časný vývoj partenogenetických embryí

V experimentu 5 jsme ověřovali časný embryonální vývoj partenogenetických embryí. Pro naše účely jsme využili nejúčinnější typy ošetření, které jsme prověřili v předchozích pokusech. Zvolili jsme ta ošetření, po kterých bylo partenogeneticky aktivováno více než 50% oocytů. Jako kontrolu jsme použili oocyty aktivované kalcium ionoforem v kombinaci s 6-DMAP (Jílek et al., 2001).

V tabulce č.11 a grafu č.3 jsou shrnuty výsledky experimentu, které prokazují, že pulsační ošetření donorem SNAP vyvolalo vyšší podíl rýhujících se embryí než kontinuální ošetření donorem SNAP.

Při kontinuálním ošetření donorem oxidu dusnatého se embrya nevyvíjela za stádium 4 buněk. Ani přidavek cykloheximidu nebo 6-DMAP nepřinesl očekávané zlepšení.

Při pulsačním ošetření donorem oxidu dusnatého embrya dosáhla dokonce stádia moruly a blastocysty. Při 4 pulsech trvajících každý 30 minut dosáhlo 18,3 % embryí stádia moruly a 6,7 % embryí stádia blastocysty. Při 12 pulsech trvajících každý 10 minut bylo pozorováno 10 % embryí ve stádiu moruly a 2,5 % embryí ve stádiu blastocysty. Při 9 pulsech trvajících každý 20 minut bylo pozorováno jen 5,8 % embryí ve stádiu moruly a do blastocysty se žádné embryo nevyvíjelo.

Režimy kombinující pulsační ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP s cykloheximidem nebo 6-DMAP tedy nepřinesly očekávané zlepšení časného vývoje partenogenetických embryí.

Tab č.11. Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP v kombinaci s cykloheximidem (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinem (DMAP) na časný embryonální vývoj partenogenetických embryí.

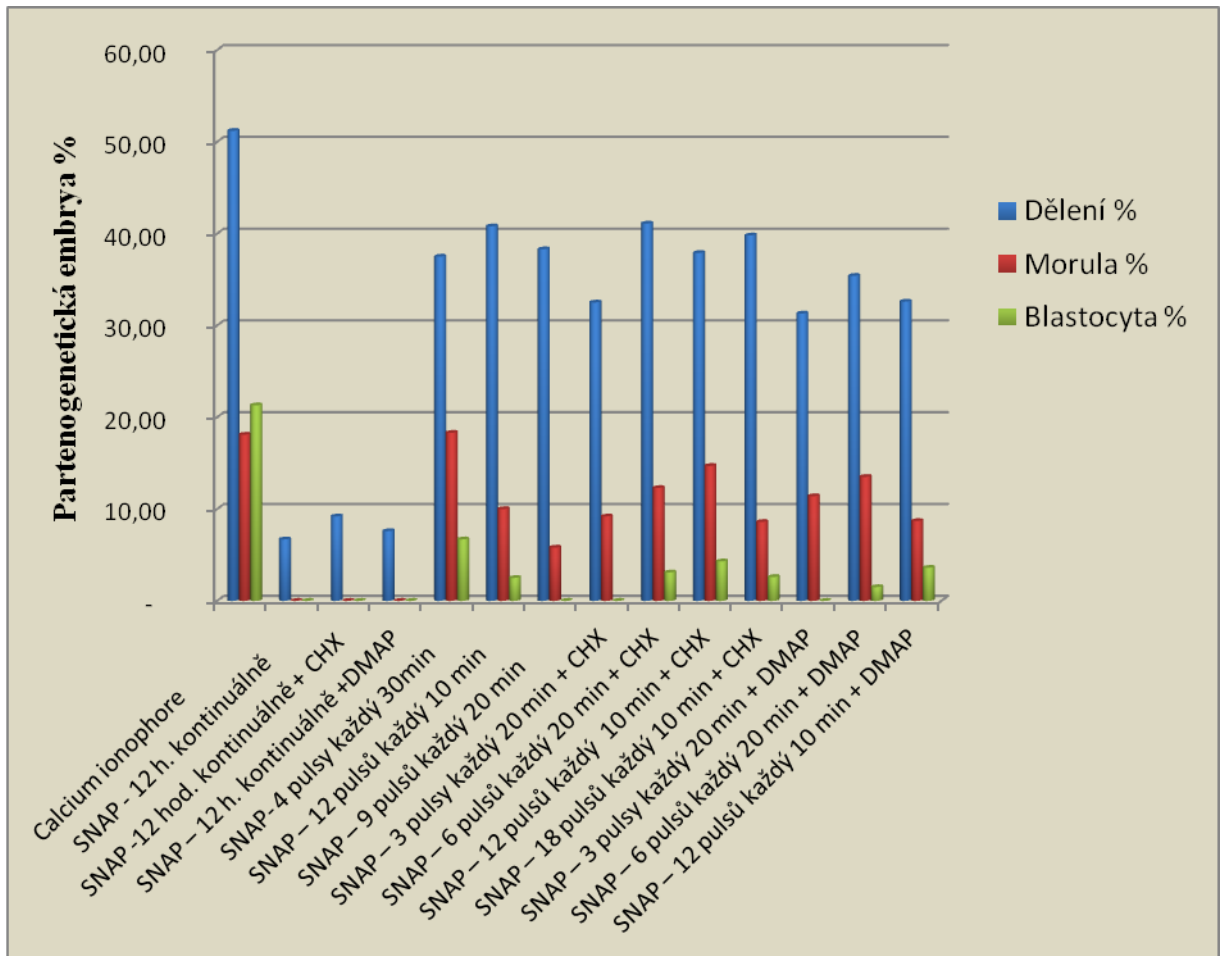
Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin. Následně pak byla embrya kultivována 7 dní v médiu NCSU 23.

Typ ošetření	Partenogenetická embrya (%)		
	Rýhování	Morula	Blastocysta
Kalcium ionofor A23187	51.2±5.6 ^a	18.1±2.8 ^{ab}	21.3±4.3 ^a
SNAP - 12 h. kontinuálně	6.7±2.3 ^c	0.0	0.0
SNAP -12 h. kontinuálně + CHX	9.2±3.1 ^c	0.0	0.0
SNAP – 12 h. kontinuálně + 6-DMAP	7.6± 4.3 ^c	0.0	0.0
SNAP- 4 pulsy každý 30min	37.5±4.4 ^{ab}	18.3±3.5 ^a	6.7±2.3 ^b
SNAP – 12 pulsů každý 10 min	40.8±4.5 ^{ab}	10.0±2.7 ^a	2.5±2.7 ^b
SNAP – 9 pulsů každý 20 min	38.3±4.3 ^{ab}	5.8±2.1 ^b	0.0
SNAP – 3 pulsy každý 20 min + CHX	32.5±3.2 ^b	9.2±3.2 ^{ab}	0.0
SNAP – 6 pulsů každý 20 min + CHX	41.1±5.5 ^{ab}	12.3±2.8 ^{ab}	3.1±1.8 ^b
SNAP – 12 pulsů každý 10 min + CHX	37.9±3.9 ^{ab}	14.7±2.4 ^{ab}	4.3±1.5 ^b
SNAP – 18 pulsů každý 10 min + CHX	39.8±4.6 ^{ab}	8.6±3.5 ^{ab}	2.6±1.2 ^b
SNAP – 3 pulsy každý 20 min + 6-DMAP	31.3±4.9 ^b	11.4±3.2 ^{ab}	0.0
SNAP – 6 pulsů každý 20 min + 6-DMAP	35.4±5.8 ^b	13.5±3.3 ^{ab}	1.5±1.4 ^b
SNAP – 12 pulsů každý 10 min + 6-DMAP	32.6±4.9 ^b	8.7±3.7 ^{ab}	3.6±1.7 ^b

^{a, b, c} Statisticky významné rozdíly mezi embryi stejného stádia vývoje, pocházejícími z oocytů partenogeneticky aktivovaných různými ošetřeními (tj. rozdíly ve sloupcích,) jsou označeny různými superskripty. Celkový počet oocytů v každé experimentální skupině byl 120.

Graf č.3.: Vliv pulsačního ošetření donorem oxidu dusnatého SNAP v kombinaci s cykloheximidem (CHX) nebo 6-dimetyl aminopurinem (DMAP) na časný embryonální vývoj partenogenetických embryí.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin do stádia metafáze II a následně pak byly vystaveny různým pulsačním aktivačním režimům. Po skončení příslušného pulsačního aktivačního režimu byly oocyty kultivovány v médiu bez přítomnosti SNAP tak, aby celková doba trvání kultivace byla 24 hodin. Následně pak byla embrya kultivována 7 dní v médiu NCSU 23.



V provedených pokusech jsme prokázali, že přidavek inhibitoru protein kináz 6-dimetyl aminopurin nebo přidavek inhibitoru protein syntézy cykloheximidu zvyšuje podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů v kombinaci s pulsačním ošetřením prasečích oocytů donorem oxidu dusnatého SNAP, avšak nemá významný vliv s ohledem na časný embryonální vývoj partenogenetických embryí.

5.3. Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů

Tento experiment byl zaměřen na sledování vlivu aktivátorů různým izotopů protein kinázy C na průběh stárnutí prasečích oocytů. V kontrolním experimentu jsme se zaměřili na popis průběhu stárnutí prasečích oocytů v našich kultivačních podmínkách. Výsledky tohoto experimentu jsou shrnuty v tabulce č.12.

Během prvního dne stárnutí zůstává většina oocytů ve stádiu metafáze II (98%). Už druhý den stárnutí je ale patrný významný pokles v podílu oocytů setrvávajících ve stádiu MII (35 %) a naopak je patrný významný nárůst podílu oocytů, které podlely spontánní partenogenetické aktivaci nebo fragmentaci. Třetí den stárnutí v *in vitro* podmínkách podíl oocytů v metafázi MII dále klesá a podíl fragmentovaných oocytů roste. Čtvrtý den klesá podíl aktivovaných oocytů a stoupá podíl oocytů podléhajících lýze. Pátý den stárnutí už nedochází k signifikantním změnám.

Tab. č.12.: Průběh stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin v *in vitro* podmínkách do stádia metafáze II a následně byly zbaveny kumulárních buněk a dále kultivovány po dobu 1, 2, 3, 4 nebo 5 dní v *in vitro* podmínkách. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocytu (%)	Délka stárnutí <i>in vitro</i> (dny)				
	1	2	3	4	5
Metafáze II	98 ^a	35 ^b	22 ^c	16 ^c	23 ^c
Aktivované oocyty	2 ^a	39 ^{bc}	45 ^c	30 ^b	34 ^b
Fragmentované oocyty	0 ^a	17 ^b	28 ^c	24 ^{bc}	20 ^{bc}
Lytické oocyty	0 ^a	9 ^a	5 ^a	30 ^b	37 ^b

^{a,b,c} Statisticky významné rozdíly mezi různě stárnoucími oocyty téže vývojové kategorie (tj. rozdíly uvnitř řádků tabulky) jsou znázorněny různými superskripty.

Nejvýraznější změny v morfologii stárnoucích prasečích oocytů lze pozorovat třetí den stárnutí, kdy oocytů ve stádiu MII zůstává již minimální podíl, zatímco podíl fragmentovaných oocytů a spontánně partenogeneticky aktivovaných oocytů dosahuje maxima. Podíl lyzovaných oocytů ještě signifikantně nestoupá. Z těchto důvodů jsme zvolili pro další experimenty vystavení oocytů stárnutí po dobu tři dnů.

Experiment 1: Vliv aktivátoru PKC, phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 1 jsme prokázali statisticky průkazný pokles podílu fragmentovaných oocytů při jejich třídenním stárnutí v přítomnosti phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA), jež je aktivátorem kalcium-dependentních a kalcium-independentních PKC. Při nulové koncentraci PMA bylo po třech dnech stárnutí 26 % fragmentovaných oocytů a při koncentraci 25 mM PMA už bylo sníženo procento fragmentovaných oocytů na 9 %. Při koncentracích 50 a 100 nM PMA byla fragmentace zcela potlačena (viz tabulka č.13 a graf č.4).

Tab.č.13.: Vliv aktivátoru PKC, phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

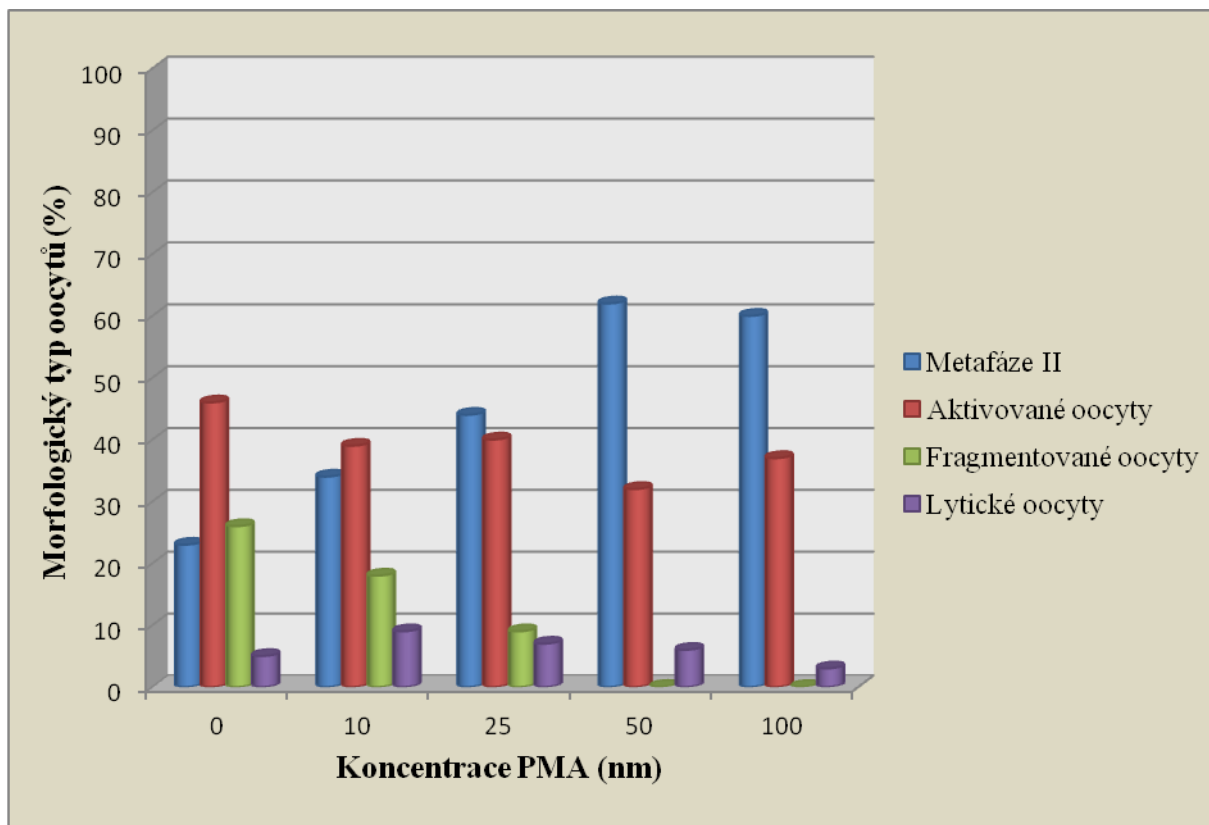
Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro*, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přídatkem PMA. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocytu (%)	Koncentrace PMA (nM)				
	0	10	25	50	100
Metafáze II	23 ± 2 ^a	34 ± 3 ^{ab}	44 ± 2 ^b	62 ± 5 ^c	60 ± 7 ^c
Aktivované oocyty	46 ± 6 ^a	39 ± 7 ^a	40 ± 4 ^a	32 ± 5 ^a	37 ± 3 ^a
Fragmentované oocyty	26 ± 3 ^a	18 ± 6 ^{ab}	9 ± 2 ^{bc}	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c
Lytické oocyty	5 ± 5 ^a	9 ± 4 ^a	7 ± 5 ^a	6 ± 2 ^a	3 ± 2 ^a

^{a,b,c} Statisticky významné odlišné podíly jednotlivých kategorií oocytů mezi různými ošetřeními (tj. rozdily uvnitř řádků) jsou označeny různými superskripty.

Graf. č.4.: Vliv aktivátoru PKC, phorbol-12-myristyl-13-acetátu (PMA), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Oocyty byly kultivovány 48 hodin *in vitro*, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem PMA. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.



Experiment 2: Vliv aktivátoru PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 2 jsme sledovali vliv různých koncentrací kalcium-dependentního aktivátoru PKC - OLE (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu). Ani nejvyšší koncentrace 100 nM OLE nedokázala potlačit fragmentaci prasečích oocytů stárnoucích v podmínkách *in vitro* (viz. tabulka č.14 a graf č.5).

Tab. č.14.: Vliv aktivátoru PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

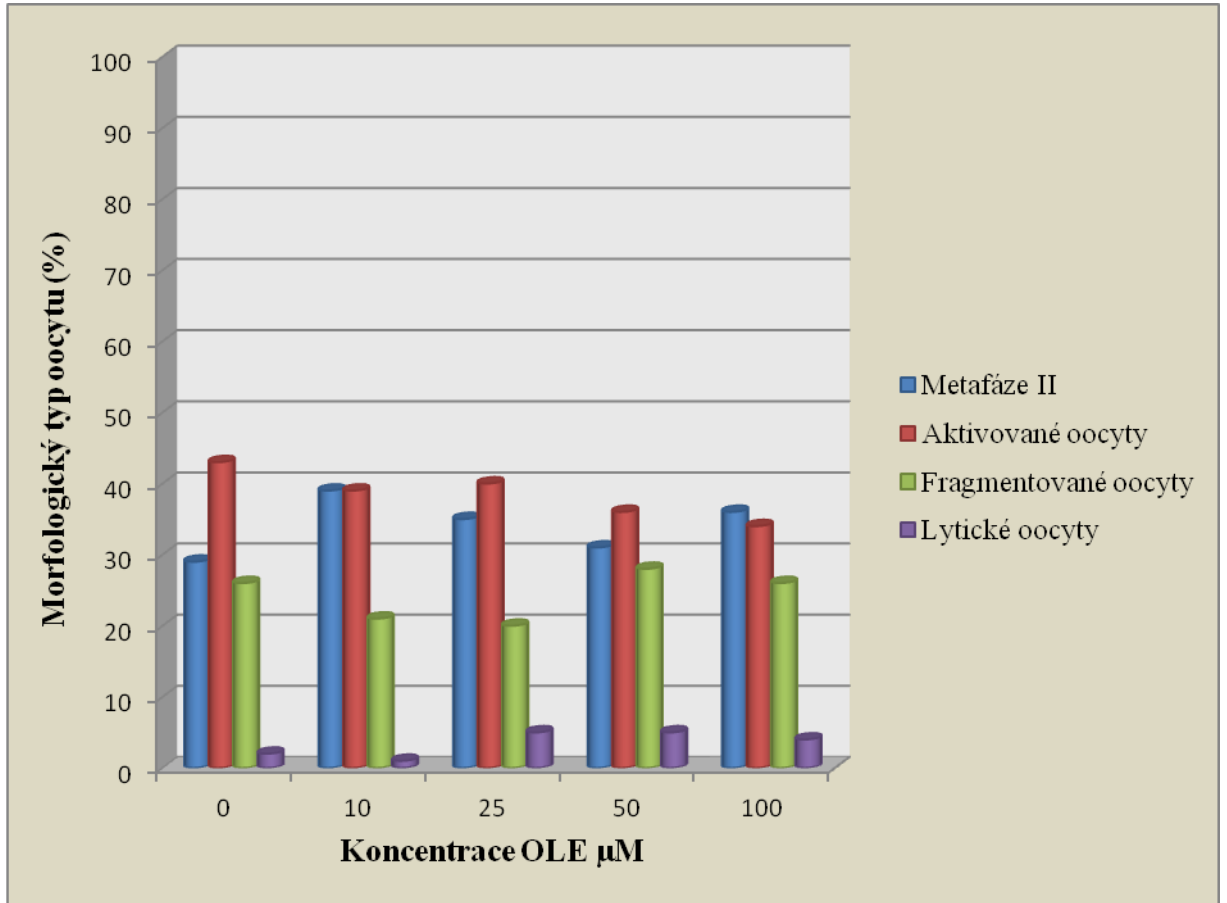
Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem OLE. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocytu (%)	Koncentrace OLE (nM)				
	0	10	25	50	100
Metafáze II	29 ± 4 ^a	39 ± 5 ^a	35 ± 3 ^a	31 ± 2 ^a	36 ± 4 ^a
Aktivované oocyty	43 ± 3 ^a	39 ± 7 ^a	40 ± 7 ^a	36 ± 5 ^a	34 ± 6 ^a
Fragmentované oocyty	26 ± 3 ^a	21 ± 5 ^a	20 ± 6 ^a	28 ± 7 ^a	26 ± 8 ^a
Lytické oocyty	2 ± 3 ^a	1 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	5 ± 2 ^a	4 ± 1 ^a

^a Podíly jednotlivých kategorií oocytů mezi různými ošetřeními (tj. rozdíly uvnitř řádků) se statisticky významně nelišily.

Graf č.5.: Vliv aktivátoru PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem OLE. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.



Experiment 3: Vliv aktivátoru PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů

V experimentu 3 jsme sledovali účinek aktivátoru kalcium-independentních izotopů PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM) na stárnutí prasečích oocytů. Podobně jako v předchozím experimentu, žádná z použitých koncentrací aktivátoru DIPALM nepotlačila fragmentaci oocytů stárnoucích *in vitro* (viz tabulka č.15 a graf č.6).

Tab. č.15.: Vliv aktivátoru PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

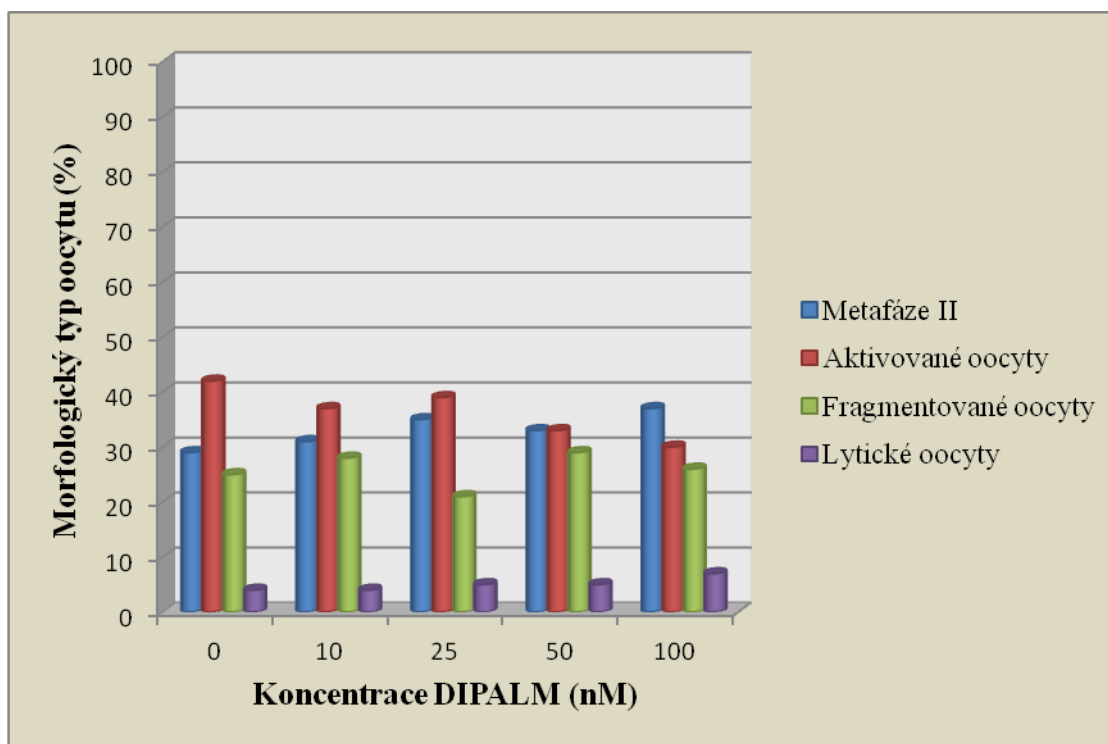
Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem DIPALM. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocytu (%)	Koncentrace DIPALM (nM)				
	0	10	25	50	100
Metafáze II	29 ± 5 ^a	31 ± 7 ^a	35 ± 6 ^a	33 ± 4 ^a	37 ± 6 ^a
Aktivované oocyty	42 ± 4 ^a	37 ± 8 ^a	39 ± 7 ^a	33 ± 4 ^a	30 ± 5 ^a
Fragmentované oocyty	25 ± 4 ^a	28 ± 5 ^a	21 ± 4 ^a	29 ± 3 ^a	26 ± 2 ^a
Lytické oocyty	4 ± 3 ^a	4 ± 2 ^a	5 ± 4 ^a	5 ± 3 ^a	7 ± 1 ^a

^a Podíly jednotlivých kategorií oocytů mezi různými ošetřeními (tj. rozdílů uvnitř řádků) se statisticky významně nelišily.

Graf č.6.: Vliv aktivátoru PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem DIPALM. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.



Experiment 4: Vliv aktivátoru PKC, 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerolu (STEAR), na stárnutí prasečích oocytů

Na základě předchozích experimentů jsme usoudili, že k potlačení fragmentace u stárnoucích oocytů prasete musí být aktivovány jak kalcium-dependentní, tak i kalcium-independentní PKC. Tento předpoklad jsme ověřili experimentem 4, kdy jsme kultivovaly oocyty během stárnutí *in vitro* se 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerolem (STEAR), který je, podobně jako PMA, aktivátorem kalcium-dependentních i kalcium-independentních PKC. STEAR v koncentraci 100 μM výrazně potlačil fragmentaci stárnoucích oocytů (tabulka č.16 a graf č.7).

Tab. č.16: Vliv aktivátoru PKC, 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerolu (STEAR), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

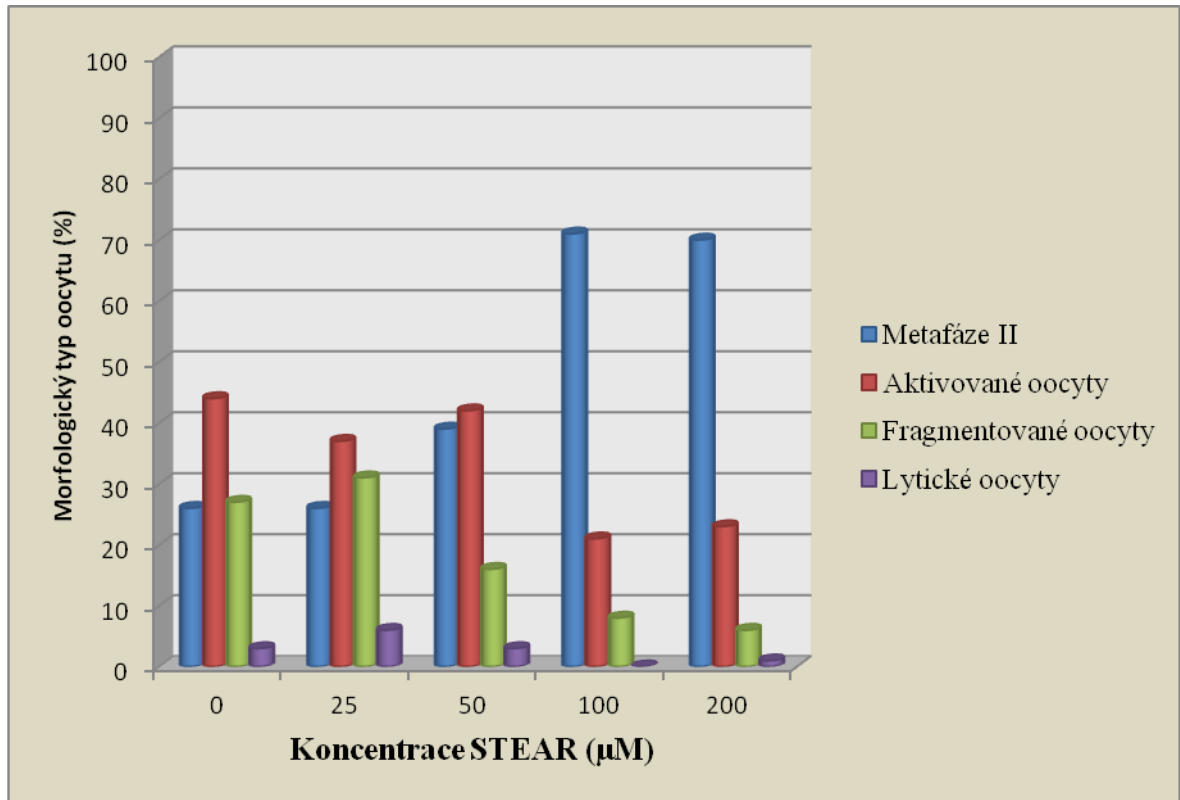
Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přídavkem STEAR. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocytu (%)	Koncentrace STEAR (μM)				
	0	25	50	100	200
Metafáze II	26 ± 5^a	26 ± 6^a	39 ± 4^a	71 ± 2^b	70 ± 6^b
Aktivované oocyty	44 ± 1^a	37 ± 3^{ab}	42 ± 5^a	21 ± 3^b	23 ± 4^b
Fragmentované oocyty	27 ± 2^{ab}	31 ± 4^a	16 ± 2^{bc}	8 ± 1^c	6 ± 4^c
Lytické oocyty	3 ± 2^a	6 ± 4^a	3 ± 3^a	0 ± 0^a	1 ± 1^a

^{a,b,c} Statisticky významně odlišné podíly jednotlivých kategorií oocytů mezi různými ošetřeními (tj. rozdíly uvnitř řádků) jsou označeny různými superskripty.

Graf č.7: Vliv aktivátoru PKC, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerolu (STEAR), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu s přidavkem STEAR. Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.



Experiment 5: Vliv kombinace aktivátorů PKC, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) a dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM), na stárnutí prasečích oocytů

Pozitivní efekt aktivace jak kalcium-dependentních tak i kalcium-independentních PKC prokázal i experiment 5, v kterém byly dozrálé oocyty kultivovány po tři dny v kombinaci aktivátorů OLE a DIPALM. Zatímco jednotlivě ani jeden z aktivátorů v testované koncentraci fragmentaci stárnoucích oocytů nepotlačil, při kombinaci obou aktivátorů bylo dosaženo významné redukce fragmentace stárnoucích oocytů (tabulka č.17 a graf č.8).

Tab. č.17.: Vliv kombinace aktivátorů PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM) a 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

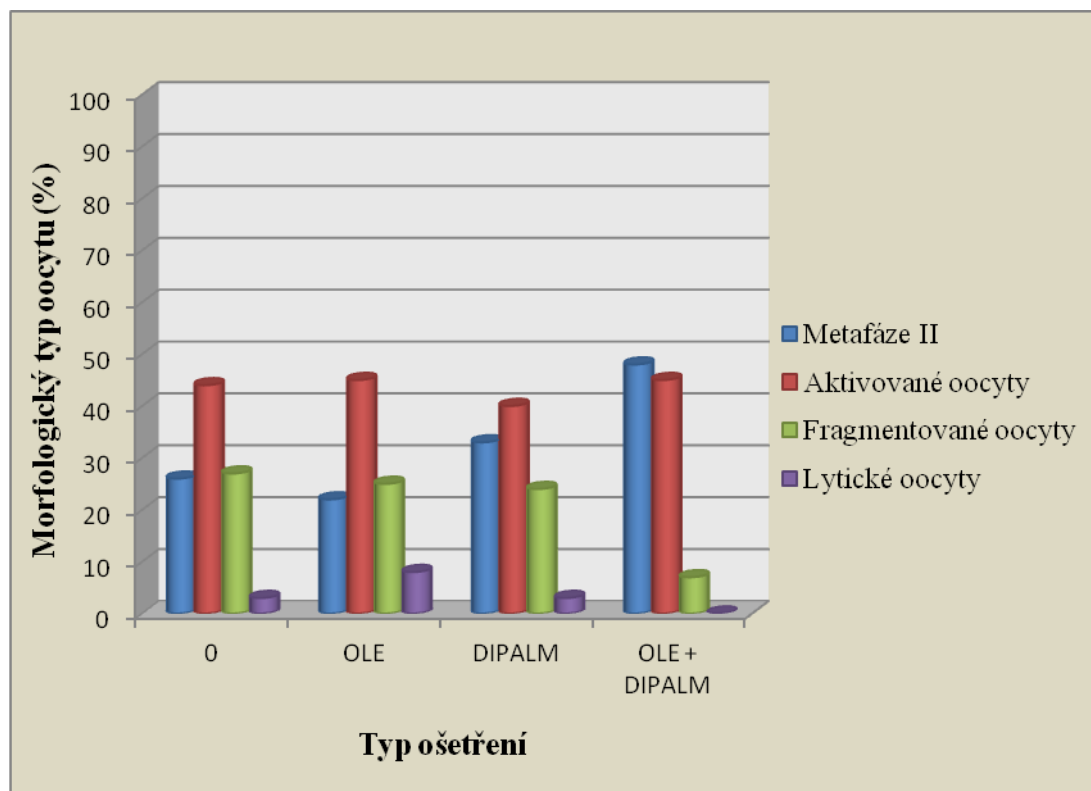
Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu bez přídavku (0), s 10 μ M OLE (OLE), se 100 nM DIPALM (DIPALM) a nebo v kombinaci - s 10 μ M OLE a 100 nM DIPALM (OLE + DIPALM). Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.

Morfologický typ oocyty (%)	Typ ošetření			
	0	OLE	DIPALM	OLE + DIPALM
Metafáze II	26 \pm 2 ^a	22 \pm 2 ^a	33 \pm 3 ^{ab}	48 \pm 3 ^b
Aktivované oocyty	44 \pm 2 ^a	45 \pm 3 ^a	40 \pm 3 ^a	45 \pm 2 ^a
Fragmentované oocyty	27 \pm 1 ^a	25 \pm 4 ^a	24 \pm 3 ^a	7 \pm 3 ^b
Lytické oocyty	3 \pm 2 ^a	8 \pm 3 ^a	3 \pm 2 ^a	0 \pm 0 ^a

^{a,b} Statisticky významně odlišné podíly jednotlivých kategorií oocytů mezi různými ošetřeními (tj. rozdíly uvnitř řádků) jsou označeny různými superskripty.

Graf č.8.: Vliv kombinace aktivátorů PKC, dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonia (DIPALM) a 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE), na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*.

Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin, následně zbaveny kumulárních buněk a kultivovány další 3 dny v médiu bez přídavku (0), s 10 μM OLE (OLE), se 100 nM DIPALM (DIPALM) a nebo v kombinaci - s 10 μM OLE a 100 nM DIPALM (OLE + DIPALM). Celkem bylo v každé skupině 120 oocytů.



Experiment 6: Časný embryonální vývoj partenogeneticky aktivovaných stárnoucích oocytů, vystavených během stárnutí účinkům aktivátoru PKC

V pokusu 6 jsme hodnotili schopnost partenogenetické aktivace prasečích oocytů stárnoucích pod vlivem PMA a jejich následný časný embryonální vývoj. Oocyty, stárnoucí 1 den pod vlivem 100 nM PMA byly následně ošetřeny kalcium ionoforem a 6-DMAP (Jílek et al., 2001) a podíl partenogeneticky aktivovaných embryí činil 86%. To je podobné podílu partenogeneticky aktivovaných oocytů, jež byly partenogeneticky aktivovány stejným

aktivačním režimem po 1 dni stárnutí bez PMA (93% partenogeneticky aktivovaných), nebo u oocytů, které byly partenogeneticky aktivovány tímto aktivačním režimem ihned po 48 hodinách kultivace – bez vystavení stárnutí (87% partenogeneticky aktivovaných).

Při testování časného embryonálního vývoje byl u oocytů, které byly aktivovány po 1 dni stárnutí v PMA, pozorován vyšší podíl rýhujících se embryí než u oocytů stárnoucí bez PMA. Podíl oocytů, které se po stárnutí 1 den v PMA a následné partenogenetické aktivaci vyvinuly do stádia moruly (10%) nebo blastocysty (12%), byl stejný jako u oocytů, které nebyly během stárnutí vystaveny PMA. Podíl blastocyst byl nižší než po partenogenetické aktivaci oocytů, které nebyly vůbec vystaveny stárnutí a byly partenogeneticky aktivovány na konci meiotického zrání (tabulka č.18 a graf č.9).

Tab. č.18.: Časný embryonální vývoj partenogeneticky aktivovaných stárnoucích oocytů, vystavených během stárnutí účinkům aktivátoru PKC.

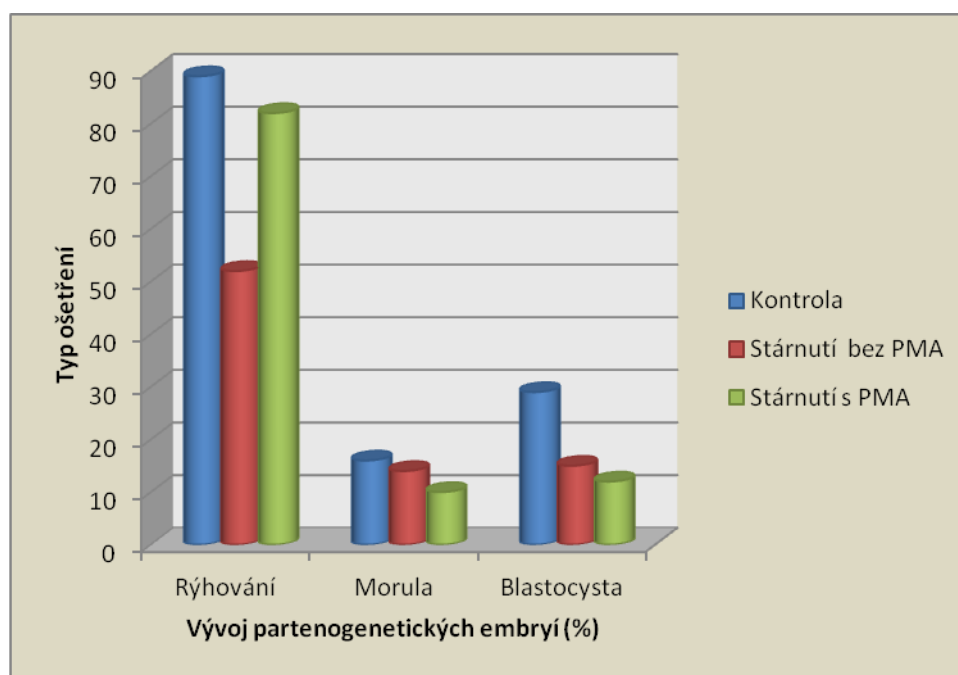
Oocyty dozrálé *in vitro* byly 24 hodin kultivovány v médiu s 0 nebo 100 nM PMA, potom partenogeneticky aktivovány umělým ošetřením (5 minut 25 μ M kalcium ionoforu a 2 hodiny 2mM 6-DMAP) a následně kultivovány 7 dní v kultivačním médiu NCSU23. Kontrolní skupina oocytů byla partenogeneticky aktivována ihned, bez vystavení procesu stárnutí. V každé skupině bylo 120 oocytů.

Typ ošetření	Vývoj partenogenetických embryí (%)		
	Rýhování	Morula	Blastocysta
Kontrola	89 \pm 4 ^a	16 \pm 4 ^a	29 \pm 2 ^a
Stárnutí bez PMA	52 \pm 5 ^b	14 \pm 7 ^a	15 \pm 3 ^b
Stárnutí s PMA	82 \pm 3 ^a	10 \pm 5 ^a	12 \pm 4 ^b

^{a,b}. Statisticky významně odlišné podíly jednotlivých kategorií ve vývoji partenogenetických embryí mezi různými ošetřeními (tj. rozdíly uvnitř řádků) jsou označeny různými superskripty.

Graf č.9.: Časný embryonální vývoj partenogeneticky aktivovaných stárnoucích oocytů, vystavených během stárnutí účinkům aktivátoru PKC.

Oocyty dozrálé *in vitro* byly 24 hodin kultivovány v médiu s 0 nebo 100 nM PMA, potom partenogeneticky aktivovány umělým ošetřením (5 minut 25 μ M kalcium ionoforu a 2 hodiny 2mM 6-DMAP) a následně kultivovány 7 dní v kultivačním médiu NCSU23. Kontrolní skupina oocytů byla partenogeneticky aktivována ihned, bez vystavení procesu stárnutí. V každé skupině bylo 120 oocytů.



V tomto experimentu jsme prokázali, že aktivace protein kináz C má pozitivní vliv na oocyty prasete stárnoucí v podmínkách *in vitro*. Aktivace PKC vedla k výraznému jejich potlačení fragmentace. Aktivace PKC dále dovoluje oocytům udržet si po 24 hodinovém stárnutí schopnost rýhování po partenogenetické aktivaci umělým stimulem, ale nedokáže zabránit snížení schopnosti embryonálního vývoje do stádia blastocysty.

6. Diskuze

Vliv oxidu dusnatého NO na růstovou fázi a zisk meiotické kompetence prasečího oocyty.

Na základě našich experimentů s inhibitory NOS a donorem NO můžeme považovat za potvrzenou významnou roli oxidu dusnatého během růstové periody a procesu nabývání meiotické kompetence u oocyty prasete.

Oba použité inhibitory, jak selektivní kompetitivní iNOS inhibitor aminoguanidin, tak i neselektivní NOS inhibitor L-NAME, blokovaly meiotické zrání jak oocytů s částečnou meiotickou kompetencí, tak i oocytů plně meioticky kompetentních s ukončenou růstovou periodou. Jejich účinek byl reverzibilní. Po aplikaci inhibitorů byl narušen rozpad zárodečného váčku oocytů, což ukazuje na nezbytnost NO pro samotný počátek meiotického zrání. Pro meiotické zrání oocytů prasete se jeví jako klíčová regulace pomocí iNOS izoformy vzhledem k tomu, že po jejím vyblokování je narušen proces zrání podobně, jako po aplikaci neselektivních inhibitorů blokujících všechny NOS současně. Zdá se, že konstitutivní izoformy NOS nejsou schopny, produkcí NO, tuto izoformu nahradit. Důvodem může být částečný efekt iNOS specifického inhibitoru také na eNOS a nNOS izoformu. Nabízí se i alternativní vysvětlení, že produkce NO prostřednictvím iNOS je výrazně vyšší než produkce tohoto gasotransmiteru zbývajícími izoformami NOS. V rozdílech mezi efektem iNOS a efekty dalších izoform NOS se může odrážet také odlišná regulace iNOS a konstitutivních NOS, např. v podílu vápenatých kationtů a kalmodulinu na aktivitě izoform těchto enzymů (Moncada et al., 1991; Lamas et al., 1992; Ignarro et al., 1999).

Blokáda NOS u plně kompetentních oocytů ve stádiu zárodečného váčku zabraňuje oocytům dosáhnout druhé meiotické metafáze a tento vliv inhibitorů NOS je patrný také pokud dojde k zablokování plně kompetentních oocytů až ve stádiu první meiotické metafáze. Mnohem účinnější však byla inhibice zrání oocytů aminoguanidinem, pokud byl přidán k oocytům už ve stádiu zárodečného váčku. Oocyty prasete pravděpodobně v době přechodu mezi metafázemi již nepotřebují tak velká množství NO jako oocyty ve stádiu zárodečného váčku, anebo jsou k jeho účinkům mnohem méně vnímavé, či jsou během přechodu mezi metafázemi regulovány NO vznikajícím z jiné než indukovatelné izoformy NOS. Blok meiotického zrání byl pozorován po inhibici NOS také u oocytů myši, kde však meioticky kompetentní oocyty procházejí zpravidla rozpadem zárodečného váčku a jejich meiotické zrání je zablokováno až mezi stádii první a druhé meiotické metafáze (Bu et al., 2003).

Pozorované změny v meiotickém zrání oocytů po aplikaci inhibitorů NOS se podobaly těm, ke kterým podle literatury dochází při kultivaci oocytů získaných od zvířat s vyblokováním genem pro některou z izoform NOS (Jablonka-Shariff a Olson, 1997; 1998). Inhibitory NOS, v použité dávce, nejsou pro oocyty toxické, protože po reverzi a také kultivaci s neúčinným D-konformerem jsou schopny pokračovat v meiotickém zrání. Po 24hodinové reverzi – tedy kultivaci oocytů s ukončeným růstem kultivovaných nejprve 48 hodin s inhibitorem a následně 24 hodin v médiu bez inhibitoru - došlo k vysokému nárůstu podílu partenogeneticky aktivovaných embryí. Vzhledem k tomu, že aminoguanidin patří mezi kompetitivní inhibitory, je možné, že se během ošetření oocytů hromadí NOS enzym, kterému chybí substrát a po odmytí inhibitoru se začne produkovat NO ve vyšší míře, která je nezbytná pro aktivaci oocytů (Petr et al., 2010). Mechanismus, jakým NO aktivuje oocyty, není jasný. NO může ovlivnit mnoho cílových systémů. Nabízí se například možnost, že NO nitrosyluje ryanodinové receptory, které jsou tak aktivovány (Xu et al., 1998). Aktivace ryanodinových receptorů je schopná navodit partenogenetickou aktivaci u zralých oocytů prasete (Petr et al., 2002). Experimenty na oocytech drápatky *Xenopus laevis* rovněž naznačují, že aktivace oxidem dusnatým je kalcium-dependentní proces (Jeřeta et al., 2012).

V rámci této studie jsme sledovali účinek NO donoru na oocyty s různým stupněm meiotické kompetence. Z experimentů provedených na našem pracovišti bylo známo, že pokud se 2 mM SNAP přidá k oocytům ve druhé meiotické metafázi, dochází ze 71 % během deseti hodin k jejich partenogenetické aktivaci (Petr et al., 2010). Tato koncentrace donoru byla proto použita jako výchozí pro kultivaci oocytů s částečnou meiotickou kompetencí, tak i plnou meiotickou kompetencí a dokončenou růstovou periodou. SNAP je stabilním analogem endogenních S-nitrosothiolů a po penetraci do buňky je z něj oxid dusnatý uvolňován endogenními enzymy a je tedy zdrojem NO *in vivo* (Yamamoto a Bing, 2000; Megson, 2000). Na základě výsledků naší předchozí studie (Petr et al., 2010) se SNAP jevil jako vhodnější donor NO pro ošetření prasečích oocytů nežli SNP, který uvolňuje NO jen na světle a může také uvolňovat pro oocyty škodlivé kyanidové ionty (Butler a Glidwell, 1987). Námi použitá dávka donoru NO 2 – 0,05 mM SNAP však narušovala životnost zrajících prasečích oocytů. Oocyty kultivované s těmito koncentracemi NO-donoru SNAP nezrály a pokud byly následně kultivovány po 24 hodin v médiu bez NO-donoru, pak nepokračovaly ve zrání. NO může poškodit buňky řadou mechanismů. Je známo, že vysoká množství NO vedou v somatických buňkách ke vzniku toxických reakčních produktů (Messmer et al., 1995). V některých typech buněk NO vyvolává apoptózu a poškození DNA (Albina et al., 1993). K čemuž dochází

pravděpodobně také v případě oocyty prasete. Inhibice meiotického zrání vysokými koncentracemi NO, dodanými SNP donorem, byla pozorována také u oocytů myši, zatímco nízké koncentrace NO donoru u těchto oocytů zrání stimulovaly (Jablonka-Shariff a Olson, 1998; Sengoku et al., 2001; Bu et al., 2004; Huo et al., 2005; Tao et al., 2004; 2005).

V naší studii jsme zjistili, že v případě oocyty prasete nedokáže NO donor v nízké koncentraci ovlivnit meiotickou kompetenci oocytů, protože oocyty s částečnou meiotickou kompetencí nebyly v přítomnosti donoru NO schopny prolomit blok metafáze I. Spontánní blok v metafázi I u neúplně meioticky kompetentních oocytů prasete kultivovaných *in vitro* sdílí některé charakteristiky se spontánním meiotickým blokem v metafázi II u meioticky plně kompetentních oocytů. Některá ošetření, která jsou účinná při partenogenetické aktivaci oocytů v metafázi II, se v našich předchozích studiích ukázala jako účinná pro indukci výstupu z bloku v metafázi I u meioticky částečně kompetentních oocytů (Sedmíková et al., 2003). To se ale v případě NO nepotvrdilo. I když je SNAP v 1 mM koncentraci s to aktivovat oocyty prasete po jejich ošetření ve druhé meiotické metafázi z 68% (Petr et al., 2010), pro oocyty s částečnou meiotickou kompetencí, jejichž zrání bylo během kultivace *in vitro* spontánně blokováno v metafázi I, je stejná koncentrace donoru toxická. Zdá se, že oocyty jsou během růstové fáze k působení NO mnohem citlivější nežli oocyty s ukončeným růstem zablokované spontánně ve stádiu druhé meiotické metafáze. Nelze vyloučit ani možnost, že intarcelulární hladiny NO jsou v rostoucích oocytech vyšší a prostřednictvím aktivních NOS je produkováno velké množství endogenního NO a exogenně dodaný NO z NO-donoru pak působí na oocyty toxicky podobně, jako je tomu u některých somatických buněk (Albina et al., 1993; Boje a Arora, 1992; Radons et al., 1994).

O specifitě účinku inhibitorů NOS na zrání meioticky neúplně kompetentních i meioticky plně kompetentních oocytů prasete v naší studii svědčí fakt, že efekt těchto inhibitorů lze alespoň částečně zvrátit exogenně podaným NO prostřednictvím NO-donoru. Po podání donoru většina oocytů prodělá GVBD, ale jejich zrání v drtivé většině nepokračuje za stádium první meiotické metafáze. Do stádia druhé metafáze dospělo malé procento oocytů.

Naše experimenty potvrdily zapojení NO do regulace zrání prasečích oocytů jak během růstové fáze a zisku meiotické kompetence, tak i u oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí. Mechanismus, jakým NO působí na meiotické zrání savčích oocytů *in vitro*, není zcela jasný. NO se v buňkách váže na hemovou skupinu rozpustné guanylát cyklázy (sGC) a tak zvyšuje produkci cyklického cGMP. cGMP snižuje hladinu cAMP a ovlivňuje meiotické zrání aktivací cAMP-fosfodiesterázy (Hofmann et al., 2000). Na druhé

straně existují velice přesvědčivé důkazy, že NO může vyvolávat řadu biologických efektů mimo cGMP signální kaskádu, například vazbou na hemovou skupinu jiných proteinů než cGMP nebo nitrosylací řady proteinů typu Ras, který je součástí MAPK dráhy v oocyty, či tyrosinu (Moretto et al., 1993; Rettori et al., 1993).

Jasně není ani to, zda a nakolik se liší mechanismus působení NO u meioticky neúplně kompetentních a meioticky plně kompetentních oocytů. Oocyty obou kategorií na jedné straně sice sdílejí některé regulační mechanismy, ale na druhé straně se v jiných regulačních mechanismech významně liší. K významným odlišnostem mezi meioticky neúplně kompetentními a plně kompetentními savčími oocyty patří obsah cyklinu B, cdc25C a wee 1, či schopnost aktivovat InsP3/ Ca²⁺ systém (Murray a Kirschner, 1989; Hampl a Eppig, 1995; Soboloff et al., 1995; Shinohara et al., 2000).

Partenogenetická aktivace oocytů oxidem dusnatým a vliv cykloheximidu a 6-dimetylaminopurinu na tuto aktivaci.

V naší studii jsme prokázali, že doplnění pulsačního ošetření prasečích oocytů donorem oxidu dusnatého o kultivaci s inhibítorem protein kináz 6-dimetylaminopurinem (6-DMAP) a inhibítorem protein syntézy cykloheximidem zvyšuje podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů. Na druhé straně se ale nepotvrdila naše hypotéza, podle které by ošetření cykloheximidem nebo 6-DMAP zvýšit podíl dělicích se embryí a zvýšit podíl embryí, která se vyvíjejí až do stádia blastocysty.

Ve studii se potvrdila naše předchozí zjištění, která prokázala, že pulsační režim ošetření donorem oxidu dusnatého je při partenogenetické aktivaci oocytů účinnější než kontinuální ošetření se stejnou délkou expozice oocytů donoru oxidu dusnatého (Petr et al., 2010). Kontinuální ošetření nevede k vývoji za stádium 4 buněk (Petr et al., 2005). Potvrdilo se však zjištění, že po pulsačním ošetření oxidem dusnatým se zvýší podíl dělicích se embryí, embrya pokračují ve vývoji za stádium 4-buněk a některá jsou schopna dosáhnout stádia moruly a blastocysty (Petr et al., 2010).

Při partenogenetické aktivaci savčích oocytů oxidem dusnatým je zřejmě rozhodující ovlivnění vnitrobuněčného signalingu vápníkových iontů, na čemž se podílí aktivace cGMP-dependentních signálních kaskád (Kuo et al., 2000; Petr et al., 2005a,b; 2006, 2007a; Jeřeta et al., 2012). Tyto vlivy na vápníkový signaling mohou imitovat intracelulární pulsaci hladin volných vápníkových iontů, které vyvolává po oplození spermii aktivita zeta izotypu fosfolipázy C (Jones et al., 1998; Parrington et al., 2002; Fujimoto et al., 2004; König et al.,

2006). Tyto efekty jsou patrné už při kontinuálním ošetření donorem oxidu dusnatého, které má poměrně nízkou účinnost (Petr et al., 2005b). Na druhé straně ale naše předchozí experimenty (Petr et al., 2007b) naznačují, že partenogenetická aktivace oxidem dusnatým nespouští všechny signální kaskády, jejichž aktivita je nezbytná pro aktivaci kalcium-dependentními umělými stimuly. Například partenogenetická aktivace prasečích oocytů kalcium ionoforem vyžaduje aktivní protein kinázu C izotypu delta, ale partenogenetická aktivace prasečích oocytů oxidem dusnatým je na tomto izotypu protein kinázy C nezávislá.

Pulsační ošetření donorem oxidu dusnatého je výrazně účinnější než kontinuální ošetření. Mechanismus pozitivního efektu pulsačního ošetření donorem NO však není zcela jasný. Nelze vyloučit přímý efekt NO na partenogenetickou aktivaci. Pro výstup z metafáze II a aktivaci oocytu je nezbytný pokles aktivity mitogen activated protein (MAP) kináz a pokles aktivity komplexu cyclin B-cdc2 (Dekel, 2005). Oxid dusnatý přímo ovlivňuje aktivitu cyklinů a cyklin-dependentních kináz u mitotických buněk (Guo et al., 1998) a má přímý vliv i na aktivitu MAP kinázy u savčích oocytů (Huo et al., 2005). Jeřeta et al. (2012) ale prokázali, že při aktivaci oocytů drápatky *Xenopus laevis* účinky NO-donoru dochází k inaktivaci MAP kináz, ale komplex cyclin B-cdc2 zůstává i nadále aktivní.

S ohledem na fakt, že za primární signál pro výstup z metafáze II a aktivaci savčího oocytu jsou obecně považovány vápníkové ionty (Yanagimachi, 1988; Hyslop et al., 2001; Leckie et al., 2003) se můžeme domnívat, že pulsační ošetření prasečích oocytů donorem oxidu dusnatého mění významným způsobem intracelulární signaling vápníkových iontů a to vede k lepší aktivaci oocytu. Propojení NO-dependentních a Ca-dependentních signálních drah při aktivaci oocytů drápatky *Xenopus laevis* NO-donorem prokázali Jeřeta et al. (2012), ale mechanismus, jakým NO ovlivňuje vápníkový signaling zůstal i v jejich studii blíže neidentifikován. Pro účinek NO na vápníkový intracelulární signaling se nabízí více možností. Vápníkové ionty například aktivují kalmodulin, který je aktivátorem NOS. Zároveň kalmodulin aktivuje kalmodulin-dependentní kinázu II, která se podílí významně na aktivaci oocytů (Lorca et al., 1993) a zprostředkovává efekty pulsačního signalingu vápníkových iontů na jeho cílové systémy (Dupont a Goldbeter, 1998).

Obecně platí, že kombinace aktivačních stimulů (etanol, kalcium ionofor, elektrické pulsy) s cykloheximidem nebo 6-DMAP vede k vyššímu podílu aktivovaných oocytů i vyššímu podílu embryí, která dosáhnou stádia blastocysty (Pressice a Yang 1994; Nussbaum a Prather 1995; Petr et al., 1996; Jílek et al., 2000; Jílek et al., 2001). Důvod, proč se v naší studii projevil při partenogenetické aktivaci donorem oxidu dusnatého efekt obou inhibitorů jen

zvýšením podílu aktivovaných oocytů, ale nikoli vyšší podílem embryí vyvíjejících se do stádia blastocysty, není jasný.

Pozitivní účinek cykloheximidu na partenogenetickou aktivaci savčích oocytů umělým stimulem je obvykle spojován s přerušением syntézy proteinů s krátkým biologickým poločasem aktivity, které se podílejí na stabilizaci druhého meiotického bloku v oocyту, který dozrál do stádia metafáze II (Pressice a Yang 1994).

Pozitivní efekt 6-DMAP na partenogenetickou aktivaci savčích oocytů umělým stimulem má zřejmě komplexnější pozadí. Na jedné straně je efekt přičítán inhibici kináz, které jsou zodpovědné za udržování oocyту dozrálého do metafáze II v druhém meiotickém bloku (Collas et al., 1993; Pressice a Yang, 1994; Soloy et al., 1997; Swann a Lai, 1997). Na druhé straně však Im et al. (2007) prokázali, že 6-DMAP silně ovlivňuje i vápníkový signaling aktivovaných oocytů prasete. V naší studii jsme neměřili *de novo* syntézu proteinů, intracelulární koncentrace volných vápníkových iontů, ani jsme nestanovili aktivitu kináz zodpovědných za udržení druhého meiotického bloku v oocytech dozrálých do stádia metafáze II. Proto můžeme jen spekulovat, který z těchto mechanismů a nakolik se mohl na pozitivním efektu 6-DMAP na aktivaci prasečích oocytů pulsačním ošetřením donorem oxidu dusnatého podílet.

Zklamáním byl velmi nízký vývoj embryí do stádia blastocysty u oocytů partenogeneticky aktivovaných pulsačním ošetřením donorem oxidu dusnatého v kombinaci s cykloheximidem nebo 6-DMAP. Příčina není jasná.

Vývojovou schopnost embryí významnou měrou určuje intracelulární signaling volných vápníkových iontů, který může být dostatečný pro aktivaci, ale nemusí stačit pro navození všech procesů důležitých pro vývoj embrya, reaktivaci embryonálního genomu a vývoje embrya a plodu až do porodu (Malcuit et al., 2006b; Morozumi et al., 2006; Ozil et al., 2006; Rogers et al., 2006). Je možné, že ani pulsační ošetření donorem oxidu dusnatého nenavodí vzor vápníkového signalingu nezbytný pro zdárný průběh pokročilejších vývojových stádií.

Také nelze vyloučit, že i pulsační ošetření donorem oxidu dusnatého má na oocyty negativní efekt, který se projeví v průběhu embryonálního vývoje např. během procesů kompaktace moruly nebo diferenciacе embryonálních buněk na embryoblast a trofoblast. Oxid dusnatý má vliv na expresi mnoha genů v různých typech buněk (Sparkman et al., 2004; Garban et al., 2005; Campbell et al., 2007) a je s to negativně poznamenat aktivitu řady důležitých biologicky aktivních molekul, například měnit aktivitu proteinů jejich přímou nitrosylací (Xu et al., 1998). Nadměrné množství oxidu dusnatého je s to narušit či zablokovat embryonální

vývoj (Athanassakis et al., 2000; Tranguch et al., 2003; Kim et al., 2006). Oxid dusnatý může v závislosti na okolnostech sehrávat roli jak antiapoptotického tak i proapoptotického faktoru (Stefanelli et al., 1999). Výsledky Novotné et al. (2010) však prokázaly, že prasečí oocyty vystavené pulsačnímu ošetření donorem oxidu dusnatého, mají výrazně redukovány příznaky apoptózy nejen ve srovnání s kontinuálním ošetřením donorem oxidu dusnatého, ale překvapivě i ve srovnání s oocyty partenogeneticky aktivovanými kalcium ionoforem. To dokazuje, že alespoň co do udržení integrity DNA je pulsační ošetření oocytů donorem oxidu dusnatého velmi šetrné.

Vliv PKC na stárnutí prasečích oocytů *in vitro*

V naší studii jsme prokázali, že aktivace protein kináz C má pozitivní vliv na oocyty prasete stárnoucí v podmínkách *in vitro*. Došlo k výraznému potlačení fragmentace. Tento efekt byl patrný, jen když byly použity aktivátory PMA a STEAR, které aktivují jak kalcium-dependentní, tak i kalcium-independentní PKC. Podobného efektu se podařilo dosáhnout také kombinovaným ošetřením oocytů specifickým aktivátorem kalcium-dependentních PKC OLE s aktivátorem kalcium-independentních PKC DIPALM. Efekt lze připsat současné aktivaci obou typů PKC vzhledem k tomu, že samotný aktivátor OLE nebo DIPALM byl v použité koncentraci neúčinný a na fragmentaci prasečích oocytů stárnoucích *in vitro* neměl významný vliv.

Postovulační stárnutí savčích oocytů, které dozrály do metafáze II, je komplexní proces a představuje alternativní dráhu k oplození a vývoji embrya (Fissore et al., 2002). Stárnoucí oocyty mají defektní mitochondrie (Liu et al., 2000; Perez et al., 2000; Wilding et al., 2001), mají pozměnou rovnováhu pro-apoptotických a anti-apoptotických faktorů, např. proteinů Bcl-2 rodiny genů (Perez et al., 1999; Morita et al., 1999), lze u nich pozorovat změny v cytoskeletu (Webb et al., 1986), redukci v aktivitě MPF (Kikuchi et al., 1995; 2000) a kromě dalších změn, mají narušený signaling vápníkových iontů (Takahashi et al., 2000).

Součástí vápníkového signalingu v oocytech jsou i PKC (Tatone et al., 2003). Nicméně PKC se významně podílí i na regulaci funkce mitochondrií (Ruvolo et al., 1998; Baines et al., 2003), na funkcích cytoskeletu (Keenan a Kelleher 1998; Ma et al., 2008) a mají vliv na MPF v savčích oocytech (Collona et al., 1997; Yu et al., 2004). Pro pozorovaný efekt aktivátorů PKC se tedy nabízí mnoho cílových struktur a naše pokusy nebyly uspořádány tak, aby adresovaly odpověď na tuto otázku.

Stárnutí po dobu 24 hodin nemělo v našich kultivačních podmínkách vliv na úspěšnost partenogenetické aktivace oocytů po ošetření kalcium ionoforem v kombinaci s 6 DMAP. Tato úspěšnost nebyla výrazně ovlivněna, ani když byly oocyty vystaveny stárnutí 24 hodin v přítomnosti aktivátorů PKC. Partenogenetická aktivace po standardním aktivačním ošetření kalcium ionoforem a DMAP (Jílek et al., 2001) u oocytů stárnoucích *in vitro* pod vlivem PMA, měla podobnou účinnost jako partenogenetická aktivace oocytů stárnoucích bez PMA. Podíl partenogeneticky aktivovaných oocytů u skupiny oocytů stárnoucích 24 hodin s PMA byl srovnatelný s kontrolní skupinou, která byla partenogeneticky aktivována bezprostředně po dokončení meiotického zrání.

Když budeme na stárnutí nazírat jako na alternativní dráhu k oplození a vývoji embrya, pak musíme konstatovat, že ani podíl jednotlivých izotypů PKC na regulaci aktivace oocytu při oplození nebo při partenogenezi není zatím do detailu prozkoumán. Někteří autoři dávají procesy aktivace do souvislosti s Ca^{2+} dependentními izotypy PKC (cPKC). Luria et al. (2000) prokázali v oocytech myši aktivaci PKC- α a PKC- β_1 v myším oocytu po oplození. Raz et al. (1998) prokázali relokizaci cPKC isotypů PKC- α a - β při aktivaci potkaních oocytů. Fan et al. (2002b) pozorovali ve zralém prasečím oocytu PKC- α , β_1 , γ a po oplození nebo partenogenetické stimulaci těchto oocytů kalcium ionoforem A23187 popisují translokaci těchto cPKC uvnitř oocytu.

Jiní autoři připisují hlavní roli při zrání a aktivaci oocytů Ca^{2+} independentním izotypům PKC (nPKC). Gangeswaran a Jones (1997) považují právě nPKC isotyp PKC- δ a aPKC isotyp PKC- λ za dominantní isotypy PKC přítomné v oocytech myši. Podíl PKC- δ na aktivaci myších oocytů po oplození i partenogenezi prokázali Viveiros et al. (2003) a Tatone et al. (2003). Význam PKC- δ při partenogenetické aktivaci prasečích oocytů prokázali Sedmíková et al. (2006). O významu aktivace nPKC pro výstup z meiotické metafáze svědčí i zjištění, že PKC- δ reguluje u myších oocytů také výstup z metafáze I a přechod do metafáze II (Viveiros et al., 2001).

I když jsou role různých izotypů PKC při plnohodnotné aktivaci savčího oocytu zřejmě nezastupitelné, jejich role se liší v závislosti na druhu. U myších oocytů dokáže samotný aktivátor kalcium-independentních PKC aktivovat dozrálé oocyty (Tatone et al., 2003). Oocyty prasete nelze prostřednictvím samotných PKC aktivovat (Sun et al., 1997; Fan et al., 2002a). To odpovídá i našim výsledkům, protože po ošetření stárnoucích oocytů PMA, jež je aktivátorem jak kalcium-dependentních, tak i kalcium-independentních PKC, nebyla první den stárnutí pozorována aktivace oocytů a nástup spontánní aktivace byl ještě druhý den

průkazně nižší než u oocytů stárnoucích v médiu bez PMA. Teprve třetí den stárnutí je u oocytů kultivovaných s PMA podíl aktivovaných oocytů srovnatelný s kontrolními oocyty stárnoucími po tři dny bez PMA. Vzhledem k tomu, že aktivace, dekondezace chromatinu a tvorba prvojádra u stárnoucích oocytů závisí na poklesu aktivity MPF a MAP kinázy (Kikuchi et al., 1995; 2000), můžeme spekulovat, že aktivace PKC pomocí PMA působí alespoň dočasně (první dva dny) proti tomuto poklesu aktivity MPF a MAP.

V našich experimentech se potvrdilo, že stárnoucí oocyty mají ve srovnání s oocyty, jež právě dokončily meiotické zrání, sníženou vývojovou schopnost. Aktivace PKC během stárnutí oocytů nedokáže tomuto snížení vývojové schopnosti zabránit.

Skutečnost, že schopnost partenogenetické aktivace oocytů nebyla výrazně ovlivněna, ani když byly oocyty vystaveny stárnutí 24 hodin v přítomnosti aktivátorů PKC, naznačuje, že PMA nenarušuje bezprostředně životaschopnost nebo schopnost oocytu vystoupit z metafáze II a zahájit dělení embrya. Tento názor je podpořen faktem, že podíl oocytů stárnoucích pod vlivem PMA, které se po aktivačním ošetření dělí, je srovnatelný s podílem dělících se oocytů, jež byly aktivovány bezprostředně po dokončení meiotického zrání. Podíl dělících se oocytů, které byly partenogeneticky aktivovány po jednom dni stárnutí bez PMA, byl průkazně nižší. U myších oocytů bylo prokázáno, že aktivace PKC má na dělení raných embryí nepříznivý vliv (Pouyemirou a Schultz, 1987; Winkel et al., 1990; Pauken a Capco, 2000).

U prasečích oocytů jsme v našich experimentech pozorovali po umělém aktivačním stimulu průkazně snížený vývoj u oocytů stárnoucích s PMA až ve vyšších vývojových stádiích blastocysty. Je známo, že PKC se podílí vedle výstupu z metafáze II po partenogenetické aktivaci či po oplození i na kompaktaci moruly (Winkel et al., 1990). Je otázka, zda pokles podílu blastocyst u oocytů stárnoucích v PMA souvisí s aktivací PKC během stárnutí. Vzhledem k tomu, že stejný podíl blastocyst byl pozorován i u oocytů, vystavených stárnutí 24 hodin bez PMA můžeme předpokládat, že nejde o specifický efekt aktivátoru PKC.

Na základě našich výsledků můžeme učinit závěr, že aktivace PKC potlačuje některé projevy stárnutí prasečích oocytů *in vitro*, především pak jejich fragmentaci. Tento efekt je patrný jen po simultánní aktivaci jak kalcium-dependentních, tak i kalcium-independentních PKC. Aktivace PKC dovoluje oocytům udržet si po 24 hodinovém stárnutí schopnost dělení po partenogenetické aktivaci umělým stimulem, ale nedokáže zabránit snížení schopnosti vývoje do blastocysty.

7. Závěr

Dostatek kvalitních oocytů je základním předpokladem pro praktické využívání reprodukčních biotechnologií v humánní i veterinární medicíně, v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Z populace oocytů, přítomných v ováriu samic savců, se nabízejí jednak oocyty ve fázi růstu, které mají meiotickou kompetenci vyvinutou na různé úrovni a podstatně méně početná populace oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí.

Naše studie (Tichovská et al., 2011), která se zabývá vlivem donorů NO a inhibitorů NOS na meiotické zrání oocytů s různou úrovní meiotické kompetence napomohla k charakteristice populace rostoucích oocytů. Důkladná charakterizace a odhalení významných rozdílů, jimiž se liší meioticky plně kompetentní oocyty od oocytů s neúplnou meiotickou kompetencí, je důležitým předpokladem pro praktické využití populace rostoucích oocytů pro potřeby reprodukčních biotechnologií. Proces postupného zisku meiotické kompetence během růstu savčího oocytu zůstává poznán jen nedokonale. Naše studie přispěla k poznání role gasotransmiteru NO pro zisk meiotické kompetence.

V této studii byl pozorován bezesporu zajímavý fenomén, kdy po reverzi účinku inhibitorů NOS kultivací v médiu bez inhibitoru dochází k rychlé kompletaci meiotického zrání bez druhého meiotického bloku a následně k vývoji partenogenetických embryí. Kvalita těchto embryí a jejich potenciál pro využití v reprodukčních biotechnologiích (např. pro tvorbu partenogenetických linií embryonálních kmenových buněk nebo pro využití ke klonování metodou agregace embryí a embryonálních kmenových buněk) by si jistě zasloužily pozornost při dalším výzkumu.

Tento aspekt studie zaměřené přednostně na meioticky neúplně kompetentní oocyty prasete jen podtrhl potenciální význam gasotransmiteru NO pro regulaci výstupu oocytu z druhého meiotického bloku v metafázi II meiotického dělení a pro partenogenetickou aktivaci oocytu. Tato problematika byla předmětem druhé studie zahrnuté do této disertace (Krejčová et al., 2009). V této studii jsme se snažili o optimalizaci aktivačního protokolu využívajícího gasotransmitter NO jako hlavní aktivační stimul.

Zdá se, že NO hrál původně v aktivaci oocytů poměrně významnou roli, jak dokazují první práce prokazující klíčovou roli NO v aktivaci oocytů bezobratlých živočichů (Kuo et al., 2000) V pozdější studii kolektivu KVD byl poprvé prokázán aktivační účinek NO u savčích oocytů. Ve srovnání s bezobratlými je ale účinek NO na savčí oocyty podstatně slabší a

mnohé procesy důležité pro vývoj budoucího jedince (např. exocytóza kortikálních granul jako součást polyspermiího bloku) jsou po aktivaci savčího oocyty účinky NO oslabeny nebo absentují.

Z tohoto hlediska se ukázala velmi přínosná studie (Jeřeta et al., 2012), kterou provedli členové týmu z KVD ve spolupráci s týmem profesora Bodarta na universitě v Lille na modelu oocytů drápatky africké. Efekty NO na aktivaci oocytů drápatky jsou v řadě ohledů intermediární s ohledem na situaci popsanou u bezobratlých na straně jedné a savců na straně druhé. Můžeme se proto domnívat, že evolučně ztrácel gasotransmitter NO jako látka podílející se na aktivaci oocyty na významu a u savců hraje spíše vedlejší roli. Tomu odpovídá i výsledek naší studie, kde jsme se pokusili efektivitu aktivačního protokolu založeného na pulsačním podávání donoru NO zvýšit kombinací s krátkodobou kultivací s inhibítorem protein syntézy cykloheximidem nebo inhibítorem protein kináz 6-dimetyl aminopurinem. Bylo dosaženo jen dílčích úspěchů, např. zvýšení podílu aktivovaných oocytů, ale nebyla zvýšena vývojová kompetence oocytů a předimplantační embryonální vývoj *in vitro* byl neuspokojivý.

Zdá se, že aktivace savčích oocytů gasotransmitterem NO naráží na evolučně dané limity. U savců jde zřejmě do značné míry o rudimentární signální dráhu, která je i nadále zajímavá z teoretického hlediska. Praktickému využití manipulace s procesy na této NO-dependentní signální dráze se ale zatím staví do cesty těžko překonatelné překážky. Z tohoto důvodu vidíme v nejbližší budoucnosti jako problematické třeba i využití patentů, které nám byly na aktivaci savčích oocytů gasotransmitterem NO uděleny.

Nejasné zůstává, nakolik navozuje gasotransmitter NO u oocytů dozrálých do metafáze II procesy, zahrnuté do aktivace a nakolik navozuje procesy, které jsou součástí postovulačního stárnutí oocyty. Procesy aktivace a postovulačního stárnutí zcela jistě sdílejí alespoň v prvních hodinách celou řadu styčných bodů. Situace je ale i v tomto případě notně nepřehledná a poznání obou procesů – a o postovulačním stárnutí to platí zvláště – je neúplné. I proto jsme se ve třetí studii (Petr et al., 2011) zaměřili na postovulační stárnutí prasečích oocytů a roli, jež při něm sehrávají protein kinázy C.

Výzkum postovulačního stárnutí oocytů na modelu prasečího oocyty se jeví jako perspektivní. Případné stárnutí oocytů má významný dopad na efektivitu řady reprodukčních biotechnik, jako je IVF nebo klonování přenosem jader somatických buněk do enukleovaného oocyty. Možnosti zbrzdění spontánního postovulačního stárnutí by proto mohlo najít potenciální uplatnění především v reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat. Humánní

asistovaná reprodukce je při využívání podobných postupů obvykle podstatně konzervativnější a opatrnější.

Všechny tři studie jasně ukázaly, kam je možné zaměřit další výzkum, pokud na jeho provádění bude dostatek finančních prostředků. Teoretický výzkum v oblasti regulace zisku meiotické kompetence a regulace postovulačního stárnutí má evidentně potenciál vyústit i v prakticky využitelné poznatky. U výzkumu role gasotransmiteru NO pro aktivaci oocytů je situace složitější. Nelze ale zcela vyloučit, že i tam by mohl přinést další teoreticky orientovaný výzkum příjemné překvapení v podobě prakticky využitelných poznatků.

8. Seznam použité literatury

- Abbott, A. L., Ducibella, T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience*. 6. D792-806.
- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. 114 (2). 257-267.
- Adachi, T., Matsui, R., Weisbrod, R. M., Najibi, S., Cohen, R. A. 2001. Reduced sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake activity can account for the reduced response to NO, but not sodium nitroprusside, in hypercholesterolemic rabbit aorta. *Circulation*. 104. 1040–1045.
- Aderem, A. 1995. The MARCKS family of protein kinase-C substrates. *Biochemical Society Transactions*. 23 (3). 587-591.
- Alberts, Bruce et al., 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, s. r. o. Ústí nad Labem. 1998. s. 630. ISBN: 80-902906-0-4.
- Albina JE., Cui S., Mateo RB., Reicher JS.: Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 150, 5080-5085, 1993.
- Andronowska, A., Chrusciel, M. 2008. The influence of E2 and P4 on in vitro NOx production in the porcine myometrium during first half of pregnancy. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 11. 307-313.
- Anger, M., Klima, J., Kubelka, M., Prochazka, R., Motlik, J., Schultz, R.M. 2004. Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (1). 11-16.
- Athanassakis, I., Aifantis, I., Baritakis, S., Farmakiotis, V., Koumantakis, E., Vassiliadis, S. 2000. Nitric oxide production by pre-implantation embryos in response to embryotoxic factors. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 10(3). 169-76.
- Ayabe, T., Kopf, G.S., Schultz, R.M. 1995. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uniseminated and inseminated eggs. *Development*. 121. 2233 - 2244.
- Baines, C.P., Song, C. X., Zheng, Y. T., Wang, G. W., Zhang, J., Wang, O. L., Guo, Y., Bolli, R., Cardwell, E. M., Ping, P. 2003. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circulation Research*. 92. 873-880.

- Baitinger, C., Alderton, J., Poenie, M., Schulman, H., Steinhardt, R. A. 1990. Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope breakdown. *The Journal of Cell Biology*. 111 (5 Pt 1). 1763-1773.
- Batra, S., Al-Hijji, J. Characterization of nitric oxide synthase activity in rabbit uterus and vagina: downregulation by estrogen. *Life Sciences*. 62. 2093-2100.
- Beckman, J. S., Koppenol, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American Journal of Physiology*. 271(5 Pt 1). C1424-1437.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361. 315-325.
- Bioessays*. 20(8). 607-610.
- Blasi, I., Richardson, B., Volpe, A., Facchinetti, F. 2008. Feto-maternal safety of intracervical sodium nitroprusside application in sheep. *Reproductive Sciences*. 15. 690-695.
- Boje, K. M., Arora, P. K.. 1992. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*. 587. 250-256.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351 (6329). 714-718.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87. 682-685.
- Broillet, M. C. 1999. S-nitrosylation of proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55. 1036-1042.
- Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207 (1-2). 21-30.
- Bu, S., Xie, H., Tao, Y., Wang, J., Xia, G. 2004. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 223(1-2). 85-93.
- 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. 1755-1766.
- Bussemer, T., Otto, I., Bodmeier, R. 2001. Pulsatile drug-delivery systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 18(5). 433-458.

- Butler, A. R., Glidewell, C., McGinnis, J., Bisset, W. I. 1987. Further investigations regarding the toxicity of sodium nitroprusside. *Clinical Chemistry*. 33(4). 490-492.
- Campbell, S. C, Richardson, H., Ferris, W. F, Butler, C. S, Macfarlane, W. M. 2007. Nitric oxide stimulates insulin gene transcription in pancreatic beta-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 353(4.) 1011-6.
- Carroll, J., Swann, K. 1992. Spontaneous calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 11196-11201.
- Chatterjee, S., Gandula, P. R., Dong, Y. L., Yallampalli, C. 1996. Immunocytochemical localization of nitric oxide-II in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *The Histochemical Journal*. 28 715–723.
- Cheng, W. M., Sun, X. L., An, L., Zhu, S. E., Li, X. H., Li, Y., Tian, J. H. 2007. Effect of different parthenogenetic activation methods on the developmental competence of in vitro matured porcine oocytes. *Animal Biotechnology*. 18(2). 131-41.
- 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 (3). 235-244.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Kott, T., Lanska, V., Tůmová, L., Tichovska, H., Jeřeta, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science*. 54. 137–149.
- Cho, W. K., Stern, S., Bigger, J. D. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of experimental zoology*. 187. 383-386.
- Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y., Kohmoto, K. 1991. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development*. 113. 789–795.
- Collas, P., Fissore, R., Robl, J.M., Sullivan, E.J., Barnes, F.L. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 34. 212-223.
- Collas, P., Robl, J.M. 1992. Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biology of Reproduction*. 45. 455-465.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B., Evans, M. J. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370. 65-68.

- Colonna, R., Tatone, C. 1993. Protein kinase C-dependent and independent events in mouse egg activation. *Zygote*. 1 (3). 243-256.
- Colonna, R., Tatone, C., Francione, A., Rosati, F., Callaini, G., Corda, D., Di Francesco, L. 1997. Protein kinase C is required for the disappearance of MPF upon artificial activation in mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 48. 292-299.
- Coskun, S., Lin, Y. C. 1995. Mechanism of action of epidermal growth factor-induced porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 42. 311-317.
- 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. 1997. 161–170.
- Dedieu, T., Gall, L., Crozet, N., Sevellec, C., Ruffini, S. 1996. Mitogen activated protein kinase during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development*. 45 (3). 351–358.
- Deguchi, R., Shirakawa, H., Oda, S., Mohri, T., Miyazaki, S. 2000. Spatiotemporal analysis of Ca(2+) waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca(2+) oscillations in fertilized mouse eggs. *Developmental Biology*. 218 (2). 299-313.
- Dekel, N. 1995. Molecular control of meiosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 6 (5). 165-169.
- Dekel, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular Cellular Endocrinology*. 234(1-2). 19-25.
- Denninger, J. W., Marletta, M. A. 1999. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411. 334–350.
- Diamond, J., Blisard, K. S. 1976. Effects of stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. *Molecular Pharmacology*. 12. 668–692.
- Dixit, V. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65. 1-16.
- Dodson, M.G., Minhas, B.S., Curtis, S.K., Palmer, T.V., Robertson, J.L. 1989. Spontaneous zona reaction in the mouse as a limiting factor for the time in which an oocyte may be fertilized. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 6. 101-106.
- Downs, S. M., Cottom, J., Hunzicker-Dunn, M. 2001. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 101-115.

- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S., Ozil, P. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca²⁺ oscillation number. *Developmental Biology*. 250(2). 280-291.
- Ducibella, T., Kurasawa, S., Duffy, P., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1993. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: Maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biology of Reproduction*. 48 (6). 1251-1257.
- Ducibella, T., LeFevre, L. 1997. Study of protein kinase C antagonists on cortical granule exocytosis and cell-cycle resumption in fertilized mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 46 (2). 216-226.
- Dupont, G., Goldbeter, A. 1998. CaM kinase II as frequency decoder of Ca²⁺ oscillations
- Eichenlaub-Ritter, U., Stahl, A., Luciani, J.M. 1988. The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in vitro. *Human Genetics*. 80. 259-264.
- Ekerhovd, E., Braennstroem, M., Alexandersson, M., Norstroem, A. 1997. Evidence for nitric oxide mediated contractile activity in isolated strips of human Fallopian tube. *Human Reproduction*. 12. 301–305.
- Eliyahou E, Shalgi R 2002. A role for protein kinase C during rat egg activation. *Biology of Reproduction* 67, 189-195.
- Eliyahou, E., Kaplan-Kraicer, R., Shalgi, R. 2001. PKC in eggs and embryos. *Frontiers in Bioscience*, 6, 785-791.
- Eliyahou, E., Tsaadon, A., Shtraizent, N., Shalgi, R. 2005. The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat. *Reproduction*. 129(2). 161-170.
- Endo, Y., Mattei, P., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1987. Effects of phorbol ester on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction-inducing activity of the mouse zona pellucida protein ZP3. *Developmental Biology*. 123 (2). 574-577.
- Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 45. 824-830.

- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195. 327-336.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78, 203-216.
- Fan, H.Y., Li, M.Y., Tong, C., Chen, D.Y., Xia, G.L., Song, X.F., Schatten, H., Sun, Q.Y. 2002a. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 63, 480-487.
- Fan, H. Y., Huo, L. J., Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen D. Y., Sun Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69. 1552-1564.
- Fan, H. Y., Tong, C., Li, M. Y., Lian, L., Chen, D. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002b. Translocation of the classic protein kinase C isoforms in porcine oocytes: implications of protein kinase C involvement in the regulation of nuclear activity and cortical granule exocytosis. *Experimental Cell Research*. 277. 183-191.
- Fan, H., Sun, Q. 2004. Involvement of Mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 16 (13). 535-547.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R.A., Navarro, P. A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71 (5). 836-848.
- Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G.S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular cellular biology*. 11. 1965-1971.
- Fissore, R. A., He, C. L., VandeWoude, G. F. 1996. Potential role of mitogen activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 55 (6). 1261-1270.
- Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., Zhang, M., Smyth, J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*. 124. 745-754.

- FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell*. 14 (1). 288-301.
- Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 23(6 Pt 2):1121-31.
- Förstermann, U., Sessa, WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33(7). 829-837.
- Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., Izumi, T., Perry, A. C., 2004. Mammalian phospholipase C zeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Developmental Biology* 274(2). 370-383.
- Fulka, J Jr., Jung, T., Moor, R. M. 1992. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 32. 378 – 382.
- Furchgott, R. F. 1999. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*. 19(4). 235-251.
- Gabrieli, B. G., Roy, L. M., Maller, J. L. 1993. Requirement for cdk2 in cyostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science*. 259. 1766-1769.
- Gallicano, G. I., Yousef, M. C., Capco, D. G. 1997. PKC--a pivotal regulator of early development. *Bioessays*. 19(1). 29-36.
- Gangeswaran, R., Jones, K. T. 1997. Unique protein kinase C profile in mouse oocytes: lack of calcium-dependent conventional isoforms suggested by rtPCR and Western blotting. *Febs Letters*. 412. 309-312.
- Garban, H. J, Marquez-Garban, D. C, Pietras, R. J, Ignarro, L. J. 2005, Rapid nitric oxide-mediated S-nitrosylation of estrogen receptor: regulation of estrogen-dependent gene transcription. *Proceeding of the National Academy Sciences of U S A* 102(7) 2632-6.
- Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P., Maller, J. 1989. Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature*. 339. 626-629.
- Gordo, A. C., Wu, H., He, C. L., Fissore, R. A. 2000. Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations and oocyte age. *Biology of Reproduction*. 62 (5). 1370-1379.

- Goren, S., Dekel, N. 1994. Maintenance of meiotic arrest by a phosphorylated p34cdc2 is independent of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biology of Reproduction*. 51 (5). 956-962.
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19 (10). 875-882.
- Goud, A.P., Goud, P.T., Diamond, M.P., Van Oostveldt, P., Hughes, M.R. 2005. Microtubule turnover in ooplasm biopsy reflects ageing phenomena in parent oocyte. *Reproductive Biomedicine Online*. 11. 43-52.
- Green, D. P. 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction*. 2 (3). 147-56.
- Gudmundsson, A., Carnes, M. 1997. Pulsatile adrenocorticotrophic hormone: an overview. *Biological Psychiatry*. 41(3). 342-365.
- Gulyas, B.J. 1979. Cortical granules of mammalian eggs. *International Reviews of Cytology*. 63. 357-392.
- Guo, K., Andres, V., Walsh, K. 1998. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin a gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 97(20). 2066-2072.
- Gupta, S., Moreland, R. B., Munarriz, R., Daley, J., Goldstein, I., Saenz de Tejada, I. 1995. Possible role of Na(+)-(K+)-ATPase in the regulation of human corpus cavernosum smooth muscle contractility by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*. 116. 2201-2206.
- Hampl, A, Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 1121(4). 925-933.
- Hanafy, K. A., Krumenacker, J. S., Murad, F. 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor*. 7 (4). 801-819.
- Harada, T., Koi, H., Kubota, T., Aso, T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis in vitro. *Journal of endocrinology*, 181. 191-205.
- Hatch KR, Capco DG. 2001. Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural elements of the mouse egg: potentiation of MAP kinase activity by CaM KII. *Molecular Reproduction and Development*. 58(1). 69-77.
- Hattori, M. A., Nishida, T., Takesue, K., Kato, Y., Fujihara, N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24. 65-73.

- Hofmann, F., Ammendola, A., Schlossmann, J. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of Cell Science*. 113 (Pt 10). 1671-1676.
- Homa, S.T., Carroll J., Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction*. 8 (8). 1274 - 1281.
- Hornick, P., Taylor, K. 1997. Pulsatile and nonpulsatile perfusion: the continuing controversy. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 11(3). 310-315.
- Huang, P. L., Fishman, M. C. 1996. Genetic analysis of nitric oxide synthase isoforms: targeted mutation in mice. *Journal of Molecular Medicine*. 74. 415-421.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122-130.
- Huo, L. J., Liang, C.G., Yu, L.Z., Zhong, Z. S., Yang, Z. M., Fan, H. Y., Chen, D. Y., Sun. Q. Y. 2005. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction*. 129(4). 403-409.
- Hyslop, L. A., Carroll, M., Nixon, V. L., Mcdougall, A., Jones, K. T. 2001. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. *Developmental. Biology*. 234(1). 216-230.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T. 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 447-454.
- Igarashi, H., Takahashi, E., Hiroi, M., Doi, K. 1997. Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 48(3). 383-390.
- Ignarro, L. J. 1999. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience Reports*. 19(2). 51-71.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National academy of Science of the USA*. 84. 9265–9269.
- Ignarro, L.J., Bush, P.A., Buga, G.M., wood, K.S., Fukuto, J. M., Rajfer, 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. 843–850.

- Im, G.S., Samuel, M. Lai, L., Hao, Y., Prather, R.S. 2007. Development and calcium level changes in pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with 6-DMAP after fusion. *Molecular Reproduction and Development*. 74. 1158-1164.
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265–271.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58 (1). 130-136.
- Irniger, S. 2002. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letters*. 532 (1-2). 7-11.
- Jablonka-Shariff, A., Basuray, R., Olson, L. M. 1999. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 6(2). 95-101.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell- specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460 – 468.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139. 2944–2954.
- Jaffe, L. A., Terasaki, M. 1994. Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Developmental Biology*. 164 (2). 579-587.
- Jeseta, M., Marin, M., Melicharova, P., Cailliau-Maggio, K., Martoriati, A., Lescuyer-Rousseau, A., Beaujois R., Petr, J., Sedmikova, M., Bodart J.-F. 2012. Nitric oxide-donor SNAP induces *Xenopus* eggs activation. *Plos One*. 7(7). e41509
- Jílek F., Huttelová R., Petr J., Holubová M., Rozinek J. 2000. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Animal Reproduction Science*. 63. 101-111.
- Jílek, F., Huttelová, R., Petr, J., Holubová, M., Rozinek J. 2001. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: effect of protein kinase inhibitor 6-dimethyl aminopurine. *Reproduction in Domestic Animal*. 36. 139-145.

- Johnson, J., Bierle, B. M., Gallicano, G. I., Capco, D. G. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Developmental Biology*. 204 (2). 464-477.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor duty in meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 10 (1). 1-5.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130 (6). 813-823.
- Jones, K. T., Cruttwell, C., Parrington, J., Swann, K., 1998. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates. *FEBS. Lett.* 437(3). 297-300.
- Josefsberg, L. B., Galiani, D., Dantes, A., Amsterdam, A., Dekel, N. 2000. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 62 (5). 1270-1277.
- Jovine, L., Litscher, E.R., Wassarman, P.M. 2002. Egg zona pellucida, egg vitelline envelope and related extracellular glycoproteins. *Advances in Developmental Biology and Biochemistry* 12, 31-54.
- Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S., Wassarman, P.M. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annual Review of Biochemistry* 74, 83-114.
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E.S. Wassarman, P.M. 2007. Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. *Society for Reproduction and Fertility Supplements* 63, 187-201.
- Jung, T., Lee, C., Moor, R. M. 1992. Effects of protein kinase inhibitors on pig oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Nutrition, Development*. 32. 461-473.
- Kanayama, N, Miyano, T., Lee, J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote*. 10 (3). 261-270.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. 1991. Nitric oxide as an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 289(1). 130-136.
- Kaufman, M. L., Homa, S. T. 1993. Defining role for calcium in the resumption of meiosis in the pig oocyte. *The Journal of Experimental Zoology*. 265. 69-76.
- Keenan, C., Kelleher, D. 1998. Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signalling*. 10 (4). 225-232.

- Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furakawa, T., Daen, F.P., Naito, K., Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105. 325-330.
- Kikuchi, K., Naito, K., Daen, F. P., Izaike, Y., Toyoda, Y. 1995. Histone H1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 43. 523-532.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Kaneko, H., Tojo, H. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Cloning Stem Cells*. 4. 211-222.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., Toyoda, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 715-722.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Tojo, H., Toyoda, Y. 1999. Inactivation of p34cdc2 kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged in vitro. *Zygote*. 7. 173-179.
- Kim, H., Lee, S. H, Kim, S., Jeong, Y. W, Koo, O.J., Hashem, M. D. A., Park, S. M., Lee, E. G., Hossein, M. S., Kang, S. K., Lee, B. C., Hwang, W. S. 2006. Embryotrophic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and hemoglobin on in vitro porcine embryos development. *Theriogenology*. 66 (2). 449-55.
- Kim, N. H., Menino, A. R. Jr. 1995. Effects of stimulators of protein kinases A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocyte-cumulus cell complexes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 40(3). 364-370.
- Kim, N.H., Moon, S.J., Prather, R.S., Day, B.N. 1996. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 43. 513-518
- Kishimoto, T. 1994. Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *The International Journal of Development Biology*. 38 (2). 185-191.
- Kline, D., Kline, J. T., 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell-cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology*. 149(1). 80-89.
- Konig, S., Muller, H., Tesfaye, D., Jennen, D., Tholen, E., Gilles, M., Rings, F., Montag, M., Schellander, K., Hoelker, M. 2006. The bovine phospholipase C zeta protein as the

- physiological sperm-derived trigger of Ca²⁺ oscillations at bovine oocyte activation. *Reproduction of Domestic Animal*. 41(4). 333-334.
- Krejčová, T., Petr, J., Krejčová, M., Kheilová, K. 2009. Effects of cycloheximide or 6-dimethyl aminopurine on the parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with nitric oxide donor. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (7). 293-306.
- Krsmanovic, L. Z., Stojilkovic, S.S., Catt, K. J. 1996. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 7(2). 56-59.
- Kuo, R.K., Baxter, G. T., Thompson, S. H., Stricker, S. A., Patton, C., Bonaventura, J., Epel, D. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*. 406 (6796). 633-636.
- Lamas, S., Michel, T., Collins, T., Brenner, B. M., Marsden P. A. 1992. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 90 (3). 879-887.
- Leckie, C., Empson, R., Becchetti, A., Thomas, J., Galione, A., Whitaker, M. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(14). 12247-12254.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8 (2). 119-125.
- Leis, J.F., Kaplan, N.O. 1982. An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 79. 6507-6511.
- Liang, C.G., Su, Y.Q., Fan, H.Y., Schatten, H., Sun, Q.Y. 2007. Mechanisms regulativ oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* 21, 2037-2055.
- Liu J, Grimison B, Lewellyn AL, Maller JL. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor Emi2 is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(46). 34736-34741.
- Liu, L., Trimarchi, J. R., Keefe, D. L. 2000. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction*. 62 (6). 1745-1753.
- Liu, W.S., Heckman, C. A. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular Signaling*. 10(8). 529-542.

- Liu, Y., Guyton, K. Z., Gorospe, M., Xu, Q., Lee, J. C., Holbrook, N. J. 1996. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radical Biology and Medicine*. 21 (6). 771-781.
- Longo, F.J. 1974. Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biology of Reproduction*. 11. 22-39.
- Longo, F.J. 1981. Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biology of Reproduction*. 25. 399-411.
- Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Méry, J., Means, A., Dorée, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366. (6452). 270-273.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*. 120 (3). 227-37.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58 (5). 871-885.
- Luria, A., Tennenbaum, T., Sun, Q. Y., Rubinstein, S., Breitbart, H. 2000. Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development. *Biology of Reproduction*. 62. 1564-1570.
- Ma W, Zhang D, Hou Y, Li YH, Sun QY, Sun XF, Wang WH. 2005. Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biology of Reproduction*. 72(2). 373-83.
- Ma, W., Koch, J. A., Viveiros, M. M. 2008. Protein kinase C delta (PKCdelta) interacts with microtubule organizing center (MTOC)-associated proteins and participates in meiotic spindle organization. *Developmental Biology*. 320. 414-425.
- Macháty, Z., Funahashi, H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 56 (4). 921-930.
- Mailhes, J.B., Young, D., London, S.N. 1998. Postovulatory aging of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biology of Reproduction*. 58. 1206-1210.
- Malcuit, C., Kurokawa, M., Fissore, R. A. 2006a, Calcium oscillations and mammalian egg activation. *Journal of Cellular Physiology*. 206(3). 565-573.

- Malcuit, C., Maserati, M., Takahashi, Y., Page, R., Fissore, R. A. 2006b. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal (Ca²⁺)_i response and oocyte activation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18. 1-13.
- Mani, S. K., Allen, J.M., Rettori, V., McCann, S.M, O'Malley, B. W., Clark, J.H. 1994. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proceedings of the National Academy of sciences of United States of America*, 91. 6468-6472.
- Masui, Y., Markert, C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of Experimental Zoology*. 177. 129-145.
- McCann, S. M. 1982. Physiology and pharmacology of LHRH and somatostatin. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 22. 491–515.
- Medlicott, N.J., Tucker, I. G. 1999. Pulsatile release from subcutaneous implants. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 38(2). 139-149.
- Megson, I.L., Sogo, N., Mazzei, F.A., Butler, A.R., Walton, J. C., Webb, D.J. 2000. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *British Journal of Pharmacology*. 131(7). 1391-1398.
- Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-799.
- Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170. 607-615.
- Meissner, G. 1994. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology*. 56. 485-508.
- Mellor, H., Parker, P. J. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical Journal*. 332 (Pt 2). 281-292.
- Messmer, U. K., Lapetina, E. G., Brüne, B. 1995. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Molecular Pharmacology*. 47 (4). 757-765.
- Miao, Y.L., Kikuchi, K., Sun, Q.Y., Schatten, H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*. 15. 573-585.

- Mitchell, L. M., Kennedy, C. R., Hartshorne, G. M. 2004. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. *Human reproduction*. 19. 1705 – 1712.
- Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12 (2-3). 205-16.
- Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y., Hiramoto, Y. 1986. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Developmental Biology*. 118 (1). 259-267.
- Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Developmental Biology*. 158 (1). 62-78.
- Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., Mikoshiba, K. 1992. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*. 257 (5067) .251-255.
- Moncada, S. 1992. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 120 (2). 187-191.
- Moncada, S., Martin, J. F. 1993. Evolution of nitric oxide. *Lancet*. 341(8859). 1511
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43. 109-141.
- Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47 (3). 485-491.
- Moretto, M., López, F. J., Negro-Vilar, A. 1993. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 133(5). 2399-23402.
- Morita, Y., Perez, G. I, Maravei, D. V, Tilly, K. I, Tilly, J. L, 1999. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Molecular Endocrinology*. 13. 841-850.
- Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R, 2006: Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proceeding of the National Academy of Sciences of U S A*. 103(47). 17661-17666.
- Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72 (2). 323-328.

- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155-162.
- Motlík, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.
- Motlík, J., Kubelka. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27 (4). 366-375.
- Murad, F. 1999. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32(11). 1317-1327.
- Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339(6222). 275-280.
- Murray, A. W., Solomon, M. J., Kirschner, M. W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*. 339. 280-286.
- Musicki, B., Liu, T., Strong, T.D., Lagoda, G.A., Bivalacqua, T.J., Burnett, A.L. 2010. Post-translational Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) by Estrogens in the Rat Vagina. *Journal of Sexual Medicine*. 7. 1768–1777.
- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67. 1588 – 1592.
- Nakane, M., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Forstermann, U., Murad, F. 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters*. 316. 175-180.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*. 6(12). 3051-64.
- Newton, A. 1995. Protein kinase C: Structure, Function, and Regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (48). 28495-28498.
- Norberg, H. S. 1972. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*. 131 (4). 497-517.
- Novotná, B., Petr, J., Sedmíková, M., Kratochvílová, J., Jilek, F. 2010. Effect of different activation modes on DNA integrity of porcine M II oocytes matured in vitro. *Zygote*. 18. 81-87.
- Nussbaum, D. J., Prather R.S. 1995. Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Molecular Reproduction and Development*. 41. 70-75.

- Oh, B., Hampl, A., Eppig, J. J., Solter, D., Knowles, B. B. 1998. SPIN, a substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 50 (2). 240-249.
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, 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). 604-609.
- Ozil, J. P., Markoulaki, S., Toth, S., Matson, S., Banrezes, B., Knott, J. G., Schultz, R. M., Huneau, D., Ducibella, T. 2005. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{Cyt}$ signal in the mouse. *Developmental Biology*. 282(1). 39-54.
- Ozil, J.P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H., Schultz, R. M., 2006. Ca^{2+} oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Developmental Biology*. 300(2). 534-44.
- Pahlavan, G., Polanski, Z., Kalab, P., Golsteyn, R., Nigg, E. A., Maro, B. 2000. Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 220 (2). 392-400.
- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17 (17). 5037-5047.
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*. 327. 524–526.
- Parrington, J., Jones, M. L., Tunwell, R., Devader, C., Katan, M., Swann, K. 2002. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca^{2+} release in eggs. *Reproduction*. 123(1). 31-39.
- Pauken, C. M., Capco, D. G. 2000. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isotypes during mouse preimplantation development. *Developmental Biology*. 223. 411-421.
- Payne, C., Schatten, G. 2003. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Developmental Biology*. 264 (1). 50-63.
- Perez, G. I., Tao, X. J., Tilly, J. L. 1999. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 5. 414-420.
- Perez, G. I., Trbovich, A.M., Gosden, R. G., Tilly, J. L. 2000. Mitochondria and the death of oocytes. *Nature*. 403 (6769). 500-501.

- Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*. 70(3-4). 235-49.
- Petr, J., Chmelikova, E., Dorflerova, A., Jeseta, M., Kuthanova, Z. 2007b. Effects of protein kinase C on parthenogenetic activation of pig oocytes using calcium ionophore or nitric oxide-donor. *Czech Journal of Animal Science*. 5. 415-422.
- Petr, J., Chmelíková, E., Krejčová, T., Reháček, D., Novotná, B., Jílek, F. 2010. Parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with a nitric oxide donor. *Reproduction in Domestic Animal*, 45 (3). 493-499.
- Petr, J., Chmelikova, E., Tumova, L., Jeseta, M. 2007a. The role of nitric oxide in parthenogenetic activation of pig oocytes: A reviews. *Czech Journal of Animal Science*. 52. 363-377.
- Petr, J., Grocholová, R., Rozinek J., Jílek F. 1996. Activation of in vitro matured pig oocytes by combined treatment of ethanol and cycloheximide. *Theriogenology*. 1473-1478.
- Petr, J., Krejčová, M., Rajmon, R., Jílek, F. 2011. Activation of protein kinase C suppresses fragmentation of pig oocytes aged in vitro. *Animal*. 2011. 5 (4). 565-571.
- Petr, J., Rajmon, R., Lanska, V., Sedmikova, M., Jilek, F. 2005b. Nitric oxide-dependent activation of pig oocytes: role of calcium. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 242(1-2). 16-22.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmikova, M., Jeseta, M., Chmelikova, E., Svestkova, D., Jilek, F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71(1). 115-22.
- Petr, J., Rozinek, J., Fulka, J Jr., Jílek, F. 1994. Influence of cytoplasmic microinjection on meiotic competence in growing pig oocytes. *Reproduction, Nutrition, Development*. 34(1). 81-87.
- 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 oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 196-204.
- Petr, J., Rozinek, J., Jílek, F. 1997. Cyclopiazonic acid induces accelerated progress of meiosis in pig oocytes. *Zygote*. 5. 193-205.
- Petrová, I., Sedmíková, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Rajmon, R. 2004. In vitro ageing of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 49. 93-98.

- Pickering, S.J., Johnson, M.H., Braude, P.R., Houlston, E. 1988. Cytoskeletal organisation in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Human Reproduction* 3. 978-989.
- Pires, P. R., Santos, N. P., Adona, P. R., Natori, M. M., Schwarz, K. R., de Bem, T. H., Leal C. L. 2009. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Animal Reproduction Science*. 116 (3-4). 233-43.
- Pollock, J. S., Forstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. W., Nakane, M., Murad, F. 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88. 10480-10484.
- Porksen, N. 2002. The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia*. 45(1). 3-20.
- Poueymirou, W. T., Schultz, R. M. 1987. Differential effects of activators of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C on cleavage of one-cell mouse embryos and protein synthesis and phosphorylation in one- and two-cell embryos. *Developmental Biology*. 121. 489-498.
- Pressice, G.A., Yang X.Z. 1994. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Molecular Reproduction and Development*. 38. 380-385.
- Procházka R., Kaňka J., Šotovský P., Fulka J., Motlík J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 96. 725-734.
- Radons, J., Heller, B., Bürkle, A., Hartmann, B., Rodriguez, M. L., Kröncke, K. D., Burkart, V., Kolb, H. 1994. Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199. 1270-1277.
- Raz, T., Eliyahu, E., Yesodi, V., Shalgi, R. 1998. Profile of protein kinase C isozymes and their possible role in mammalian egg activation. *Febs Letters*. 431. 415-418.
- Rettori, V., Belova, N., Dees, W. L., Nyberg, C. L., Gimeno, M., McCann, S. M. 1993. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proceeding of the National Academy Sciences of U S A*. 90(21). 10130-10134.

- Roberto da Costa, R. P., Costa, A.S., Korzekwa, A.J., Platek, R., Siemieniuch, M., Galvao, A., Redmer, D.A., Silva, J.R., Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G. 2008. Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. *Reproduction, Fertility and Development*. 20. 674-683.
- Rodman, T.C. 1971. Chromatid disjunction in unfertilized ageing oocytes. *Nature*. 233. 191-193
- Rogers, N. T., Halet, G., Piao, Y., Carroll, J., Ko, M. S. H., Swann, K. 2006. The absence of a Ca²⁺ signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction*. 132(1). 45-57.
- Rosselli, M., Dubey, R. K., Rosselli, M. A, Macas, E., Fink, D., Lauper, U., Keller, P. J., Imthurn B. 1996. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Molecular Human Reproduction*. 2 (8). 607-612.
- Ruvolo, P. P., Deng, X., Carr, B. K, May, W. S. 1998. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (39). 25436-25442.
- Salerno, J. 2008. Neuronal nitric oxide synthase: Prototype for pulsed enzymology. *FEBS Lett*. 582. 1395-1399.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. 2002. PLC zeta: A sperm-specific trigger of Ca⁽²⁺⁾ oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129 (15). 3533-3544.
- Schatten, H. 1994. Dithiothreitol prevents membrane fusion but not centrosome or mikrotubule organisation during first cell cycles in sea urchin. *Cell Motility and Cytoskeleton*. 27. 59-68.
- Schatten, H. 2008. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochemistry and Cell Biology*. 129. 667-686.
- Schmitt, A., Nebreda, A. R. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*. 115. 2457-2459.
- Schultz, R.M., LaMarca, M.J., Wassarman, P.M. 1978. Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*. 75 (9). 4160-4164.

- Sedmíková, M., Rajmon, R., Petr, J., Švestková, D., Chmelíková, E., Akal, A. B., Rozinek, J., Jílek, F. 2006. Effect of protein kinase C inhibitors on porcine oocyte activation. *Journal of Experimental Zoology*. 305A. 376-382.
- , M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theirrogenology* 60. 1609–1620.
- Sela-Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*, 78 (6). 1111-1118.
- Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 262 – 268.
- Shimada, M., Maeda, T., Terada, T. 2001. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 64. 1255-1263.
- Shinohara, K., Honma, S., Katsuno, Y., Honma, K. 2000. Circadian release of excitatory amino acids in the suprachiasmatic nucleus culture is Ca(2+)-independent. *Neuroscience Research*. 36(3). 245-250.
- Shoji, S., Yoshida, N., Amanai, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., Perry, A.C. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *EMBO Journal*. 25(4). 834 – 845.
- Shonn MA, McCarroll R, Murry AW. 2000. Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science*. 289. 300-303.
- Simerly, C., Wu, G. J., Zoran, S., Ord, T., Rawlins, R., Jones, J., Navara, C., Gerrity, M., Rinehart, J., Binor, Z., Asch, R., Schatten, G. 1995. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nature Medicine*. 1. 47-52
- Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia, Praha, 478 s.
- Smith, L. D., Richter, J. D. 1985. Synthesis, accumulation, and utilization of maternal macromolecules during oogenesis and oocyte maturation. In: *Biology of Fertilization*. C. B. Metz, Monroy, A., Ed., Vol. 1, pp. 141-188. Academic Press, Orlando, FL.

- Smythe, C., Newport, J. W. 1992. Coupling of mitosis to the completion of S phase in *Xenopus* occurs via modulation of the tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2. *Cell*. 68 (4). 787-97.
- Sobajima, T., Aoki, F., Kohmoto, K. 1993. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 97 (2). 389–394.
- Soboloff, J., Wade, M. G., Wells, G., Désilets, M., Tsang, B. K. 1995. Influence of the muscarinic agonist carbachol on intracellular Ca²⁺ in chicken granulosa cells: I. Dependence on follicular maturation. *Biology of Reproduction*. 52(4). 721-728.
- Soloy E, Kanka J, Viuff D, Smith SD, Callesen H, Greve T. 1997. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 57. 27-35.
- Sparkman, L, Boggaram, V. 2004. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology.-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 287(4). L764-L773.
- Sparkman, L., Boggaram, V. 2004. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology*. 287 (4). L764-773.
- Stefanelli, C., Pignatti, C., Tantini, B., Stanic, I., Bonavita, F., Muscari, C., Guarnieri, C., Clo, C., Caldarera, C. M. 1999. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1450(3.) 406-413.
- Steinberg, S. F. 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews*. 88(4). 1341-1378.
- Steuerwald, N.M., Steuerwald, M.D., Mailhes, J.B. 2005. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Molecular Human Reproduction*. 11. 623-630.
- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: review of literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 335-342.
- Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411(2-3). 217-230.

- Su, Y. Q., Xia, G. L., Byskov, A. G., Fu, G. D., Yang, C.R. 1999. Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*. 53 (1). 51-58.
- Sun, Q. Y., Wang, W. H., Hosoe, H., Taniguchi, T., Chen, D. Y., Shioya, Y. 1997. Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca²⁺-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Development Growth and Differentiation*. 39 (4). 523-529.
- Sun, Q.Y., Schatten, H. 2007. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 591. 58-71.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397 (6718). 441-446.
- Sutovsky, P., Hewitson, L., Simerly, C. R., Tengowski, M. W., Navara, C. S., Haavisto, A., Schatten, G. 1996. Intracytoplasmic sperm injection for Rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. *Human Reproduction*. 11(8). 1703-12.
- Swann, K., Lai, F. A. 1997. A novel signalling mechanism for generating Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays*. 19. 371-378.
- Swann, K., Ozil, J. 1994. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *International Review of Cytology*. 152. 183-222.
- Swann, K., Saunders, C. M, Rogers, N. T., Lai, F. A. 2006. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Seminar in Cell and Developmental Biology*. 17(2). 264-273.
- Szollosi, D. 1971. Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *American Journal of Anatomy*. 130. 209-225.
- Szollosi, D., Czolowska, R., Borsuk, E., Szollosi, M.S., Debey, P. 1998. Nuclear envelope removal/maintenance determines the structural and functional remodelling of embryonic blood cell nuclei in activated mouse oocytes. *Zygote*. 6. 65-73.
- Taieb, F., Thibier, C, Jesus, C. 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 48 (3). 397 – 411.

- Takahashi, T., Saito, H., Hiroi, M., Doi, K., Takahashi, E. 2000. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 55. 299-306.
- Takesue, K., Tabata, S., Sato, F., Hattori, M. 2003. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *The Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 136–140.
- Tao, J. Y., Fu, Z., Zhang, M. L., Xia, G., Lei, L., Wu, Z. L. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89. 38-44.
- Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J., Xie, H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222. 93-103.
- Tatemoto H, Muto N. 2001. Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote*. 9(1). 15-23.
- Tatone, C., Carbone, M.C., Gallo, R., Delle Monache, S., Di Cola, M., Alesse, E., Amicarelli, F. 2006. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biology of Reproduction* 74, 395-402.
- Tatone, C., Delle Monache, S., Iorio, R., Caserta, D., Di Cola, M., Colonna, R. 2002. Possible role for Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca^{2+} signal in mouse oocyte activation. *Molecular Human Reproduction*. 8. 750-757.
- Tatone, C., Monache, S. D., Francione, A., Gioia, L., Barboni, B., Colonna, R. 2003. Ca^{2+} -independent protein kinase C signalling in mouse eggs during the early phases of fertilization. *The International Journal of Developmental Biology*. 47. 327-333.
- Tatsumi, N., Fujisawa, M., Kanzaki, M., Okuda, Y., Okada, H., Arakawa, S., Kamidono, S. 1997. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology*. 138. 994–998.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., Schmid, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *Journal of biological chemistry*, 244 (23). 6388 – 6394.
- Terada, Y., Simerly, C., Schatten, G. 2000. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone

- resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 56 (1). 89-98.
- Terasawa E, 2001. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons: mechanism of pulsatile LHRH release. *Vitamins and Hormones*. 63. 91-129.
- Tesfaye, D., Kadanga, A., Rings, F., Bauch, K., Jennen, D., Nganvongpanit, K., Hölker, M., Tholen, E., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Montag, M., Gilles, M., Kirfel, G., Herzog, V., Schellander, K. 2006. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during *in vitro* development of bovine pre-implantation embryos. *Reproduction in Domestic Animal*. 41. 501–509.
- Tian, X.C., Lonergan, P., Jeong, B.S., Evans, A.C., Yang, X. 2002. Association of MPF, MAPK and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 62, 132-142.
- 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 (9). 1398-1405.
- Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B., Ozil, J. P. 2006. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction*. 131(1). 27-34.
- Touny, L. H., Banerjee, P. P. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. 66 (14). 1542-1555.
- Tranguch, S., Steuerwald, N., Huet-Hudson, Y. M. 2003. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction*. 68 (5). 1538–1544.
- Tung, J. J., Padmanabhan, K., Hansen, D.V., Richter, J.D., Jackson, P. K. 2007. Translational unmasking of Emi2 directs cytostatic factor arrest in meiosis II. *Cell Cycle*. 6. 725-731.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development*. 17 (6). 683-710.
- Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbos, P. J. L., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C. P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation *in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation*. 96. 2719–2726.

- Van Wissen, B., Bomsel-Helmreich, O., Debey, P., Eisenberg, C., Vautier, D., Pennehoaut, G. 1991. Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after GnRHa treatment: an analysis of individual oocytes. *Human Reproduction*. 6. 879-884.
- Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H., Clarke, H. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. 158 (2). 330-340.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H.J., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. 1017-1025
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, 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*. 122 (3). 815-822.
- Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Kubiak, J. Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W., Maro, B. 2000. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *Embo Journal*. 19 (22). 6065-6074.
- Viveiros, M. M., Hirao, Y., Eppig, J. J. 2001. Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes. *Developmental Biology*. 235. 330-342.
- Viveiros. M. M., O'Brien, M., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. 2003. Characterization of protein kinase C- γ in mouse oocytes throughout meiotic maturation and following egg activation. *Biology of Reproduction*. 69. 1494– 1499.
- Wang, W. H., Sun, Q. Y., Hosoe, M., Shioya, Y., Day, B. N. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56 (6). 1376-1382.
- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Odenbourg, R., Keefe, D.L. 2001. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility*. 75. 348-353.
- Wassarman, P. M. 1988a. The mammalian ovum, in Kubil, E., Neil, J. (eds.), *Physiology of the Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 69-102.
- Wassarman, P. M. 1988b. Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 57. 415–442.

- Wassarman, P.M., Albertini, D.F. 1994. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E.; Neil, J (ed.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 69-102.
- Webb, M., Howlett, S. K., Maro, B. 1986. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 95. 131-145.
- Wessel, G. M., Brooks, J. M., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zaydfudim, V., Conner, S. 2001. The biology of cortical granules. *International Review of Cytology*. 209. 117-206.
- Whitaker, M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiology Review*. 86(1). 25-88.
- Wickramasinghe D, Albertini DF. 1992. Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes. *Developmental Biology*. 152(1). 62-74.
- 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 (1). 162-172.
- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., di Mateo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M.L., Lombardi, L., De Placido, G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 16. 909-917.
- Williams, C. J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*. 8 (4). 313-321.
- Winkel, G. K., Ferguson, J. E., Takeichi, M., Nuccitelli, R. 1990. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Developmental Biology*. 138. 1-15.
- Winston NJ, Maro B. 1995. Calmodulin-dependent protein kinase II is activated transiently in ethanol-stimulated mouse oocytes. *Developmental Biology*. 2. 350-352.
- Xie, Q., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256. 225-228.
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G., Stamler, J. S. 1998. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 279. 234-237.
- Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G.S., Schultz, R.M., Ducibella, T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule

- exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-triphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction*. 57. 743-750.
- Xu, Z., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1994. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in early and late events of mouse egg activation. *Development*. 120(7). 1851-1859.
- Yallampalli, C., Buhimschi, I., Chwalisz, K., Garfield, R. E., Dong, YL. 1996. Preterm birth in rats produced by the synergistic action of a nitric oxide inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester) and an antiprogesterin (onapristone). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 175. 207-212.
- Yallampalli, C., Garfield, R. E., Byam-Smith, M. 1993. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology*. 133 (4). 1899-1902.
- Yamamoto, T., Bing, R. J. 2000. Nitric oxide donors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 225(3). 200-206.
- Yamauchi, J., Miyazaki, T., Iwasaki, S., Kishi, I., Kuroshima, M., Tei, C., Yoshimura, Y. 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*. 138. 3630-3637.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization, in Kuobil, E., Neil, J. (eds.), *Physiology of the Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189-280.
- Yanagimachi, R., Bhattacharyya, A. 1988. Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *The Journal of Experimental Zoology*. 248(3). 354-60.
- Yi, Y. J., Park, C. S. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science*. 86(3-4). 297-304.
- Yu, B. Z., Zheng, J., Yu, A. M., Shi, X. Y., Liu, Y., Wu, D. D., Fu, W., Yang, J. 2004. Effects of protein kinase C on M-phase promoting factor in early development of fertilized mouse eggs. *Cell Biochemistry and Function*. 22. 291-298.
- Yue, C., White, K. L., Reed, W. A., Bunch T. D. 1995. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development*. 121 (8). 2645-54.
- Zenzes, M.T., Casper, R.F. 1992. Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Human Genetics*. 88. 367-375.

9. Seznam použitých zkratk

AG - aminoguanidin

APC/C - APC – komplex podporující anafázi (anaphase-promoting complex)

ATP – adenosin trifosfát

CaMKII – kalcium/kalmodulin dependentní kináza II

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

cdc20 – cell division cycle 20

CG – kortikální granula

cGMP – cyklický guanosin monofosfát

CL – corpus luteum

CSF – cytostatický faktor

DAG – diacylglycerol

DIPALM - dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate heptaammonium

DMSO – dimetylsulfoxid

eNOS – endotelová izoforma syntázy oxidu dusnatého

GV - zárodečný váček (germinal vesicle)

GVBD – rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)

CHX - cykloheximid

iNOS – indukovatelná izoforma syntázy oxidu dusnatého

IP₃ – inositol 1,4,5-trifosfát

LD- pozdní diakeneze

L-NAME - L- ω nitro-L-arginin methyl ester

MAD2 - mitotic arrest deficient protein 2

MAPK - protein kináza aktivující mitogen (mitogen-activated protein kinase)

MI – metafáze I

MII – metafáze II

MPF - faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)

MTOC – mikrotubuly organizující centrum

nNOS – neuronová izoforma syntázy oxidu dusnatého

NOS – syntáza oxidu dusnatého

NO – oxid dusnatý

OLE - 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

PIP2 – 4,5-bisfosfát
PKA – protein kináza A
PKC – protein kináza C
PLC – fosfolipáza C
PMA - forbol 12-myristyl 13-acetát
RyR - ryanodinové receptory
SNAP - S-nitroso-N-acetylpenicillamin
STEAR - 1-stearoyl-2arachidonoyl-sn-glycerol
ZP – zona pellucida
6-DMAP – 6-dimetyl aminopurin