

# Česká zemědělská univerzita v Praze



## Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

### Katedra veterinárních disciplín

Regulační význam oxidu dusnatého a faktorů cGMP  
dependentní signální kaskády na průběh meiotického  
znovuzahájení prasečích oocytů v podmínkách in vitro

Diplomová práce

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

Autor práce : Bc. Jan Řimsa

2009

## ***Prohlášení***

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Regulační význam oxidu dusnatého a faktorů cGMP dependentní signální kaskády na průběh meiotického znovuzahájení prasečích oocytů v podmínkách in vitro“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 8. dubna 2009

.....

## ***Poděkování***

Tímto chci poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za pomoc při získávání informací, trpělivost, ochotu, užitečné rady a věcné připomínky v průběhu zpracování této práce.

Dále bych rád poděkoval Ing. Michalu Ješetovi, Ph.D., který mi pomohl především v začátcích této práce.

## *Autorský referát*

V současné době probíhá intenzivní rozvoj nových reprodukčních biotechnologií. Jejich efektivita je však zatím nízká, především díky poměrně omezeným znalostem biologických a biochemických mechanismů v oocytech během jejich oogeneze, především v průběhu meiotického zrání.

Pokud chceme účinnost biotechnologií zvýšit, je třeba důkladného prostudování mechanismů, které regulují oogenezi. Jednou z molekul, která může významně zasahovat do regulačních pochodů v oocytech je molekula s krátkým poločasem rozpadu, oxid dusnatý (NO).

Oxid dusnatý hraje roli mediátoru, který aktivuje cGMP – dependentní signální kaskádu. Za produkci NO je zodpovědný enzym NO – syntáza, jež se vyskytuje ve třech izoformách: nervová NOS (nNOS), indukovatelná NOS (iNOS) a endoteliální NOS (eNOS). NO ovlivňuje řadu fyziologických dějů, jako je např. relaxace hladkosvalových buněk nebo produkce GnRH (gonadotropin-realease hormones). Je velmi pravděpodobné, že se také podílí na meiotickém zrání oocytů.

Tato diplomová práce se zabývá účinkem oxidu dusnatého na meiotické zrání prasečích oocytů. Oocyty prasete byly vybrány z toho důvodu, že prase je kromě velkého hospodářského významu také vhodným biomedicínským modelem.

Účinek NO na meiotické zrání oocytů prasete byl sledován na základě farmakologické inhibice producentů NO, enzymů NOS za použití dvou komerčně dostupných inhibitorů, kvůli rozlišení účinků obou hlavních izoforem NOS byly použity iNOS specifický inhibitor aminoguanidin (AG) a nespecifický inhibitor L-NAME ( $N^{\omega}$  – nitro – L - arginin metyl ester), který inhibuje katalytickou činnost všech třech izoforem NOS s nejvyšší specifitou k eNOS. Po 48 hodinovém ošetření oocytů NOS inhibitory aminoguanidinem a L-NAME v koncentraci od 5 do 10 mM bylo narušeno meiotické zrání oocytů. Nižší koncentrace inhibitorů zrání neovlivňovaly. Efekt inhibitoru byl závislý na dávce. U experimentu s AG po 24 hodinové reverzi oocytů v čistém médiu došlo k vysokému nárůstu podílu partenogeneticky aktivovaných embryí. Po 48 hodinové kultivaci oocytů s 0,05 – 2 mM NO donoru SNAP došlo ke snížení počtu oocytů ve stádiu první a druhé meiotické metafáze. Použitá koncentrace oxidu dusnatého byla pro oocyty toxická a narušila jejich životnost. Je otázkou jakým mechanismem oxid dusnatý v oocytech působí. Koncentraci jsme proto snížili na 0,5 mM a poté na 0,25, 0,1 a 0,05 mM. 0,01 mM SNAP již inhibiční účinek na oocyty nemělo. Oocyty s ukončeným růstem kultivované 48 hodin v médiu s NO donorem v této koncentraci zrály z 91% do druhé meiotické metafáze.

Dále byla použita efektivní koncentrace 5 mM aminoguanidinu a bylo sledováno, zda SNAP v koncentraci 0,03, 0,05 a 0,1 mM dokáže zvrátit inhibiční účinek tohoto iNOS specifického inhibitoru. Jako nejúčinnější se jevila koncentrace 0,05 mM SNAP.

Zde uvedené experimenty prokazují, že NO má vliv na překonání prvního meiotického bloku a je patrně důležitým signálem pro meiotické znovuzahájení prasečích oocytů. Dále jsme zjistili, že efekt inhibitoru je závislý na jeho dávce. Změny v meiotickém zrání po aplikaci NOS inhibitorů se podobaly změnám, ke kterým podle literatury dochází při kultivaci oocytů získaných od zvířat s vyblokováním genu pro některou z izoform NOS.

**Klíčová slova:** oxid dusnatý, NO syntáza, NO dependentní signální kaskáda, meiotické zrání, oocyt,

## *Author's abstract*

An intense advancement of new reproduction biotechnologies is taking its course at the present time. However, their effectivity has been low so far, mainly because of our rather limited knowledge of biological and biochemical mechanisms in oocytes during their oogenesis mainly during their meiotic maturation process.

In order to increase the effectivity of biotechnologies a thorough study of oogenesis regulation mechanisms is needed. A molecule contributing to a significant interference with regulation mechanisms in oocytes is the molecule with a short half-life - the nitric oxide (NO).

Nitric oxide acts as a mediator, which activates cGMP-dependent signalling cascade. For NO production is responsible the NO-synthase enzyme, which exists in three isoforms: Neuronal NOS (nNOS), Inducible NOS (iNOS) and Endothelial NOS (eNOS). NO affects many physiological processes such as smooth muscle cells relaxation or GnRH (Gonadotropin-releasing hormones) production. Very probably NO also participates on meiotic maturation of oocytes.

This theses deals with effect of NO on meiotic maturation of pig oocytes. Beside its great agricultural importance, a pig is also a suitable biomedical model and hence pig oocytes were chosen.

The effect of NO on meiotic maturation of pig oocytes was observed following the pharmacological inhibition of NO producers, the NOS enzymes, using two commercially available inhibitors. For distinction between the effects of both main NOS isoforms an iNOS specific inhibitor Aminoguanidine (AG) and a non-specific inhibitor L-NAME (N<sup>o</sup> – nitro – L – Arginine-Methyl Esther) which inhibits catalytic activity of all three NOS isoforms with the highest specificity towards eNOS were used. Meiotic maturation of oocytes was distorted after 48-hour oocyte treatment with NOS inhibitors Aminoguanidine and L-NAME in concentration from 5 to 10 mM. Lower concentrations of inhibitors did not affect oocyte maturation. The inhibitor's effect was dose-dependent. After 24-hours reversion of oocytes with finished growth in a pure medium a high increase of parthenogenetically activated embryos occurred in experiment with AG. NOS inhibitors block at the beginning of oocytes maturation, oocytes are unable to go through germinal vesicle breakdown.

After 48-hour oocyte cultivation with 0,05 – 2 mM SNAP NO donor a decrease of oocyte number in the first and second meiotic metaphase stadium occurred. Applied concentration of nitric oxide was toxic for oocytes and has distorted their vitality. The question remains as to the mechanism by which nitric oxide has effect oocytes. Hence, we reduced the concentration to 0,5

mM and then to 0,25, 0,1 and 0,05 mM. 0,01 mM of SNAP had no more inhibitory effect on oocytes. Oocytes with finished growth cultivated for 48 hours in medium with NO donor in this concentration matured to the 2nd meiotic metaphase in 91%.

Thereunto an effective concentration of 5 mM Aminoguanidine had been used and we observed whether SNAP in 0,03, 0,05 a 0,1 mM concentration can reverse the inhibitory effect of this iNOS-specific inhibitor. Concentration of 0,05 mM SNAP appeared to be the most effective.

Experiments presented in this theses have shown that NO has an effect on overcoming the first meiotic block and apparently it's an important signal for meiosis resumption of pig oocytes. Furthermore we discovered that the inhibitor's effect is dose - dependent on it's dose. Changes in meiotic maturation after NOS-inhibitors application were similar to the changes which, according to the literature, occur during the cultivation of oocytes taken from animals with blocked gene for some of the NOS isoforms.

**Key's words:** nitric oxide, NO synthase, NO dependent signalling pathway, meiotic, maturation, oocyte.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled .....	2
2.1	Oogeneze .....	2
2.1.1	Fáze množení .....	2
2.1.2	Fáze růstu .....	3
2.1.3	Fáze zrání .....	3
2.2	Meiotické zrání .....	4
2.2.1	První meiotické dělení .....	4
2.2.2	Druhé meiotické dělení .....	6
2.3	Folikulogeneze .....	7
2.4	Hlavní faktory ovlivňující zrání oocytů .....	9
2.4.1	MPF (Metaphase Promoting Factor) .....	9
2.4.2	MAP kináza ( Mitogen Activated Protein Kinase) .....	11
2.4.3	CSF (Cytostatic Factor) .....	12
2.4.4	Plk 1 (Polo-like kinase) .....	13
2.4.5	PKC (Protein kináza C) .....	13
2.4.6	Vápník .....	14
2.4.7	OMI (Oocyte Maturation Inhibitor) .....	16
2.4.8	Cyklické nukleotidy .....	16
2.5	cGMP – dependentní signální kaskáda .....	17
2.5.1	Uplatnění vápníkových iontů ( $Ca^{2+}$ ) v NO/cGMP kaskádě .....	18
2.5.2	Uplatnění oxidu dusnatého (NO) v cGMP dependentní kaskádě .....	19
2.5.3	Guanylát cyklázy (GC) .....	19
2.5.4	cGMP (cyklický guanosin monofosfát) .....	21
2.5.5	Protein kináza G (PKG) .....	21
2.5.6	PDE 5 (fosfodiesteráza typ 5) .....	23
2.6	Některé faktory ovlivňující NO/cGMP kaskádu .....	25
2.6.1	FSH (Folikuly stimulující hormon) .....	25
2.6.2	GnRH (Gonadotropin - Realease Hormones) .....	25
2.7	Oxid dusnatý .....	26
2.7.1	Mechanismus působení .....	26
2.7.2	Produkce NO .....	27
2.7.3	NO - syntáza .....	27
2.7.4	Regulace NO – syntázy .....	28
2.7.5	Inhibitory NO – syntázy .....	29
2.7.6	Působení NO na různé orgánové systémy .....	30
2.7.7	NOS v reprodukci samic .....	31
2.7.8	Vliv NO na meiotické zrání oocytů .....	32
3	Cíl .....	34
4	Materiál a metody .....	35
4.1	Získávání vaječníků .....	35
4.2	Získávání oocytů s ukončeným růstem .....	35
4.3	Kultivace oocytů .....	35
4.4	Fixace oocytů a určení fáze jejich meiotického zrání .....	36
4.5	Statistická analýza dat .....	36
4.6	Experimentální schéma .....	36
4.6.1	Účinek aminoguanidinu (AG) na oocyty .....	36
4.6.2	Účinek L-NAME na oocyty .....	37



4.6.3	Účinek donoru SNAP na oocyty.....	37
4.6.4	Účinek donoru SNAP a AG na meiotické zrání oocytů .....	38
5	Výsledky .....	39
5.1	Účinek aminoguanidinu na oocyty .....	39
5.2	Účinek L-NAME a D-NAME na oocyty .....	40
5.3	Účinek SNAP na oocyty. ....	42
	Účinek SNAP a AG na oocyty .....	43
	Účinek SNAP a AG na oocyty .....	44
6	Diskuze .....	45
7	Závěr .....	48
8	Použitá literatura .....	49

# 1 Úvod

V posledních letech došlo k prudkému rozvoji biotechnologií, jež se významně projevil také v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Široké uplatnění našly biotechnologie u skotu, ovcí a koz. U prasat se biotechnologické postupy prosazují jen pomalu a jejich účinnost je stále ještě extrémně nízká. Biotechniky rutinně používané u skotu či ovcí naráží u prasete na obrovské potíže. Vzhledem k tomu, že prase je kromě hospodářského využití významným biomedicínským modelem sloužícím pro výzkum lidských chorob, vývoj nových léků či xenotransplantace je třeba účinnost používaných biotechnických metod u tohoto druhu zvýšit.

Jedním z klíčových problémů je nedostatečná znalost mechanismů regulujících růst a meiotické zrání oocytů prasete. Významnou úlohu může sehrávat oxid dusnatý produkovaný enzymem NO - syntázou. Oxid dusnatý je malá reaktivní molekula známá jako bioregulátor mnoha fyziologických procesů. Experimenty provedené na laboratorních hlodavcích potvrzují jeho zapojení do reprodukčních funkcí včetně folikulogeneze, ovulace a spermatogeneze.

Dvě ze tří známých izoform NO - syntázy byly nalezeny v myších a potkaních oocytech. Bylo zjištěno, že při jejich vyblokování dochází k narušení meiotického zrání oocytů, což svědčí o úloze NO – syntázy v tomto procesu. Je velmi pravděpodobné, že je NO - syntáza produkci oxidu dusnatého zapojena také do regulace růstu a meiotického zrání oocytů prasete. Má práce si kladla za cíl poznat úlohu NO - syntázy a oxidu dusnatého v těchto procesech.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Oogeneze

Oogeneze se uskutečňuje ve folikulech vaječníku, vývoj vajíčka zahrnuje fázi množení, růstu a zrání (Marvan *et al.*, 1998). Podobně jako spermie i vajíčka se vyvíjejí z primordiálních gonocytů, které se usadily v základu samičí gonády, ve vaječníku.

Na konci fáze množení vstupují zárodečné buňky do profáze prvního dělení meiozy a stávají se z nich primární oocyty. Primární oocyty vstupují do růstové fáze oogeneze, která vede k obrovskému zvětšení oocytu. V růstové fázi se jádro primárního oocytu rovněž velmi zvětšuje a vytváří tzv. zárodečný váček. Po celé růstové období je jádro v profázi prvního dělení meiozy, a to převážně v diploténu. Po ukončení růstového období nastupuje fáze zrání (Wassarman 1988).

Ve fázi zrání je dokončeno první dělení meiozy a z primárního oocytu vzniká jediný sekundární oocyt a malá pólová buňka. Při druhém dělení meiozy, vzniká ze sekundárního oocytu jediná ootida, která je již zralým vajíčkem a 2. pólová buňka. Celkově tedy z jednoho původního primárního oocytu vzniká ve zrací fázi jediné vajíčko a 2 až 3 pólové buňky, které u většiny živočichů nemají význam a zanikají. Inekvální zrací dělení, charakterizující oogenezi, má svůj význam v tom, že veškeré informační molekuly a výživné látky pro další vývoj vajíčka, syntetizované v růstové fázi, dostává jediná buňka – zralé vajíčko, takže vyvíjející se zárodek má jejich největší množství (Sládeček, 1986).

#### 2.1.1 Fáze množení

Z prapohlavních buněk vznikají oogonie. U savců pronikají oogonie bazální membránou zárodečného epitelu primitivní gonády a spolu s epiteliálními buňkami vnikají v zárodečných pruzích do její dřeně. Tyto oogonie prvních generací zůstávají v kortikálních vrstvách ovária, kde se dále mitoticky množí (Sládeček, 1986).

Proces přeměny oogonií v primární oocyt probíhá ve vaječnicích. Primární oocyty vstupují ještě v prenatalním období do profáze prvního zracího dělení. V diplotením stádiu je profáze ještě v prenatalním stádiu přerušena a v tomto stádiu primární oocyt přetrvává různě dlouhou dobu. Primární oocyty postupně dozrávají až od období pohlavního dospívání (Marvan *et al.*, 1998).

### 2.1.2 *Fáze růstu*

Zahrnuje dlouhé období a trvá až do konce pohlavní činnosti. Od začátku pohlavní dospělosti v průběhu každého ovariálního cyklu vstupuje do fáze růstu vždy několik primárních oocytů. Pro toto období je charakteristický růst jádra, aktivní syntéza RNA a proteinů, hromadění kortikálních zrn pod buněčnou membránou, která jsou důležitá pro zajištění monospermatického typu oplození (Marvan *et al.*, 1998).

Oocyt je obklopen jednou nebo více vrstvami somatických buněk (vzniklých z epitelu základu gonády), které se stávají buňkami folikulárními, uzavírajícími vajíčko do váčku zvaného folikul (Sládeček, 1986). Pro fázi růstu je důležitý celkový vývin vaječnickových folikulů (Marvan *et al.*, 1998).

### 2.1.3 *Fáze zrání*

U savců zanikají centroméry a na pólech budoucího dělicího vřeténka vznikají shluky vláknitých tělísek. Rozpadají se jádérka, chromozómy přecházejí z diploténu do metafáze prvního dělení meiózy (metafáze I). To je zpravidla výrazně inekvální a dává vznik velkému sekundárnímu oocytu a nepatrné pólóvé buňce na jeho animálním pólu (Sládeček, 1986).

Brzy potom bez rekonstrukce interfázového jádra vstupuje oocyt do druhého zracího dělení, přerušeno v metafázi. Zralý oocyt (sekundární) je při ovulaci v metafázi druhého zracího dělení a obsahuje haploidní počet chromozómů u většiny savců. Druhé zrací dělení je dokončeno jedině v případě oplození (Marvan *et al.*, 1998).

Ve druhém dělení meiózy, rovněž inekválním, vzniká zralé vajíčko a druhá pólóvá buňka (Sládeček, 1986).

## **2.2 Meiotické zrání**

Zrací dělení je modifikovanou mitózou a nazývá se meióza. Probíhá v podstatě shodně v samičích i samčích pohlavních buňkách (Sládeček, 1986).

Meióza má funkci při redukci diploidního počtu chromozómů na haploidní počet v pohlavních buňkách - gametách (Černý *et al.*, 1995).

Tento způsob, kdy zrací dělení je součástí vývoje pohlavních buněk, se nazývá gametickou redukcí. Zrací dělení u všech mnohobuněčných živočichů předchází vlastnímu oplození. Meióza sestává ze dvou bezprostředně za sebou následujících dělení podobných mitóze. V jejich průběhu se však chromozómy rozdělí jen jednou, takže z jedné diploidní buňky vznikají čtyři haploidní buňky dceřinné. Výsledkem obou meiotických dělení je tedy redukce diploidního počtu chromozómů na haploidní a současně rekombinace jejich genetické výbavy, pocházející od otce a od matky (Sládeček, 1986).

Hlavním cílem je udržení konstantního počtu chromozómů, protože splynutím obou gamet při oplození vzniká zygota, která má diploidní počet chromozómů (Marvan *et al.*, 1998).

### **2.2.1 První meiotické dělení**

Nazývá se také heterotypickým dělením, protože se odlišuje od mitózy (Sládeček, 1986). Tato etapa se dělí rovněž na čtyři fáze – profáze, metafáze, anafáze a telofáze (Černý *et al.*, 1995).

#### **2.2.1.1 Profáze**

Profáze zaujímá časově 90% děje. Má pět subfází (Černý *et al.*, 1995). První stádium této profáze se nazývá leptotén (Sládeček, 1986).

##### **2.2.1.1.1 Leptotén**

V buněčném jádře se začínají spiralizovat chromozomy (Hančová *et Vlková*, 2002) V diploidním počtu se jeví jako dlouhá, tenká vlákna, jejichž konce (telomery) zpravidla směřují k určitému místu jaderné membrány (Sládeček, 1986).

#### **2.2.1.1.2 Zygotén**

Homologní chromozómy se k sobě postupně přikládají, a to od svých konců zakotvených v jaderné membráně. Mezi homologními chromatidami se postupně od telomér vytváří útvar, označovaný jako synaptonemální komplex. Je bílkovinné povahy a obsahuje RNA. Spárované chromozómy se nazývají bivalenty nebo geniny (Sládeček, 1986).

#### **2.2.1.1.3 Pachytén**

Spárované chromozómy se zkracují a tloustnou (Sládeček, 1986). V bivalentech lze pozorovat rozdělení na chromatidy, takže dostávají vzhled tetrad (Černý *et al.*, 1995).

Jádro je tetraploidní při haploidním počtu tetrad. Každá tetrada má dvě centroméry. Synaptonemální komplex je plně vyvinut. V pachyténu může proběhnout rekombinace homologních nebo i sesterských chromatid. Během tohoto děje se mění určité úseky DNA, říkáme mu crossing-over. Jejím důsledkem je redistribuce genetického materiálu mezi chromatidami a jednotlivými vlákny DNA spojenými v synapsi (Sládeček, 1986).

#### **2.2.1.1.4 Diplotén**

Chomatidy se od sebe začnou oddělovat (Sládeček, 1986), ale ještě jsou spojeny v chiasmatech. Rozpojení začíná u centromery a pokračuje k telomérám (Černý *et al.*, 1995). V chiasmatech přetrvává ještě synaptonemální komplex, který je postupně nahrazen chromatinovými můstky (Sládeček, 1986).

#### **2.2.1.1.5 Diakineze**

V tomto období kontrakce chromozómů pokračuje (Černý *et al.*, 1995). Chiasmata se přesouvají na konec ramen chromozómů (Hančová *et Vlková*, 2002). Nastává terminalizace chiasmat. Jaderná membrána se rozpadá (Sládeček, 1986). Tvoří se dělicí vřeténko (Hančová *et Vlková*, 2002).

### **2.2.1.2 Metafáze**

Chromozómy se pohybují do ekvatoriální roviny buňky, centromery každého homologního páru však směřují k opačným koncům dělicího vřeténka (Sládeček, 1986). Tetrády se naváží centromerami na dělicí vřeténko (Hančová *et* Vlková, 2002).

### **2.2.1.3 Anafáze**

Chiasmata se uvolní a homologní chromozómy s vyměněnými nesesterskými chromatidami se nahodile rozchází pohybem dělicího vřeténka k pólům (Černý *et* al., 1995). Nastává rozestup zdvojených homologních chromatid se společnou centromérou k opačným pólům dělicího vřeténka. Z tetrad se stávají diády (Sládeček, 1986).

### **2.2.1.4 Telofáze**

V telofázi probíhá rekonstrukce dceřinných jader a obvykle jen krátká interfáze, bez syntézy DNA a bez dalšího zdvojení chromozómů. Chromozómy mírně dekondenzují, vytváří se jaderná membrána a rozdělí se cytoplazma. Vzniknou dvě dceřinné buňky s haploidním počtem chromozómů. Každý chromozom má dvě chromatidy (Sládeček, 1986).

## **2.2.2 Druhé meiotické dělení**

Druhé meiotické dělení se nazývá dělením homeotypickým, protože se v podstatě neliší od normální mitózy. Pokračuje krátká profáze. Chromozómy v podobě diád jsou v haploidním počtu. V metafázi se uspořádávají do ekvatoriální roviny, jejich centroméry se dělí a v anafázi se sesterské chromatidy rozcházejí k opačným pólům. Každé telofázní jádro má nakonec jedinou chromatidu ze čtyř, které tvořily původní tetradu (Sládeček, 1986).

## 2.3 Folikulogeneze

V průběhu folikulogeneze vznikají z primordiálních folikulů folikuly předovulační (terciální folikuly). Nejprve dojde k obklopení oogonie jednou vrstvou plochých somatických buněk tzv. pregranulózních buněk a vzniká folikul primordiální (Hafez *et* Hafez, 2000). Tyto folikulární buňky jsou mezi sebou spojeny prostřednictvím dezmosómů, jedná se tedy o velmi pevné mechanické spojení (Miyano, 2003).

Ty oogonie, které nejsou obklopeny touto buněčnou vrstvou jsou dále degradovány a pravděpodobně apoptoticky zanikají (Couvovanis *et* al., 1993). V časném období života v období fetálního vývoje (u prasete 64. den) je v oogoniích zahájeno meiotické dělení. Z primordiálního folikulu se stává folikul primární a z oogonie oocyt. Oocyt primárního folikulu je sférická buňka o průměru kolem 25  $\mu\text{m}$ . Má veliké mírně excentricky umístěné jádro, obsahující veliké jadérko (nukleolus). Cytoplazmatické organely se shlukují poblíž jádra, je zde značné množství mitochondrií. Po zformování struktury primárního folikulu nastává fáze klidu a granulózní buňky se zastaví v G0 fázi buněčného cyklu. Aby dále probíhala folikulogeneze musí dojít k iniciaci růstu folikulu. Je to velice složitý proces probíhající kontinuálně během celého života. Doposud se jej nepodařilo zcela objasnit. Mezi faktory podílející se na procesu iniciace patří gonadotropní hormony, růstové faktory parakrinního původu a kit-ligand. FSH zvyšuje expresi růstových faktorů a jejich receptorů, a má tedy nepřímý mitogenní efekt na folikulární buňky. V tomto stádiu vývoje ovšem folikul není přímo závislý na gonadotropní stimulaci. Jedním z prvních faktorů, které zahajují časně děje ve folikulogenezi, se zdá být kit-ligand (Parrot *et* Skinner, 1999). Následkem procesu iniciace dochází k vystoupení granulózních buněk z G0 fáze a nastává jejich pomalá proliferace. Buňky nejprve mění svůj tvar z plochého na kubický a začnou se zvětšovat (Hirschfield, 1991). Postupně se tak stává z primárního folikulu folikul sekundární. Sekundární folikul má jednu vrstvu kubických buněk, které se označují jako buňky granulózní (Eppig, 2001).

Během pohlavního cyklu je možné pozorovat růst folikulů v několika vlnách. V průběhu každé vlny se z kohorty rostoucích folikulů rekrutuje (v závislosti na druhu či plemeni) jeden nebo několik dominantních ovulačních folikulů, pro které je charakteristický intenzivní růst (Hagemann, 1999). Větší část rostoucích folikulů postupně podléhá atrézii. Bez granulózních buněk, nebo alespoň jejich faktorů, nejsou oocyty schopny růstu. Přítomnost granulózních buněk je nezbytná pro expresi proteinů na úrovni transkripce i translace (Vanderhyden, 2002).

Postupně se začíná v těsném okolí oocytu vytvářet glykoproteinová vrstva *zona pellucida* (Lundy *et* al., 1999). U nerostoucích oocytů se tato vrstva nevytváří (Wassarman, 1988). Formují



se výběžky granulózních buněk, které umožňují vzájemné interakce mezi oocytem a somatickými buňkami folikulu (McGee *et* Hsueh, 2000).

V další fázi vývoje folikulu se dokončuje růst oocytu, který dosáhne velikosti 120-150  $\mu$ m a zároveň probíhá výrazná proliferace granulózních buněk, které vytváří několik vrstev. Tento několikavrstevný obal se označuje jako *membrana granulosa* (Hyttel *et* al., 1999). V těsném okolí oocytu jsou buňky vyšší cylindrické, uspořádány radiálně a vytváří jednobuněčnou vrstvu označovanou jako *corona radiata*. Skupiny stromálních fibroblastů a epiteliálních buněk migrují do bazální membrány obklopující folikul, uspořádávají se okolo vrstvy granulózních buněk a vytváří tékální vrstvu (*theca folliculi*) (Wassarman, 1988). Ta má dvě vrstvy. Vnitřní (*theca interna*) přiléhá k bazální membráně a po jejím vytvoření folikul označujeme jako preantrální. Vnější (*theca externa*) splývá s okolním stromatem (Hyttel *et* al., 1999). Výrazně se rozvíjí cévní zásobení tékální vrstvy, přičemž granulózní vrstva zůstává avaskulární (Ferin *et* al., 1997). Vznikají receptory pro LH a FSH (McGee *et* Hsueh, 2000) a folikul začíná být citlivý na gonadotropní stimulaci (Findlay *et* al., 2000). V tomto období se začínou vytvářet mezi granulózními buňkami prostory vyplněné folikulární tekutinou, které postupně splývají až vytvoří antrální dutinu (Driancourt *et* Thuel, 1998). Vytvořením folikulárních dutinek se stává ze sekundárního folikulu folikul terciální.

V průběhu fáze růstu, především však v antrálním stádiu, dochází k diferenciaci granulózních buněk na dvě funkčně odlišné populace. Kumulární buňky, které se nachází v těsném okolí oocytu a murální buňky, které přiléhají ke vnitřní stěně folikulu (Buccione *et* al., 1990). Granulózní buňky jsou již schopné produkovat specifické růstové faktory (Cecconi *et* Rossi, 2001). Komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami je zajištěna pomocí propustných spojů gap-junction a díky parakrinním signálům ovlivňujícím vývoj vaječnicku. Mezi parakrinní regulační systémy patří působení fibroblastového růstového faktoru (FGF), epidermálního růstového faktoru (EGF) a růstový diferenciací faktor (GDF-9) (Driancourt *et* Thuel, 1998; Senbon *et* al., 2003). V granulózních buňkách dochází k výrazné steroidogenezi (především k produkci estradiolu) a nastává diferenciaci buněk, které produkují androgeny v závislosti na míře stimulace LH. Androgeny difundují přes bazální membránu do granulózních buněk, kde jsou aromatizovány vlivem FSH na estrogény (Orly, 1989).

Tyto estrogény potom stimulují růst a dělení granulózních buněk a spolu s FSH stimulují produkci sekretů granulózních buněk (růstové faktory, peptidy, steroidy a další). Konečný vývoj folikulu je těsně závislý na gonadotropinech. FSH hraje určující roli při zvětšování granulózních buněk a jejich udržování. Tyto děje jsou zprostředkovávány a modulovány parakrinními faktory, částečně steroidy a růstovými faktory. LH stimuluje steroidogenezi v tékálních buňkách a podporuje konečné dozrávání granulózních buněk v preovulačních folikulech. Postupně během

růstu folikulu se mění jeho tvar ze sférického na ovoidní a folikul se zanořuje hlouběji do kůry vaječníku. Ve folikulu se vytváří folikulární dutina (*antrum folliculi*) vyplněná folikulární tekutinou (*liquor folliculi*) a folikul se označuje jako antrální popř. terciální (Reece, 1998). Poloha oocyty ve folikulu již není centrální, ale oocyt se nachází excentricky na vejconosném hrbolku – *cumulus oophorus* (Hyttel *et al.*, 1999). Kumulární buňky hromadí kyselinu hyaluronovou. Postupně se zvětšuje prostor mezi kumulárními buňkami při současném zmnožení mezibuněčné hmoty. Zralé oocyty se nacházejí v lepkavé mucinózní matrix. Tento proces se nazývá kumulární expanze, neboli mucifikace kumulu. Zbývající folikulární buňky podléhají morfologickým a funkčním změnám. Po ovulaci se buňky *theca folliculi* a granulózní buňky mění v luteální buňky a formují žluté tělísko (*corpus luteum*) (Monniaux *et al.*, 1997; Romanovský *et al.*, 1988).

## **2.4 Hlavní faktory ovlivňující zrání oocytů**

Postup oocytů meiózou je řízen celým komplexem faktorů. Úloha některých z nich je poměrně dobře prostudována, u řady z nich je však jejich úloha zatím nejasná. Tyto faktory jsou produkovány oocytem nebo somatickými buňkami. Somatické buňky se podílejí na regulaci buněčného cyklu oocyty, mění signální transdukční cesty v oocyty a ovlivňují expresi MPF (M-phase promoting factor) a CSF (cytostatic factor). Regulace buněčného cyklu oocyty přes signály somatických hormonálně regulovaných buněk má pozitivní i negativní efekt. Touto cestou je zajištěna synchronizace meiotického zrání oocytů s ostatními zásadními ději reprodukce savců (Albertini, 1992). Následující kapitoly uvádějí přehled nejdůležitějších faktorů ovlivňujících průběh meiotického zrání savčích oocytů.

### **2.4.1 MPF (Metaphase Promoting Factor)**

MPF byl poprvé popsán jako faktor nalezený v žabích oocytech (*Rana pipiens*) iniciující pokračování meiózy (Masui *et* Market, 1971). V savčím oocyty byl výskyt tohoto faktoru poprvé potvrzen v roce 1977 u myši, o šest let později byl prokázán také v oocyty prasety (Fulka, 1983). Nejprve byl označován jako Maturation Promoting Factor, ale vzhledem k tomu, že tento faktor hraje kromě meiotického zrání svou úlohu také v řízení mitózy somatických buněk, byl jeho název později pozměněn na Metaphase Promoting Factor (Nurse, 1990).

MPF je protein kináza spouštějící svojí aktivitou celou řadu reakcí vedoucích k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a formování dělicího vřeténka (Kastrop *et al.*, 1990; Peter *et al.*, 1990; Verde *et al.*, 1992). Zdárný průběh meiotického zrání vyžaduje aktivaci celé řady signálů směřujících k aktivaci MPF. Pro zahájení procesu kondenzace chromatinu je nezbytná přítomnost aktivního MPF (Levesque *et Sirard*, 1996).

MPF je heterodimerní komplex skládající se ze dvou podjednotek. Katalytickou podjednotku tvoří protein p34<sup>cdc2</sup> (označovaný také jako Cdc2, či Cdk1) a regulační podjednotku představuje cyklin B. Hladina p34<sup>cdc2</sup> se během meiotického zrání nemění, zatímco cyklin B je během meiózy syntetizován a degradován. Jeho dostupnost je jedním z mechanismů regulace MPF. Během zrání se mění celková aktivita MPF. Pro aktivaci MPF je nutné spojení obou podjednotek (Stojkovic *et al.*, 1999). Aktivace p34<sup>cdc2</sup> je vyvolána fosforylací na threoninu 161 protein kinázou nazývanou cdc-aktivační kináza a defosforylací na threoninu 14 a tyrosinu 15 (Yamashita *et al.*, 2000). Tyrosin 15 je před defosforylací inhibičně fosforylován Myt 1-kinázou a threonin 14 Wee-1 kinázou. Obě inhibiční fosfátové skupiny udržují MPF komplex neaktivní až do té doby, než dojde ke kontrole bezchybné replikace DNA (Nigg, 1998).

Defosforylací výše zmíněných dvou míst na p34<sup>cdc2</sup> katalyzuje cdc25 fosfatáza, která je aktivována polo-like kinázou (Plk 1) (Yao *et al.*, 2003). Pokud je zablokována translace cdc25 fosfatázy, je blokován rozpad plazmatické membrány a vznik achromatického vřeténka (Dai *et al.*, 2000; Jones, 2004). K tomu, aby byla potlačena aktivita MPF je potřeba degradace cyklinu B. Ta je umožněna navázáním ubiquitinu na N koncovou oblast cyklinu B. Díky navázanému ubiquitinu je cyklin B rozpoznán proteazómem a degradován (Irniger, 2002).

Samotný p34<sup>cdc2</sup> není většinou degradován, je pouze defosforylován a zůstává v buňce pro další využití (Parrish *et al.*, 1992). MPF aktivita je regulována především dostupností cyklinu B, protože p34<sup>cdc2</sup> je v buňce nadbytek (Dekel, 1995). MPF má schopnost fosforylovat mnoho proteinů. Fosforylační motiv se často vyskytuje u jaderných a DNA vazebných proteinů. MPF způsobuje disociaci těchto proteinů od DNA, a tak podporuje kondenzaci chromatinu a rozpad zárodečného váčku. Dále MPF fosforyluje proteiny jaderné laminy a napomáhá jejímu rozpadu, prostřednictvím src-kinázy ovlivňuje mezibuněčnou aktivitu a komunikaci, fosforyluje centrozóm a způsobuje změny v dynamice mikrotubulů (Stojkovic *et al.*, 1999). Během růstu oocyty je MPF hromaděn jako neaktivní komplex p34<sup>cdc2</sup>/cyklin B, označovaný jako pre-MPF. Pre-MPF je neaktivní z důvodu fosforylace p34<sup>cdc2</sup> inhibiční kinázou. Po vytvoření antrálního folikulu se již pre-MPF nehromadí, ale krátce před GVBD začíná mít oocyt schopnost tento komplex aktivovat (Kanayama *et al.*, 2002; Kubelka *et al.*, 2002). Tento pre-MPF vytvořený během fáze růstu je dostatečný pro znovuzahájení meiózy. U některých živočišných druhů je pro zvýšení aktivního MPF potřeba syntézy nových proteinů a fosforylace buněčných proteinů

(Fulka *et al.*, 1991; Stojkovic *et al.*, 1999). Například pro oocyty prasete, skotu, ovcí, a nebo třeba i drápatky, je pro GVBD potřebná proteosyntéza *de novo* (Schmitt *et Nebera*, 2002). Aktivita MPF během buněčného cyklu kolísá. Oocyt, který se nachází ve stádiu GV má nízkou hladinu aktivního MPF. Zvýšení aktivity MPF má za následek prolomení prvního meiotického bloku, rozpad zárodečného váčku (GVBD) a vstup do diakineze. Maximální hladina aktivního MPF se nachází v metafázi prvního meiotického dělení (metafáze I). Po dokončení metafáze I dochází ke snížení aktivity MPF a začíná anafáze prvního meiotického dělení (anafáze I) (Dedieu *et al.*, 1996).

Pokles aktivního MPF v anafázi I je způsoben snížením hladiny cyklinu B vlivem faktoru označovaného jako tzv. anaphase promoting complex (APC). APC je faktor zahajující segregaci chromozómů a je nezbytný pro nástup anafáze I. Po poklesu aktivního MPF v anafázi I a telofázi I nastává výrazné zvýšení hladiny v metafázi druhého meiotického dělení (metafáze II) (Fulka *et al.*, 1992; Naito *et Toyda*, 1991; Wu *et al.*, 1997). Meióza je zastavena v metafázi II s vysokou hladinou aktivního MPF. Předpokládá se, že za toto zastavení je odpovědný CSF (cytostatic factor), udržující vysokou hladinu aktivního MPF v oocytu. Aktivní část, nebo celý CSF pravděpodobně představuje c-mos protein (Wu *et al.*, 1997). Tato vysoká hladina je udržována po celé období druhého zastavení meiózy a pokud dojde k oplození, anebo k partenogenetické aktivaci nastane prudký pokles hladiny aktivního MPF (Fulka *et al.*, 1992; Hashimoto *et Kishimoto*, 1988; Kishimoto, 1999).

#### 2.4.2 MAP kináza ( Mitogen Activated Protein Kinase)

Spolu s MPF se na regulaci průběhu meiotického zrání také výrazně podílí MAP kináza. Je zapojena také do dynamiky mikrotubulů (Kishimoto, 2003). MAP kináza patří do skupiny serin/threonin protein kináz, které zůstávají vysoce aktivní v průběhu zrání savčích oocytů (Meinecke *et Krischek*, 2003; Campbell *et al.*, 1995; Gotoh *et al.*, 1991).

U prasečích oocytů je MAP kináza aktivována společně s MPF při znovuzahájení meiózy. Inaktivace MAP kinázy je žádoucí po oplození pro formaci prvojádra u myši, prasat a lidí (Sun *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001). K aktivaci MAP kinázy dochází prostřednictvím MEK kinázy (též označovaná jako MAPKK) fosforylací na tyrosinových a serin- threoninových zbytcích. MEK kináza je aktivována fosforylací buď přes Raf1 nebo přes Mos kinázu (u myši) (Matsuda *et al.*, 1992).

Aktivita MAP kinázy zůstává vysoká až do aktivace oocytu, kdy buď klesá současně, anebo až po poklesu aktivity MPF (Sugiura *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003). MAP kináza má široké

spektrum účinnosti. Umožňuje přenos signálu pro zrání z cytoplazmy do jádra a indukuje znovuzahájení meiózy (Inoue *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 1999).

Studie prováděné na myších ukazují, že MAP kináza pravděpodobně není nezbytná pro zahájení meiotického zrání jejich oocytů (Sun *et al.*, 1999). Účastní se zřejmě až v amplifikačním kroku (Nebera *et al.*, 1993). Ovlivňuje dynamiku změn mikrotubulárního systému při přechodu z interfáze do metafáze. Během meiózy změny mikrotubulárního systému a kondenzace chromatinu korelují s MAP kinázovou aktivitou více než s aktivitou MPF (Verlhac *et al.*, 1994). MAP kináza také fosforyluje proteiny laminy na stejných místech jako MPF a tak se pravděpodobně podílí na průběhu GVBD (Murray *et al.*, 1993).

Dokonce může dojít k rozpadu jaderné membrány zárodečného váčku při inhibici MPF, tedy pravděpodobně vlivem MAP kinázy (Kubelka *et al.*, 2002). MAP kináza fosforyluje proteiny zodpovědné za udržování chromatinu v kondenzovaném stavu. Pravděpodobně je toto jednou z příčin, proč chromozomy mezi metafázemi zůstávají v kondenzovaném stavu a oocyt nepřechází do interfáze (Dekel, 1995). Aktivace celé kinázové dráhy je podstatná pro vytvoření meiotického vřeténka, vydělení pólového tělíska a zastavení meiózy v metafázi II. V neposlední řadě je MAP kináza společně s Mos kinázou součástí cytotatického faktoru (CSF) (He *et al.*, 1997).

### 2.4.3 CSF (Cytostatic Factor)

Existence cytotatického faktoru, který udržuje vysokou aktivitu MPF a zastavuje zrání oocytů savců v metafázi II, byla poprvé prokázána v oocytech obojživelníků (Masui *et al.*, 1971). Později byla identifikována hlavní katalytická komponenta cytotatického faktoru (CSF) serin/threonin protein kináza Mos, produkt protoonkogenu *c-mos*. Mos má především za úkol stabilizovat MPF a u některých živočišných druhů také MPF aktivaci. Aktivace MPF není přímá, Mos totiž nejprve fosforyluje MEK 1 kinázu a tak stimuluje MAP kinázovou dráhu (Sagata, 1997). Aktivovaná MAP kináza v metafázi II fosforyluje p90Rsk (ribosomální protein S6-kináza), který aktivuje Bub 1 („checkpoint gen“), jenž přes proteiny Mad 1 a 2 inhibuje APC (activated protein C) faktor. Díky tomu nemůže APC degradovat cyklin B a v oocytu zůstává vysoká hladina aktivního MPF (Kishimoto, 2003).

Krátce po stimulaci oocytů k znovuzahájení meiózy nastupuje aktivita Mos, nejvyšší hodnoty pak dosahuje po GVBD a v této úrovni se udržuje až do aktivace. Důležité je, že Mos zastavuje meiotické zrání v metafázi II, ale nikoli v metafázi I. Mechanismus, jakým je toto zajištěno není dosud znám (Stojkovic *et al.*, 1999). Až po proniknutí spermie do oocytu při

procesu oplození se zvyšuje hladina  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pomocí proteinu oscilinu, jež vnáší do oocyty spermie, je aktivována kalmodulin dependentní protein kináza II zprostředkovávající inaktivaci CSF a následnou destrukci MPF (Sun, 2003; Suzuki *et al.*, 2002). C-mos/CSF je pravděpodobně zapojen také do regulačního systému organizace mikrotubulů v různých fázích meiotického zrání (O'Keefe *et al.*, 1989).

Cyklin B je po oplození nebo partenogenetické aktivaci degradován přes DBRP (Destruction-Box Recognition Protein). Ten se váže na cyklin B, ubiquitin-ligasa pak připojí na tento komplex několik molekul ubiquitinu (Ubi), což navodí degradaci cyklinu B v proteasomech. Polyubikvitancí cyklinu B klesá aktivita protein kinasy MPF, a to má za následek prolomení druhého meiotického bloku a dokončení meiózy (Yamano *et al.*, 2004).

#### 2.4.4 *Plk 1 (Polo-like kinase)*

Plk1 patří do skupiny polo-kináz, které se strukturálně liší od cyklin dependentních kináz a jsou na cyklinech nezávislé. Tyto kinázy jsou nezbytné pro zdárný průběh buněčného cyklu (Nigg, 1998). Polo-like kinase (Plk 1) se pravděpodobně podílí na regulaci a aktivaci cdc25. Zvýšení fosfatázové aktivity cdc25 hraje nezbytnou roli v kontrole počátku meiotického a mitotického zrání. Aktivní cdc25 zvyšuje koncentraci aktivního MPF konverzí neaktivního pro-MPF komplexu. Plk 1 je u prasečích oocytů aktivovaná dříve než nastává aktivace MPF a je důležitým buněčným regulátorem (Anger *et al.*, 2004).

Účastní se regulace centrosomálního zrání, formace dělicího vřeténka, aktivace APC a separace homologních chromozomů během meiotického zrání (Lane *et Nigg*, 1996). Měření úrovně exprese RNA zjistila vysoký výskyt Plk 1 mRNA v proliferujících buňkách. Maximální hladina mRNA byla zjištěna v G2/M fázi buněčného cyklu, naopak v G1 fázi mRNA Plk 1 chybí (Uchiumi, 1997).

#### 2.4.5 *PKC (Protein kináza C)*

Protein kináza C se podílí především na řízení přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu a z G2 do M fáze buněčného cyklu (Black, 2000). Rodina PKC zahrnuje 11 různých serin/threonin kináz, jež mohou být aktivovány  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a diacylglycerolem (Nishizuka, 1988). PKC můžeme podle jejich struktury rozdělit do tří skupin: 1. konvenční, jež mají jak místo pro vazbu diacylglycerolů tak i místo pro vazbu vápníku. 2. nové, jimž chybí vazebné místo pro vápník

(jsou nezávislé na vápníku) a 3. atypické, jež řadíme na základě jejich homologie s předchozími dvěma třídami k PKC, i když nemají vazebná místa ani pro DAG ani pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Mellor *et Parker* 1998). Tyto kinázy mohou mít na meiotické zrání jak stimulační, tak také inhibiční účinek, záleží na načasování aktivace v cyklu a na izoformě, která se akce účastní (Livneh *et Fishman* 1997; Sun *et Nagai*, 2003).

Úloha PKC v řízení meiotického zrání savčích oocytů je objasněna jen z malé části. Většina experimentálních studií byla prováděna na laboratorních hlodavcích. Největší znalosti máme o úloze PKC v metafázi I myších oocytů. Víme, že se podílí na udržení metafázního stavu a udržení aktivity MPF. Pro přechod z metafáze I do anafáze I u myších oocytů je nezbytné, aby došlo k její inaktivaci (Viveiros *et al.*, 2001). Aktivace PKC v prasečích oocytech obklopených kumulárními buňkami brání aktivaci MAP kinázy a rozpadu zárodečného vakuolu (Fan *et al.*, 2002).

## 2.4.6 Vápník

Vápník je významnou intracelulární signální molekulou. Vápníkové ionty hrají klíčovou roli v regulačním mechanismu meiotického zrání (Kaufman *et Homa*, 1993). V intracytoplazmatických zásobárnách (především v endoplazmatickém retikulu, menší zásobárny představují též mitochondrie a někdy i další orgány) bývá uskladněn vápník navázaný na proteiny jako je calsequestrin a calreticulin (Clapham, 1995).

U prasečích oocytů jsou hlavní depozita vápníku umístěna v karyoplazmě, vakuolách, mitochondriích a na povrchu lipidových granul a vyskytují se rovněž v cytoplazmě a jádře kumulárních buněk (Petr *et al.*, 2001). Volné kalciové ionty jsou druhým poslem ve všech typech buněk. Účastní se regulace různých fyziologických procesů, jako je růst, vývoj či zánik buňky, ale například i proteosyntézy, kontrakce svalových vláken a oogeneze. Nejlépe je prozkoumána role vápníku při oplození (Miyazaki, 1991; Yanagimachi, 1994).

Přechod vápníku do cytosolu umožňují především 2 signální kaskády – dráha využívající inositol 1,4,5 – trifosfátové ( $\text{IP}_3$ ) receptory ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) a dráha využívající ryanodinové receptory (Clapham *et al.*, 1995; Petr *et al.*, 2002). Z cytoplazmy jsou  $\text{Ca}^{2+}$  ionty transportovány do lumen zásobních organel ATPázovými SERCA pumpami (Pozzan *et al.*, 1994).

Klíčovým proteinem stojícím na vrcholu  $\text{IP}_3$  signální kaskády je membránový enzym fosfolipáza C (PLC). PLC hydrolyzuje fosfatidyl inositol 4,5, - bis fosfát ( $\text{PIP}_2$ ) na 1,2 – diacylglycerol (DAG) a 1,4,5 – trifosfát ( $\text{IP}_3$ ). DAG zůstává v plazmatické membráně a společně s  $\text{Ca}^{2+}$  pomáhá aktivovat enzym protein kinázu C (PKC).  $\text{IP}_3$  opouští plazmatickou membránu a

difunduje cytosolem. Když dosáhne endoplazmatického retikula, naváže se na něj a otevře  $\text{Ca}^{2+}$  kanály v jeho membráně. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  uložené uvnitř endoplazmatického retikula proudí otevřenými kanály ven do cytosolu, čímž prudce vzroste cytosolová koncentrace volných iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , která je normálně udržována na velmi nízké úrovni (Alberts *et al.*, 1998). Bylo potvrzeno, že  $\text{IP}_3$  receptory hrají významnou úlohu při regulaci meiotického zrání oocytů ježovky (Clapper *et Lee*, 1985), myši (Carroll *et al.*, 1994), skotu (Yue *et al.*, 1995) a prasete (Machaty *et al.*, 1997).

Dalšími významnými receptory, jež mohou být zodpovědné za vylití  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplazmy jsou ryanodinové receptory (RyR). V oocytech je aktivuje cyklická adenosindifosfát ribóza (cADPR), která vzniká přeměnou nicotinamidadeninukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ) ADP – ribosyl cyklázou (McPherson *et Campbell*, 1993). Úloha RyR byla prokázána u oocytů skotu (Yue *et al.*, 1995), člověka (Sousa *et al.*, 1996) a prasete (Machaty *et al.*, 1997). Vápník je obsažen ve svých zásobárnách již v nezralých oocytech, jeho receptory jsou však méně citlivé k uvolňujícím se stimulům (Shiraishi *et al.*, 1995).

Vápníkové ionty hrají roli především v časné fázi iniciace výstupu z bloku v profázi I. Ošetření myších a křeččích oocytů  $\text{Ca}^{2+}$  ionofory vede k porušení meiotického bloku, zatímco inhibice  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů tento blok podporuje (Wassarmann, 1988). Byl potvrzen význam vápníku pro znovuzahájení meiotického zrání také pro oocyty prasete (Rozinek *et al.*, 2003). Při blokaci vápníkových kanálů došlo k zastavení meiotického zrání oocytů v první meiotické metafázi. Uvolněním vápníku z intracelulárních zdrojů v první metafázi naopak meiotické zrání podpořilo (Petr *et al.*, 1997).

U většiny druhů je dále velmi významné přechodné zvýšení hladiny vápníku v době oplození (Machaty *et al.*, 1997). Mezi vazebné proteiny  $\text{Ca}^{2+}$  patří kalmodulin (CaM), jehož cíle působení jsou rozmanité, především má schopnost aktivovat na něm dependentní kinázy (CaMK) a fosfatázy. Pro vývoj oocytů je významná hlavně CaMK II, jež se uplatňuje ve zpětné vazbě na  $\text{IP}_3$  dráhu, fosforyluje  $\text{IP}_3\text{R}$  a inhibuje tak další výlev vápníku a aktivuje  $\text{IP}_3\text{R}$  kinázu, jež má schopnost modifikovat různé fosfoinositidy (Matifat *et al.*, 2001).

CaMK II se účastní řady kroků aktivace, významná je účast v iniciaci degradace cyklinu B (Lorca *et al.*, 1993). Další na vápníku závislá molekula, proteáza kalpain, může modifikovat proteiny buněčného cyklu a jádra a ovlivňovat výstavbu a rozpad mikrotubulů (Williams, 2002).



### 2.4.7 OMI (Oocyte Maturation Inhibitor)

Součástí folikulární tekutiny je také OMI (Oocyte Maturation Inhibitor), další z inhibičních faktorů udržujících oocyty v diplotenním stádiu prvního meiotického dělení. Je to polypeptid o molekulové hmotnosti 1 – 2 kDa, jehož koncentrace se snižuje úměrně zvětšování folikulu (Van de Wiel, 1983). OMI nepůsobí přímo na oocyt, ale na kumulární buňky (Hillensjö *et al.*, 1979). Oocyty z nichž byly odstraněny kumulární buňky zrají i v přítomnosti OMI. Je možné, že inhibiční účinek OMI na meiotické zrání je zvyšován cAMP (Wassarman, 1988).

### 2.4.8 Cyklické nukleotidy

Významným regulátorem meiotického zrání jsou cyklické nukleotidy, především cyklický adenosin a guanosinmonofosfát (cAMP a cGMP) (Törnell *et al.*, 1991; Bevers *et al.*, 2002). Cyklické nukleotidy jsou součástí folikulární tekutiny antrálních oocytů a hrají důležitou roli v regulaci meiotického zrání. Cyklické nukleotidy jsou syntetizovány kumulárními buňkami (Sato *et Koide*, 1987).

#### 2.4.8.1 cAMP

cAMP pravděpodobně působí na meiózu přes cAMP dependentní protein kinázu (PKA), která má v aktivní formě inhibiční účinek na meiotické zrání (Schmitt *et Nebera*, 2002; Bornslaeger *et al.*, 1986). Na aktivaci této kaskády se zřejmě podílí růstový hormon (Sirard *et al.*, 2001). Enzym PKA má dvě podjednotky, katalytickou (K) a regulační (R) (Wassarman, 1988). Vysoká koncentrace aktivní PKA před znovuzahájením meiózy inhibuje translaci mRNA pro Mos. PKA totiž inhibuje polyadenylaci této mRNA, která je nutná pro efektivní translaci. Jakmile poklesne hladina cAMP, dojde k poklesu PKA a nastane GVBD. Následuje polyadenylace mRNA pro Mos a proteosyntéza Mos, která je důležitá pro organizaci mikrotubulárního systému a druhý meiotický blok (Lazar *et al.*, 2002).

V oocytu se nachází vysoce aktivní fosfodiesteráza (PDE-3A), která odbourává cAMP produkovaný adenylátcyklázou a udržuje tak konstantní hladinu cAMP. Přerušení gap-junctions přes LH (Larsen, 1987) a následné snížení hladiny cAMP v oocytu je jedním z faktorů

iniciujících znovuzahájení meiózy a nástup GVBD (Dekel *et al.*, 1988). Ke snížení hladiny cAMP tedy dojde pomocí dvou mechanismů. Jedním z nich je aktivita fosfodiesterázy a druhým je zastavení přílivu cAMP produkovaného granulózními buňkami.

#### **2.4.8.2 cGMP**

Role cGMP je sporná. Bylo experimentálně zjištěno, že zvýšení cGMP snižuje hladinu cAMP a podporuje meiotické zrání křeččích oocytů (Hubbard *et Price*, 1988). Bylo také zjištěno, že cGMP stimuluje u potkanů a křečků znovuzahájení meiózy. cGMP byl nalezen v potkaních granulózních buňkách a jeho hladina je regulována gonadotropiny (Dail *et al.*, 1980; Ratner *et Saborn*, 1980). Naopak Törnell *et al.* (1991) sledovali inhibiční efekt na meiotické zrání přes zvýšení koncentrace cGMP u potkaních COC (komplex oocytu s kumulárním buňkami).

Zřejmě existují dva signální mechanismy působící buď stimulačně, a nebo inhibičně na zdárný průběh meiotického zrání myších oocytů. Je možné, že stimulační účinek NO na znovuzahájení a průběh meiózy probíhá přes cAMP a inhibiční mechanismus přes cGMP (Bu *et al.*, 2004).

### **2.5 cGMP – dependentní signální kaskáda**

cGMP kaskáda představuje významný regulační mechanismus, uplatňující se v řadě fyziologických dějů. Do cGMP dependentní signální kaskády jsou zapojeny molekuly, které se vzájemně aktivují a následně se účastní dalších biochemických procesů. S postupnou aktivací jednotlivých zástupců, vzrůstá množství aktivovaných cílových molekul. Proto i při minimálních množstvích primárních stimulačních látek je dosahováno velkého množství cílových molekul, které jsou schopny zprostředkovat fyziologickou odpověď. Do cGMP signální kaskády jsou zapojeny:  $\text{Ca}^{2+}$ , oxid dusnatý (NO), solubilní guanylát cykláza (sGC), cyklický guanosin monofosfát (cGMP), protein kináza G (PKG) a fosfodiesteráza 5 (PDE 5). Vápník, NO a PKG jsou pravděpodobně hlavními regulátory kaskády.

cGMP aktivuje PKG, která může upravovat jeho vlastní syntézu i degradaci. Na druhé straně PKG může snižovat intracelulární vápníkovou koncentraci.

### 2.5.1 Uplatnění vápníkových iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) v NO/cGMP kaskádě

Příjem vápníku do buňky je do určité míry řízen koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  v intracelulárních zásobárnách. Vydání  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních rezervoárů způsobuje vyčerpání buněčných zásob, což aktivuje vstup nových  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buněčných prostorů. Tímto způsobem je pravděpodobně udržován zvýšený obsah  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce (Parekh *et Penner*, 1997). Nicméně mechanismus, který tento děj řídí, nebyl ještě objasněn. V některých typech buněk byla zjištěna aktivace vstupujícího  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí rozpustného mediátoru, který vytváří změny v endoplazmatickém retikulu měnící propustnost plazmatické membrány pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Randriamampita *et Tsien*, 1993).

Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  může být řízen i jinými faktory, včetně molekul s nízkou molekulární hmotností např. G proteinem (Bird *et Putney*, 1993; Fasolato *et al.*, 1993), tyrozin kinázou (Vostal *et al.*, 1991) a tyrozin fosfatázou (Jenner *et al.*, 1994). cGMP může hrát klíčovou roli při regulaci vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Bylo pozorováno, že cGMP může aktivovat vstup vápníkových iontů do buněk exokrinní části pankreatu (Bahnon *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) a epiteliálních buněk rekta (Bischof *et al.*, 1995). Avšak jiní autoři tvrdí, že cGMP koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  snižuje (Fasolato *et al.*, 1993). Zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  může zdvihát hladinu buněčného cGMP, který může ovlivnit vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buněčných zásobníků v endotelových buňkách. Bylo zjištěno, že zvýšená hladina cGMP může za určitých podmínek inhibovat vstup  $\text{Ca}^{2+}$ . cGMP a PKG mohou být základní součástí kontroly vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do intracelulárního prostoru minimálně u endotelových buněk (Xu *et al.*, 1994).

Tento mechanismus zabraňuje buňkám v nadměrném přijímání  $\text{Ca}^{2+}$ , což je chrání před apoptózou (Murphy, 1999; Balligand *et Cannon*, 1997). Po přidání PKG (protein kináza G) inhibitoru KT5823 a inhibitoru vápníkových kanálů endoplazmatického retikula PCA (Cyclopiazonic acid), dochází ke zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v buněčných zásobárnách. PCA zvyšuje hladinu cGMP, který za normálních okolností stimuluje aktivitu PKG. PKG ale v tomto případě není příliš aktivní. Příčinou je přítomnost PKG inhibitoru. Dochází k doplnění  $\text{Ca}^{2+}$  v rezervoárech endotelových buněk. Při zvýšení hladiny cGMP a odstranění inhibice PKG v přítomnosti PCA, se příliv vápenatých iontů téměř zastaví.

Je pravděpodobné, že PKG, vnímavá k vstupujícímu  $\text{Ca}^{2+}$ , hraje jedinou limitující roli, která udržuje vápník pod základním nestimulovaným stavem. Bylo zjištěno, že vstupní cesta vápenatých iontů je většinou uzavřena PKG fosforylací. Nicméně může být otevřena ve stavu vyčerpání zásobáren  $\text{Ca}^{2+}$ , pravděpodobně produkcí „vápník uvolňujícího faktoru“ nebo aktivací tyrozin kinázy (Randriamampita *et Tsien*, 1993). Na druhé straně, vyčerpané zásobárny mohou stimulovat produkci cGMP. V tomto úseku se tedy vyskytují dva odlišné mechanismy, jeden

stimuluje přijímání vápníku do buňky, zatímco druhý příjem vápníku inhibuje (Kwan *et al.*, 2000). Názory na inhibici cGMP se různí. Bylo zjištěno, že vysoká koncentrace cGMP způsobuje naopak aktivaci vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky (Bahnon *et al.*, 1993; Bischof *et al.*, 1995). Kwan *et al.* (2000) jsou toho názoru, že mechanismy regulující vstup vápníkových iontů do buňky jsou rozdílné u jednotlivých typů buněk.

### 2.5.2 Uplatnění oxidu dusnatého (NO) v cGMP dependentní kaskádě

NO je rozptýlený volný radikál, v nízkých koncentracích plní funkci signální molekuly, ve vysokých koncentracích funguje jako ochranný cytotoxin. Jako intracelulární přenašeč je zapojen do mnoha fyziologických dějů (Bredt *et Snyder*, 1994) včetně reprodukce (Biswas *et al.*, 1998). Byl identifikován jako důležitá signální molekula, hrající klíčovou roli v kardiovaskulárním a nervovém systému (Waldman *et Murad*, 1987). Mimo jiné může také modulovat produkci hormonů (Moncada *et al.*, 1991), je důležitým poslem buněčné smrti, může také regulovat tkáňovou přestavbu související s ovulačním cyklem (Elman *et al.*, 1993). Byla popsána aktivace prasečích oocytů oxidem dusnatým. Tento stimulus je velmi specifický v mnoha aspektech. NO stimuluje některé signální kaskády (NO – dependentní), které jsou inaktivní za normálních podmínek. (Petr *et al.*, 2007). NO – syntáza (NOS) je enzym odpovídající za produkci NO z L – argininu (Nathan *et Xie*, 1994). Zvýšení koncentrace NO bývá způsobeno stimulací NOS cytokininy a jinými biologicky modifikovanými molekulami (Lamas *et al.*, 1992). Produkce intracelulárního mediátoru NO, hraje roli především v aktivaci sGC (solubilní guanylát cyklázy) (Ignarro *et al.*, 1986).

### 2.5.3 Guanylát cyklázy (GC)

Jedná se o skupinu signálních a transdukčních enzymů. GC katalyzují vznik cGMP z GTP. Princip je podobný jako u jiných transdukčních a signálních enzymových skupin např. protein tyrozin kinázy a protein tyrosin fosfatázy. Je známa forma vázaná na buněčné membrány a tzv. solubilní guanylát cykláza (sGC) přítomná uvnitř buněk v cytoplazmě. Membránová forma GC se vyskytuje ve třech izoformách (GC-A, GC-B, GC-C). GC-A a B jsou stimulovány natriuretickými peptidy a GC-C je ovlivňována enterotoxinem *Escherichie coli*. Tyto proteiny se váží na receptorové skupiny těchto enzymů. Jednotlivé izoformy se liší svou extracelulární

enzymovou skupinou, intracelulární skupinu, která je zodpovědná za tvorbu cGMP, mají stejnou (Koesling *et al.*, 1991).

### 2.5.3.1 sGC (soluble guanylyl cyclase)

Solubilní forma guanylát cyklázy je hlavním receptorem pro NO (Ignarro, 1993; Hobbs, 1997). Tento enzym se účastní nepostradatelných fyziologických a biochemických procesů ve většině orgánových soustav (např. oběhové, dýchací a nervové). Nachází se v téměř všech savčích buňkách. sGC je heterodimer, který se skládá z podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Každá z těchto podjednotek se rozděluje na dva další typy ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ;  $\beta 1$  a  $\beta 2$ ) (Koesling *et al.*, 1988; Nakane *et al.*, 1988). Obě podjednotky jsou nepostradatelné pro funkčně aktivní protein (Nakane *et al.*, 1990; Russwurm *et al.*, 1988). V savčích buňkách byly prokázány dva různé heterodimerní enzymy  $\alpha 1\beta 1$  a  $\alpha 2\beta 1$ , přestože se  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  liší primární strukturou, jsou si oba heterodiméry funkčně podobné (Russwurm *et al.*, 1988; Zabel *et al.*, 1999). Heterodimer  $\alpha 1\beta 1$  je přítomen ve všech tkáních. Nedávno byla potvrzena aktivace samostatné podjednotky  $\beta 2$  oxidem dusnatým (NO) i přestože má tento enzym monomerní strukturu (Koglin *et al.*, 2001).

Strukturálně každá podjednotka obsahuje C- terminální cyklázu s katalytickou skupinou, centrální dimerní oblast a N – terminální část. Tato poslední část představuje hemovou skupinu umožňující vazbu NO. (Russwurm *et al.*, 1988; Zabel *et al.*, 1999). Hem je nebílkovinná část hemoglobinu skládající se z centrálního atomu dvoumocného železa  $Fe^{2+}$  a pofyrinového řetězce. Právě hemová komponenta je zodpovědná za senzitivitu sGC k NO (Zhao *et al.*, 1999).

sGC hraje pravděpodobně roli receptoru endogenního i exogenního NO (Koesling *et al.*, 1999; Andreopoulos *et al.*, 2000). Aktivací sGC roste množství cGMP (Moncada *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1995). V případě inhibice endogenní NO – syntázy, vnímavost sGC stoupá (Papapetropoulos *et al.*, 1996; Ujii *et al.*, 1994). Nicméně mechanismus tohoto fenoménu zůstává nejasný. Redoxní reakce mohou být věrohodným mechanismem pro inaktivaci enzymu. Některé studie došly k závěru, že redoxní stav hem – vázících enzymů a protein thiolových skupin má majoritní roli při kontrole enzymatické aktivity (Papapetropoulos *et al.*, 1996; Dierks *et al.*, 1998). Tato aktivita může být také regulována fosforylačními a defosforylačními mechanismy (Ferrero *et al.*, 2000; Zwiller *et al.*, 1985).

Aktivitu sGC ovlivňuje koncentrace obou podjednotek a zároveň mRNA (Shimouchi *et al.*, 1993; Papapetropoulos *et al.*, 1995). Snížení aktivace sGC vede ke stimulaci NO produkce. Inaktivace je způsobena sníženou koncentrací  $\beta 1$  nebo mRNA, která podjednotky sGC kóduje

(Ferrero *et al.*, 2000). Nadměrné množství NO pravděpodobně snižuje hladinu podjednotky  $\beta 1$  přes translokačně-nezávislý mechanismus (Schrammel *et al.*, 1996).

sGC je velmi vnímavá k oxidaci, enzym ztrácí svou vnímavost k NO (Papapetropoulos *et al.*, 1996). Antioxidanty např. vitamín E snižují vaskulární aniontové uspořádání a zvyšuje hladinu beta 1 a tím i sGC v aortální tkáni krys (Bauersachs *et al.*, 2001).

#### 2.5.4 cGMP (cyklický guanosin monofosfát)

cGMP je tvořen z GTP (guanosin trifosfát) aktivovanou sGC (Koesling *et Friebe*, 1999). Buněčné cGMP efekty vyplývají z aktivace odlišných cGMP efektorových proteinů, jako je cGMP-dependentní protein kináza (PKG) (Hofmann *et al.*, 2000), fosfodiesteráza 5 (PDE 5) (Juilfs *et al.*, 1999) a cGMP - iontové kanály (Biel *et al.*, 1999). Zvyšování koncentrace cGMP podporuje aktivaci PDE 5, která je schopna cGMP degradovat (Francis *et al.*, 2001).

Po aktivaci sGC a následném rapidním vzrůstu cGMP jeho hladina prudce klesá, to může představovat kontrast mezi aktivitou PDE 5 a syntézou cGMP. sGC cyklizuje GTP na cGMP, který může být hydrolyzován PDE 5 na GMP. GMP je připraven na fosforylaci za přítomnosti fosfokinázy. Jejím průběhem GMP/GDP/GTP se z něj stává opět GTP. Jediný enzym, který je schopný konvertovat cGMP na GMP, jenž se dále vrací do metabolismu, je PDE 5. Při produkci cGMP v přítomnosti PDE 5 inhibitorů dochází k výraznému snížení koncentrace guanosin trifosfátů. Je pravděpodobné, že snížení GTP vede k masivnímu snížení přístupu substrátu pro sGC (Pfeifer *et al.*, 1998).

cGMP má vliv na uvolňování  $Ca^{2+}$ , protože přímo aktivuje kalciové kanály, to bylo pozorováno u mnoha typů somatických buněk (Cataldi *et al.*, 1999, Carabelli *et al.*, 2002, D'Ascenzo *et al.*, 2002) a také v oocytech (VanCoppenolle *et al.*, 1997)

#### 2.5.5 Protein kináza G (PKG)

PKG byla poprvé popsána Kuoem a Greengardem (1970). Jedná se o cGMP - dependentní protein kinázu, která je součástí proteinové výbavy řady eukaryotických buněk (Lohmann *et al.*, 1997). Náleží do rodiny serin/treonin kináz. PKG fosforyluje proteiny, které dále regulují hladinu  $Ca^{2+}$ , výbava těchto proteinů se liší podle typu buňky (Cornwell *et al.*, 1991).

Protein kinázy G jsou složeny ze tří funkčních domén: N – terminální, regulační a katalytické domény (Pfeifer *et al.*, 1999). Regulační doména vytváří dvě za sebou uložená

vazebná místa pro cGMP, zatímco katalytická doména umožňuje vazbu ATP a peptidů. Poslední doména zprostředkovává přenos  $\gamma$  - fosfátu z ATP na serin/treoninový zbytek cílového proteinu. N – terminální doména má tři funkce:

1. Dimerizace – PKG jsou homodimery, které jsou spojeny leucinem z N – terminální domény.
2. Aktivace/inhibice – ovlivňuje vazbu cGMP s regulační doménou, čímž umožňuje aktivaci PKG.
3. Specifické působení – tyto enzymy působí specificky v různých subcelulárních lokalizacích, právě díky N – terminální doméně (Hofmann *et al.*, 2000).

Mechanismus působení a funkce cGMP – dependentní kaskády na buňku a s tím související úloha PKG, byla nejlépe popsána u buněk hladkého svalu. Hladkosvalová relaxace je zprostředkovávána generací NO a následnou aktivací PKG (Pfeifer *et al.*, 1998). Svalové napětí je regulováno intracelulární koncentrací  $Ca^{2+}$ . Při snížené intracelulární hladině  $Ca^{2+}$  nedochází k aktivaci myosinu a hladkosvalová buňka zůstává relaxovaná (Hofman *et al.*, 2000).

Bylo prokázáno, že svalová relaxace může být ovlivňována i při konstantních hladinách  $Ca^{2+}$  změnou senzitivity kontrakčního aparátu k těmto iontům (Lee *et al.*, 1997). PKG pravděpodobně ovlivňuje jak hladinu  $Ca^{2+}$  v cytosolu, tak i jeho senzitivitu na cílové receptory. Předpokládá se propojení Ca – dependentní a NO – dependentní kaskády přes cGMP nebo PKG několika procesy. PKG fosforyluje a aktivuje ADP- ribosyl cykáz, která syntetizuje cADP – ribózu (tlumení ryadinových receptorů) (Lee, 1996, Graeff *et al.*, 1998), což způsobuje zadržování  $Ca^{2+}$  v intracelulárních rezervoárech (Clapper *et al.*, 1987, Galione *et al.*, 1991). Některé studie popisují jak PKG inhibuje hydrolýzu inositol bisfosfátu na IP3 (zvyšuje hladinu  $Ca^{2+}$  v cytosolu) a diacyl glycerol (DAG) (Rapoport, 1989, Ruth *et al.*, 1993). DAG je znám jako aktivátor protein kinázy C (PKC) (Gomez – Fernandez *et al.*, 2004), která mimo jiné hraje důležitou roli v aktivaci savčích oocytů (Sedmíková *et al.*, 2006). Dále PKG fosforyluje IP3 - receptor typu 1 *in vivo* i *in vitro* (Komalavilas *et Lincoln*, 1996). Tato fosforylace má přímý vliv na intracelulární hladinu  $Ca^{2+}$  (Haug *et al.*, 1999).

PKG přímo fosforyluje kalcium-aktivující  $K^+$  kanály, čímž působí hyperpolarizaci buněčné membrány (Alioua *et al.*, 1998). Samotná hyperpolarizace uzavírá celou řadu různých iontových kanálů, včetně L – typu kalciových kanálů (White *et al.*, 1993).

### 2.5.5.1 Typy PKG

Protein kinázy G se vyskytují ve dvou typech. Typ I (PKG I) je homodimer o velikosti 78 kDa, má dvě izoformy I -  $\alpha$  a I -  $\beta$ . Bývá hojně zastoupen ve všech savčích buňkách (Walter, 1988). Typ II (PKG II) má molekulární hmotnost 86kDa, nevyskytuje se tak hojně jako typ I. Vysoké hladiny obou izoform byly prokázány v hladkosvalových buňkách dělohy, cév, střeva a trachei (Keilbach *et al.*, 1992).

#### 2.5.5.1.1 PKG I

Jedná se o skupinu solubilních enzymů, které reagují s různými proteiny prostřednictvím N – terminálních domén. Jejich vysoká koncentrace (nad 0,1  $\mu$ M) byla prokázána v hladkosvalových buňkách, krevních destičkách, mozku, hipokampu, zadních míšních gangliích, nervosvalové ploténce a ledvinných cévách. PKG I se vyskytuje v nízkých množstvích v endotelu cév, granulocytech, chondrocytech a osteoklastech. Izoenzym alfa je zastoupen především v plicích, srdci, trombocytech a mozku (Hofmann *et al.*, 2000).

#### 2.5.5.1.2 PKG II

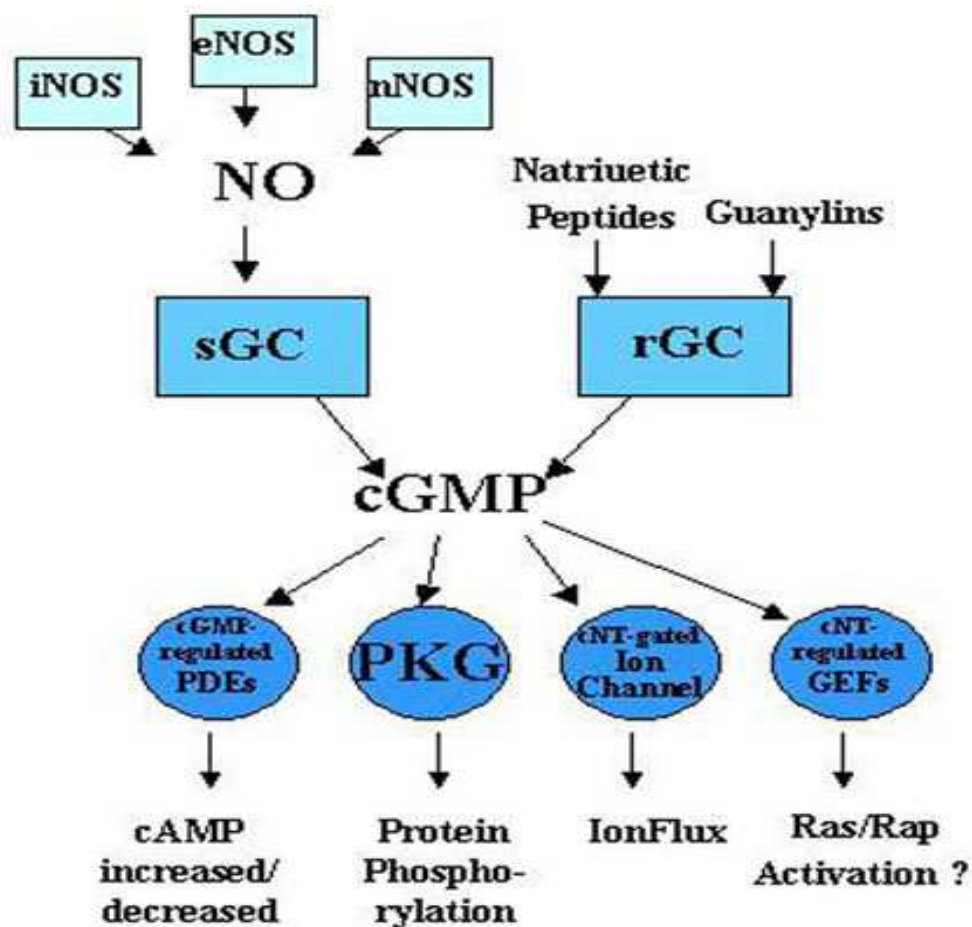
Jedná se o enzymy ukotvené v plazmatické membráně (Vaandrager *et al.*, 1998). Jejich přítomnost byla potvrzena v buňkách některých mozkových jader, střevní sliznice, ledvin, chondrocytů a plic (Lohmann *et al.*, 1997).

### 2.5.6 PDE 5 (fosfodiesteráza typ 5)

Několik různých cyklických fosfodiesteráz (PDE 5) může hydrolyzovat cGMP a tím kontrolovat délku a rozsah jeho působení (Juilfs *et al.*, 1999). Selektivní inhibitory PDE 5 mohou zapříčinit hladkosvalovou relaxaci (Boolell *et al.*, 1996). Molekulární mechanismy regulující aktivitu PDE 5 nejsou dosud zcela objasněny. Je známo z *in vitro* studií, že cGMP může být vázán s nekatalytickým vazným místem PDE 5. Toto spojení umožňuje aktivaci PDE 5 fosforylací serinu 92 (McAllister-Lucas *et al.*, 1993).



Tím se reguluje aktivita PDE5. Toto fosforylační místo bylo popsáno u skotu, lidí, psů a krys. Některé izoformy PDE 5 mohou být *in vitro* aktivovány přes PKG nebo PKA (Thomas *et al.*, 1990). V hladkosvalových buňkách je téměř všechna PDE 5 v defosforylované formě a může být rychle fosforylována aktivovanou PKG. V myších buňkách *in vivo* je PDE 5 v základním stavu jen částečně fosforylována. Protože PKG i PKA může aktivovat PDE 5 *in vitro*, nebylo zjištěno, která signální kaskáda je důležitější pro aktivaci PDE 5 v jednotlivých buňkách a tkáních. Mechanismus hlavní regulační kaskády vede přes cGMP/PKG (Fukao *et al.*, 1999). PDE 5 je pravděpodobně specifickým substrátem pro PKG a zároveň jeho regulátorem (Smolenski *et al.*, 1998). I minimální množství PDE 5 může významně ovlivnit hladinu cGMP a PKG. Tyto proteiny jsou spojeny s regulací koncentrace vápenatých iontů v buňce (Sergei *et al.*, 2002).



Obrázek 1. Schéma cGMP dependentní signální kaskády (Plilz *et Broderick*, 2005)

## 2.6 Některé faktory ovlivňující NO/cGMP kaskádu

### 2.6.1 FSH (Folikuly stimulující hormon)

FSH zvyšuje hladinu cGMP ve folikulech (Makris *et* Ryan, 1978). Nicméně jiné studie uvádějí, že LH a FSH zapříčiňují pokles koncentrace cGMP v komplexech oocytů s kumulárními buňkami v *in vitro* prostředí (Hubbard, 1983). Mechanismus umožňující dozrávání oocytů, může iniciovat snížení hladiny inhibitoru cAMP v savčím oocytu (Dekel *et* Beers, 1978; Schultz *et al.*, 1983). U myši se snížení cAMP předpokládá jak u kumulárních buněk tak i v samotném oocytu. Snížení může být nezbytné pro iniciaci znovuzahájení meiózy (Schultz *et al.*, 1983; Salustri *et al.*, 1985). Například u křečka cAMP klesá v kumulárních buňkách, ale nikoliv v oocytu (Hubbard, 1983; 1986; Racowsky, 1985). Mechanismus, který snižuje hladinu cAMP, vychází ze zvýšení aktivity cAMP-PDE (cAMP-phosphodiesterase) (Bornslaeger *et al.*, 1984).

FSH a cGMP zvyšují aktivitu cAMP-PDE (Beavo *et al.*, 1971; Conti *et al.*, 1984). FSH a cGMP může snižovat hladinu cAMP v komplexech oocytů s kumulárními buňkami (COC) a podporuje zrání aktivací cAMP – PDE. Některé studie uvádí možnost aktivace cGMP vlivem proteosyntézy, která je způsobena zvýšenou aktivací cAMP – PDE (Hubbard *et* Price, 1988). Bylo zjištěno, že cGMP může být důležitým faktorem snižujícím hladinu cAMP během anebo po gonadotropinové vlně. Zatímco počáteční vzestup cAMP může sloužit ke spouštění zráního procesu, zvýšená hladina cGMP může být nepostradatelná pro rychlé snížení cAMP v kumulárních buňkách a povoluje pokračování zráního procesu (Racowsky, 1985; Hubbard, 1986). Zdá se, že u křečka snížení hladiny cAMP v kumulárních buňkách může být důležitější než v oocytu (Hubbard *et* Price, 1988).

### 2.6.2 GnRH (Gonadotropin - Release Hormones)

GnRH jsou uvolňovány hypotalem a pravděpodobně slouží jako neurohormonální kontrola reprodukce, která stimuluje gonadotropinovou sekreci v hypofýze (Peter, 1983). U obojživelníků byly identifikovány některé formy GnRH, které jsou strukturálně příbuzné s formami savců, drůbeže a lososů (Licht *et al.*, 1994). U obojživelníků je hlavním úkolem těchto forem, ovlivnit hypofýzu, aby docházelo k sekreci gonadotropinu. Je fakt, že tyto neuropeptidy indukují uvolňování gonadotropinů (Licht *et* Porter, 1987).

Hypofyziální hladina GnRH interaguje se specifickým G protein-připojujícím receptorem gonadotropinové hladiny a tím spouští aktivaci několika intracelulárních kaskád. GnRH receptor reaguje hlavně pomocí aktivované fosfolipázy s hydrolyzou membránových fosfoinositolů, které jsou přestavěny na diacylglyceroly a inositol fosfatázy (InPs). To jsou postreceptory transdukující přenašeče, které aktivují protein kinázu C (PKC) a mobilizaci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (Schrey, 1985; Kiesel *et al.*, 1986). Jiní autoři popisují tento mechanismus pomocí cGMP a  $\text{Ca}^{2+}$  (Naor *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1980).

## 2.7 Oxid dusnatý

NO je dvouatomová molekula, která snadno proniká skrz biomembrány a je hydrofobní (Kupková *et Beneš*, 2004). Odstraněním nepárového elektronu z NO vznikne nitrosoniový ion  $\text{NO}^+$ . Redukcí oxidu dusnatého vzniká nitroxylový ion  $\text{NO}^-$ . V organismu reaguje NO s kyslíkem, superoxidovými anionty a jinými radikály odvozenými od kyslíku a také s oxyhemoproteiny (Ignarro, 1993). Z biologického hlediska jsou důležité zejména reakce NO s kyslíkem a s ionty transičních kovů (Brune *et Lapetina*, 1995).

Při rozkladu oxidu dusnatého vznikají dusitany, které se v přítomnosti hemoproteinů oxidují až na dusičnany (Kupková *et Beneš*, 2004). Těchto reakcí se využívá při nepřímém stanovení NO, protože dusitany a dusičnany se na rozdíl od NO (jehož poločas rozpadu je krátký a množství malé) dají spektrofotometricky stanovit v takovém množství, v jakém v živé buňce vznikají (Clementi, 1998).

### 2.7.1 Mechanismus působení

Produkce intracelulárního mediátoru NO, hraje roli především v aktivaci sGC (solubilní guanylát cykázy), která následně katalyzuje syntézu cGMP (Ignarro *et al.*, 1986). cGMP jako cílová molekula pro NO se účastní také na zvýšení hladiny cAMP, důležitého faktoru v meiotickém zrání oocytů. Také ionty vápníku mohou být důležité v reprodukčních procesech (Sun *et Nagai*, 2003). NO neaktivuje jen sGC, může se vázat i s mnoha jinými hem - obsahujícími proteiny a tím regulovat jejich aktivitu (Salvemini *et al.*, 1993), spouštět oxidaci železitých komponent a různých zbytků nejčastěji cysteinu. Jsou známy enzymy, na které NO působí inhibičně (Nathan, 1992). Některé z těchto enzymů mají klíčové role v energetickém

metabolismu nebo v syntéze purinových a pyrimidinových bází (prekurzory syntézy nukleových kyselin) (Ischiropoulos *et al.*, 1992). NO destabilizuje proteiny (Schrammel *et al.*, 1996). Ve vysokých koncentracích působí cytotoxicky (Titheradge, 1999; Iadecola, 1997).

### 2.7.2 *Produkce NO*

NO - syntáza (NOS) je enzym, který katalyzuje produkci NO z L – argininu (pěti elektronovou) oxidací. L – arginin podléhá dvěma oxidačním reakcím. Po první této reakci vzniká meziprodukt N<sup>ω</sup>hydroxy-L-arginin, který se druhou oxygenační reakcí mění na L - citrulin a volný radikál NO (Koppenol *et Traynham*, 1996). Na tvorbu 1 molu NO je spotřebován 1 mol O<sub>2</sub> a 1,5 molu NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát) (Liu *et Gross*, 1996).

### 2.7.3 *NO - syntáza*

NO-syntázy jsou homodimery obsahující vazebná místa pro NADPH (nikotinamidadenindinukleotid fosfát), FMN (flavinmononukleotid), FAD (flavin-adenindinukleotid) a kalmodulin (CaM) (Hemmens *et Mayer*, 1998; Boggs *et al.*, 2000). Jejich součástí jsou také pevně vázané kofaktory tetrahydrobiopterin (HB4 = 6R-5,6,7,8 tetrahydrobiopterin) a hemová skupina (protophorfyn IX). Součástí každého NOS monomeru je oxidační doména ležící na amino-konci a redukční doména ležící na karboxylovém konci. Na redukční doméně se nachází vazebná místa pro redukční kofaktory NADPH, FMN, FAD a kalmodulin. Oxidační doména pevně váže tetrahydrobiopterin a thiolátově vázanou hemovou skupinu, která je reakčním centrem pro oxidační reakce. Kalmodulin aktivuje funkce NOS a ovlivňuje především redukční doménu (Stuehr *et al.*, 1999). Uvolňování NO je přísně regulováno aktivitou NOS (Gross *et al.*, 1994). Zvýšení koncentrace NO bývá způsobeno stimulací NOS cytokininy a jinými biologicky modifikovanými molekulami (Lamas *et al.*, 1992).

Byly popsány tři izoformy NOS:

**nNOS (nervová)**, tato izoforma syntetizuje pouze malé množství oxidu dusnatého. Je exprimována konstitutivně (jako konstitutivní jsou označovány enzymy, které jsou v buňce trvale přítomny ve víceméně stálé koncentraci) a je aktivována vzestupem hladiny vnitrobuněčného vápníku (je kalcium a kalmodulin dependentní) (Janssens *et al.*, 1992).

**iNOS (indukovatelná)**, iNOS byla objevena také ve folikulu savců. iNOS katalyzuje syntézu NO v řadě různých buněk a zajišťuje jeho stálou produkci po dlouhou dobu (Jablonka -

Shariff a Olson, 1997). Na rozdíl od nNOS a eNOS vždy obsahuje pevně vázaný kalmodulin s vápníkem. Tato izoforma je regulována na úrovni transkripce (Alderton, 2001). iNOS je produkována v závislosti na stimulu, jež představují nejčastěji endotoxiny a proinflamační cytokiny (Bian *et* Murad, 2003).

**eNOS (endoteliální)**, eNOS byla detekována také ve folikulu savců (Jablonka - Shariff *et* Olson, 1997). Je závislá na zvýšení hladiny kalcia, stejně jako isoforma nNOS (je kalcium a kalmodulin dependentní). Endoteliální NO - syntáza také syntetizuje jen malé množství oxidu dusnatého po krátkou dobu. eNOS je většinou spojena s endoteliálními buněčnými membránami (Janssens *et al.*, 1992).

Buňky mohou exprimovat několik izoform NOS současně (Mehta *et al.*, 1995). Jednotlivé izoformy jsou produkty různých genů s různou lokalizací, regulací, katalytickými účinky a různou citlivostí k inhibitorům (Alderton *et al.*, 2001). nNOS a eNOS jsou konstitutivní enzymy, jež jsou buňkami produkovány stále, nezávisle na podmínkách prostředí. Produkují pouze malá množství NO (Ignarro *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2000).

#### 2.7.4 Regulace NO – syntázy

Aktivitu NOS izoform reguluje pravděpodobně celá řada faktorů. Známa je zatím úloha jen některých z nich (Alderton, 2001).

**Kalmodulin** je nezbytný pro enzymovou aktivitu všech tří izoform. nNOS a eNOS mají ovšem mnohem vyšší požadavky na  $Ca^{2+}$  nežli iNOS (protože má pevně vázaný kalmodulin) (Alderton, 2001).

**Fosforylace** nNOS a eNOS má také efekt na jejich aktivitu. Důležitou úlohu ve fosforylaci sehrávají protein kinázy. Jestliže je eNOS fosforylován na Ser 1179 pomocí proteinkinázy Akt, zvýší se produkce NO (Alderton, 2001). Fosforylace izoform NOS protein kinázou C (PKC) významně snižuje jejich aktivitu (Bredt *et* Snyder, 1992).

**PIN (protein inhibitor of NOS)** inhibuje oxidační aktivitu nNOS, eNOS i iNOS v závislosti na množství (Nathan *et* Xie, 1994).

### 2.7.5 *Inhibitory NO – syntázy*

Mezi metody studia fyziologické úlohy NO patří měření účinku inhibice syntézy či účinku NO na sledovanou fyziologickou funkci. Od začátku devadesátých let jsou k dispozici kompetitivní inhibitory NOS. První inhibitory NOS jsou modifikovanými analogy L-argininu. NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) a NG-monomethyl-L-arginine. Tyto inhibitory nejsou selektivní pro jednotlivé izoformy NOS (Southan *et Szabó*, 1996).

Další NOS inhibitory byly již selektivní k jednotlivým izoformám NOS. Patří mezi ně 7-nitroindazole pro nNOS, N-omega-nitro-L-arginine pro eNOS (Szabó *et al.*, 1994) a nebo aminoguanidin pro iNOS. NOS inhibitory interagují s molekulou NOS různými způsoby na různém místě, v závislosti na čase a v závislosti na substrátu a také v závislosti na mechanismu inhibice (Southan *et Szabó*, 1996; Misko *et al.*, 1993).

#### 2.7.5.1 **Kompetitivní inhibitory NOS**

Tyto inhibitory účinkují na základě kompetitivní inhibice, což znamená, že se inhibitor naváže na vazebné místo pro arginin a ten se pak nemůže navázat. Jedná se o deriváty L-argininu (Rees *et al.*, 1989; 1990). Mezi nejčastěji používané patří NG-monometyl-L-arginin (L-NMMA), N-omega-nitro-L-arginin (L-NA) a N-omega-nitro-L-arginin metylester (L-NAME). Deriváty L-argininu však obsahují alkoholové, aminové, anebo karboxylátové skupiny, které mohou interagovat s řadou intracelulárních systémů obsahujících železo. Nespornou výhodou těchto inhibitorů je existence neúčinného D-konformeru. Tyto neúčinné D-konformery jsou potom výhodně používány jako negativní kontrola efektu vlastních inhibitorů. Tyto typy inhibitorů byly úspěšně použity v celé řadě experimentů při sledování vlivu NO na meiotické zrání (Peterson *et al.*, 1992).

### 2.7.5.2 Akompetitivní inhibitory NOS

Akompetitivní inhibitory jsou inhibitory základního mechanismu iNOS a vyžadují aktivní enzym a NADPH substrát. Inhibice začíná vazbou enzym - inhibitor. Nastanou buď konformační změny těsné vazby, nebo kovalentní změny enzymu inhibitorem a nebo obojí. Do této skupiny patří iNOS specifický inhibitor aminoguanidin (AG) společně s acetamidovými inhibitory (L-NIO, L-NIL, GW273629). V případě inhibice pomocí AG se zdá, že pravděpodobně dojde ke kovalentním změnám enzymu (Bryk *et al.*, 1998; Corbett *et al.*, 1992). Pro inaktivaci NOS aminoguanidinem je nutná současná přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$ , kalmodulinu, NADPH, tetrahydrobiopterinu a kyslíku. Díky této vlastnosti je aminoguanidin označován jako inaktivátor základního mechanismu NOS se zřejmou specifitou k iNOS (Wolff *et al.*, 1995). Aminoguanidin je ale mnohem slabší inhibitor konstitutivních izoform. Efekt aminoguanidinu lze zvrátit použitím NO donoru (Yamauchi *et al.*, 1997).

### 2.7.6 Působení NO na různé orgánové systémy

Přítomnost NOS byla prokázána v hypotalamických oblastech (Bonavera *et al.*, 1993; Moretto *et al.*, 1993) a laloku hypofýzy (Dawson *et al.*, 1991). To naznačuje, že mezi hlavní funkce NO může patřit i neuroendokrinní modulace reprodukčního procesu. Reguluje uvolňování hormonů, jako jsou GnRH (gonadotropin-release hormones) a gonadotropiny (Gross *et al.*, 1994).

Je pravděpodobné, že základní LH sekrece není ovlivněna NO (Duvilanski *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 1996), zatímco jiní jsou přesvědčeni o inhibici LH sekrece tímto volným radikálem (Ceccatelli *et al.*, 1993; Kaiser *et al.*, 1996). Chiodera *et al.* (1995) potvrzuje, že NOS inhibitor snižuje hladinu LH a FSH. Bylo zjištěno, že u skokana jsou během námluv hladiny NOS a cGMP vyšší než obvykle (Linch *et al.*, 1983). Mimo jiné se účastní regulace folikulárního růstu a ovulace (Sengoku *et al.*, 2001), spermatogeneze (Zini *et al.*, 1996) a embryonální implantace v děloze (Moncada *et al.*, 1991).

### 2.7.7 NOS v reprodukci samic

Několik prací se zaměřilo také na sledování exprese NOS v prasečích oocytech. V oocytech získaných z folikulů o velikosti 1 – 3 mm prokázali expresi eNOS (Hattori *et al.*, 2000). Výskyt eNOS v kumulárních buňkách tento tým nepotvrdil. Dále Hattori *et al.* (2000) sledovali vliv FSH na expresi eNOS v komplexech oocytů s kumulárními buňkami (COC). FSH stimuloval proliferaci kumulárních buněk, množství eNOS proteinu se neměnilo. Měření množství metabolitů NO však ukázalo, že FSH vyvolal v COC pokles produkce NO. Ve své další práci našli Hattori *et al.* (2001) v prasečích oocytech také našli mRNA pro eNOS. Takesue *et al.* (2003) mapovali expresi eNOS v průběhu vývoje prasečích folikulů, ale nesledovali velikost oocytů v těchto folikulech, tudíž ani vztah exprese eNOS k meiotické kompetenci oocytů. Analyzovali folikuly menší než 2 mm (časné antrální stádium) a větší než 7 mm (pozdní antrální stádium). Sledovaný protein našli v oocytech získaných z obou velikostních skupin folikulů. V oocytech časných antrálních folikulů byla při imunohistochemickém sledování nalezena eNOS na periférii oocytů. Zona pellucida a lipidová granula eNOS neobsahovaly, povrchová vrstva granulózniích buněk a kumulární buňky byly při imunohistochemické reakci eNOS pozitivní. Oocyty získané z pozdních antrálních folikulů obsahovaly více proteinu eNOS nežli oocyty časných antrálních folikulů. Autoři předpokládají, že ke zvýšení proteinu došlo v průběhu vývoje folikulů vlivem působení gonadotropinů. Dále tyto autoři prokázali, že oocyty získané z folikulů o velikosti 3 – 6 mm produkují po 15 hodinách *in vitro* kultivace malé množství NO. Po ošetření ionomycinem, jež vyvolává přechodné zvýšení hladiny intracelulárního vápníku syntéza NO v oocytech vzrostla. Na sledování exprese a aktivity eNOS a iNOS izoform v prasečích granulózniích buňkách časných antrálních folikulů (< 3 mm) se zaměřili Grasselli *et al.* (2001). V granulóze našli pouze eNOS izoformu, jež byla přítomna také po 48 hodinách kultivace granulózy v podmínkách *in vitro*. mRNA pro eNOS izoformu našli v granulózniích buňkách antrálních folikulů (1 – 4 mm) Takesue *et al.* (2001).



### 2.7.8 Vliv NO na meiotické zrání oocytů

Význam NO pro meiotické zrání oocytů savců byl potvrzen řadou studií provedených na myších s vyblokováním genu pro některou z izoform NOS. U myší po eNOS genovém knockoutu došlo k narušení zrání oocytů a to nejen *in vivo*, ale i *in vitro* při kultivaci komplexů oocytů s kumulárními buňkami. U oocytů byl zpomalen proces rozpadu zárodečného váčku, značná část oocytů nedokončila zrání dosažením druhé meiotické metafáze, byla zablokována ve stádiu první metafáze nebo vykazovala atypické morfologické změny (Jablonka - Shariff *et al.*, 1998; 2000). Rovněž experimenty využívající zvířata s vyblokovánými geny pro dvě izoformy NOS (double knockout) potvrzují nutnost produkce NO pro meiotické zrání oocytů (Tranguch *et al.*, 2003). Hefler *et al.* (2002) a Sigmund (2000) uvádějí, že v případě zvířat s vyblokováním genu pro NOS je ale třeba brát v úvahu fakt, že výsledný fyziologický efekt může být u těchto zvířat významně ovlivněn genetickým pozadím. Myši se stejnou genovou mutací se mohou lišit ve fenotypu v závislosti na kmeni (Phillips *et al.*, 1999).

Význam NO pro zrání oocytů ovšem dokládá také skutečnost, že podobně jako NOS genový knockout působí na zrání myších oocytů inhibitor NOS. Při kultivaci komplexů oocytů a jejich kumulárních buněk s kompetitivním inhibitorem L - NAME (N<sup>o</sup> – nitro – L - arginin metyl ester, inhibuje produkci NO eNOS a iNOS izoformami, více však inhibuje produkci NO izoformou eNOS) měly oocyty v závislosti na dávce inhibitoru narušen rozpad zárodečného váčku a postup meiotického zrání z první meiotické metafáze do druhé. Řada z nich vykazovala atypické změny, jež se shodovaly se změnami pozorovanými u oocytů získaných od eNOS knockoutovaných myší. Mnoho oocytů ve stádiu první metafáze a atypických oocytů bylo neživých, oocyty ve stádiu druhé metafáze měly abnormálně distribuované maternální chromozómy. Inaktivní konformer inhibitoru – D - NAME neměl na meiotické zrání myších oocytů vliv (Jablonka - Shariff *et al.*, 1998; 2000). Rovněž Sengoku *et al.* (2001) ve své práci potvrdili význam NO pro meiotické zrání myších oocytů. L - NAME prokazatelně inhiboval meiotické zrání komplexů oocytů a jejich kumulárních buněk (COC), inhibiční efekt byl zvrácen přidáním donoru NO nitroprusidu sodného (SNP). Tito autoři dále ukázali, že nízké dávky SNP ( $10^{-7}$  mol/l) stimulují zrání komplexů oocytů s kumulárními buňkami do stádia druhé meiotické metafáze. Na zrání oocytů bez kumulárních buněk neměl SNP ani L - NAME vliv. K podobným výsledkům dospěli také Bu *et al.* (2003 a). Když byl SNP intraperitoneálně injikován myším společně s L - NAME nedošlo k inhibici meiotického zrání oocytů získaných od těchto experimentálních zvířat. Ošetření komplexů oocytů s kumulárními buňkami nízkými dávkami SNP (24 hodin kultivace, dávka  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  mol/l) stimulovalo meiotické zrání do druhé

metafáze, a to i za přítomnosti hypoxantinu, jež má schopnost zrání blokovat. Příliš nízké ( $10^{-8}$ ) a vysoké ( $10^{-4}$  a  $10^{-3}$ ) koncentrace SNP neměly na zrání oocytů blokových hypoxantinem vliv. Optimální koncentrace SNP stimulující zrání COC nevykazovala účinek na oocyty zbavené kumulárních buněk. Výsledky těchto dvou studií naznačují, že NO může jak stimulovat, tak také inhibovat meiotické zrání myších oocytů v závislosti na dávce, což potvrzuje i další práce publikovaná tímto výzkumným týmem (Bu *et al.*, 2003 b).

Zdá se, že množství NO hraje důležitou roli také během meiotického zrání oocyty prasete. Tao *et al.* (2005) zjistili, že vysoké množství NO dodané pomocí donoru oxidu dusnatého SNP (1 – 10 mM) narušuje meiotické zrání komplexů prasečích oocytů a jejich kumulárních buněk v době přechodu mezi první a druhou meiotickou metafází.

Přesný mechanismus, jakým NO/NOS systém ovlivňuje meiotické zrání oocytů savců není znám. Výsledky studií ukazují, že při zastavení meiotického zrání oocytů hlodavců a jeho znovuzahájení dochází ke změnám v množství cyklických nukleotidů, především poklesu hladiny cAMP v oocyty (Törnell *et al.*, 1991). cAMP může být v oocyty degradován enzymem fosfodiesterázou (PDE) nebo je možné, že dochází k zastavení jeho přenosu z granulárních buněk do oocyty a tím se snižuje jeho množství. O oxidu dusnatém je známo, že aktivuje enzym guanylát cyklázu (sGC), jež štěpí v cílových buňkách GTP na cGMP (Schmidt *et al.*, 1993). Hubbard *et Price* (1988) zjistili, že zvýšená hladina cGMP vyvolaná 8 – Br - cGMP nebo SNP snižuje hladinu cAMP v oocytech křečka s kumulárními buňkami a zvyšuje podíl oocytů ve druhé metafázi aktivací PDE. Grasselli *et al.* (2001) zjistili, že v prasečích granulárních buňkách cGMP dále aktivuje cGMP dependentní protein kinázu (PKG). NO se však může vázat i na jiné enzymy obsahující hemovou skupinu než je guanylát cykláza (Gross *et Wolin*, 1995).

V průběhu zrání dochází k významným strukturálním změnám – reorganizaci mikrotubulů, včetně agregace organel v průběhu GVBD, vzniku achromatického vřeténka a segregaci chromozómů (Messinger *et Albertini*, 1991). Oocyty získané od eNOS knockoutovaných myší či kultivované s NOS inhibitorem vykazují morfologické anomálie (Jablonka - Shariff *et Olson*, 1998; 2000). Nalezeny byly oocyty s abnormálně zvětšeným prvním pólovým tělískem, což ukazuje na abnormální dělení, které může být způsobeno poškozením metafázního vřeténka. Často jsou v těchto oocytech přítomna dvě první pólová tělíska. Zralé myší oocyty zůstávají v druhé meiotické metafázi až do oplození díky vysoké aktivitě CSF (Motlík *et Kubelka*, 1990). Některé abnormality v meiotickém zrání oocytů získaných od eNOS knockoutovaných myší jsou velmi podobné změnám, jež byly pozorovány u myší s vyblokováním genem pro *mos*, jež řídí CSF (Choi *et al.*, 1991). NO může být klíčovým regulátorem signální kaskády, jež kontroluje přechod mezi metafázemi prvního a druhého meiotického dělení (M I a M II), stejně tak se může podílet na udržení oocyty v M II (Dixit *et Parvizi*, 2001).

### **3 Cíl**

..

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které je oxid dusnatý zapojen do procesu meiotického znovuzahájení u oocytů prasete. Tato hypotéza byla ověřena na základě sledování farmakologického účinku inhibitorů enzymu NO syntázy, který v buňkách NO produkuje, dále bylo sledováno, jak zrání ovlivní oxid dusnatý dodaný z externího zdroje, ve formě donoru NO, a také zda je donor schopen zvrátit účinek inhibitoru.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Získávání vaječnicků

Prasečí vaječnický byly získávány z prasnic poražených na jatkách (Příbram) v blíže neurčeném stádiu pohlavního cyklu. Vaječnický byly transportovány do laboratoře KVD ve vytemperované termolahvi naplněné fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39°C.

### 4.2 Získávání oocytů s ukončeným růstem

Oocyty s ukončeným růstem (120  $\mu\text{m}$ ) byly získávány aspirací folikulů o velikosti 2 – 5 mm pomocí jehly 20G (Sterican, Braun Melsungen, Německo). Pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645, Japonsko) byly oocyty skleněnou pipetou odsávány ze získané folikulární tekutiny a přenášeny do kapek čistého média M199 (složení viz tabulka 4.1).

**Tabulka 4.1** Modifikované médium M199

3,9 ml	7 % uhličitán sodný
60 mg	laktát vápenatý
25 mg	pyruvát sodný
2,5 mg	gentamicin
150 mg	HEPES (vše Sigma-Aldrich, Německo)
8 ml	10x konc. médium M199 (Gibco BRL, Life Technologies, Skotsko)
100 ml	H <sub>2</sub> O
13,4:6,6 IU/ml	eCG : hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko)
10 %	fetální telecí sérum (Alseva, Česká republika)

### 4.3 Kultivace oocytů

Oocyty byly kultivovány v modifikovaném médiu M199 v Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Denmark) při teplotě 39°C ve směsi 5 % CO<sub>2</sub> se vzduchem 48 hodin *in vitro*. Do kultivačního média byl v odpovídající koncentraci přidán buď některý z inhibitorů NOS (aminoguanidin, L – NAME) nebo donor NO SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine). Ke každé pokusné skupině oocytů byla vytvořena skupina kontrolní, která byla kultivována v čistém modifikovaném médiu M199.

#### **4.4 Fixace oocytů a určení fáze jejich meiotického zrání**

Po uplynutí 48 hodin kultivace byly oocyty vybrány z média a pomocí skleněné pipety opakovaným nasáváním a vysáváním zbaveny kumulárních buněk. Takto ošetřené oocyty byly přeneseny na podložní sklo a překryty krycím sklíčkem na vazelínové proužky. Následovala fixace roztokem ledové kyseliny octové a ethanolu (1:3) po dobu nejméně 24 hodin a poté byly oocyty barveny 1% vodným roztokem orceinu. Oocyty byly snímány pomocí počítačového programu pro analýzu a zpracování obrazu L.U.C.I.A (Laboratory Universal Computer Image Analysis verze 4.71, Laboratory Imaging s.r.o., Česká republika). Poté bylo hodnoceno stádium jejich meiotického zrání podle kritérií uvedených Motlíkem a Fulkou (1986).

#### **4.5 Statistická analýza dat**

Data všech experimentů byla podrobena statistické analýze. Experimenty byly 4x opakovány. Výsledky byly hodnoceny v programu STATISTICA verze 6.0. Ke zjištění statistické významnosti mezi skupinami oocytů byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One-way ANOVA).

Pro podrobnější vyhodnocení rozdílů byl zvolen Tukeyho test na hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

#### **4.6 Experimentální schéma**

##### **4.6.1 Účinek aminoguanidinu (AG) na oocyty**

V tomto experimentu byl sledován vliv iNOS specifického inhibitoru aminoguanidinu (AG) na oocyty. Byla hledána efektivní koncentrace inhibitoru. Vždy byly vytvořeny dvě skupiny oocytů. První, pokusná, kde byl do kultivačního média přidáván inhibitor v určité koncentraci a druhá, kontrolní, kde byly oocyty kultivovány v čistém médiu M199 s přídavkem PG600. Aminoguanidin byl použit v koncentraci: 10 mM (0,0037 mg/3 ml média M199), 7,5 mM; 5 mM a 2,5 mM. Oocyty byly kultivovány *in vitro* 48 hodin a poté byly zbaveny kumulárních buněk a fixovány pro stanovení stádia meiotického zrání (dle Motlíka a Fulky, 1986). Pro každou koncentraci AG (4 koncentrace) bylo použito během 4 opakování celkem 120 oocytů a kontrolní oocyty. Protože aminoguanidin nemá D neúčinný konformer, byla použita jako negativní kontrola 24 hodinová reverzní kultivace. Kdy jsou oocyty pokusné skupiny dále

kultivovány v čistém mediu M199. Tím se zjišťuje, jestli při kultivaci s inhibítorem nedošlo ke snížení jejich životaschopnosti.

#### 4.6.2 Účinek L-NAME na oocyty

V tomto experimentu byl sledován vliv různých koncentrací nesespecifického inhibítora L-NAME na oocyty. Tento inhibítor působí na všechny tři známé izoformy NOS, nejvyšší specifitu má však k eNOS izoformě. Jako negativní kontrola byl použit D - konformer inhibítora (D-NAME), jež je neúčinnou formou inhibítora. Oocyty byly kultivovány v podmínkách *in vitro* 48 hodin. Rozděleny byly do tří skupin. První skupina byla experimentální, oocyty této skupiny byly kultivovány v mediu obsahujícím příslušnou koncentraci inhibítora L - NAME. Zbylé dvě skupiny byly kontrolní (v jedné skupině byly oocyty kultivovány v čistém mediu, v druhé v mediu obsahujícím D-NAME). Použité koncentrace L-NAME a D-NAME byly: 10 mM (0,0081 mg/3ml média); 7,5 mM; 5 mM a 2,5 mM. U oocytů bylo v obou kontrolních skupinách požadováno procento zrání (dosažení stádia druhé meiotické metafáze) vyšší než 85%. Pokud v kontrolní skupině dosáhlo méně než 85% oocytů stádia druhé meiotické metafáze, experiment nebyl dále hodnocen. Pro každou koncentraci L-NAME (4 koncentrace) a D-NAME (4 koncentrace) bylo použito během 4 opakování celkem 120 oocytů a kontrolní oocyty.

#### 4.6.3 Účinek donoru SNAP na oocyty

V tomto experimentu byl sledován vliv různých koncentrací donoru NO SNAP na meiotické zrání oocytů. Byla hledána efektivní koncentrace donoru. Vždy byly vytvořeny dvě skupiny oocytů. První, pokusná, kde byl do kultivačního média přidáván SNAP v určité koncentraci a druhá, kontrolní, kde byly oocyty kultivovány v čistém mediu M199 s přídatkem PG600. SNAP byl použit v koncentracích: 0,01 mM, 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 2mM. Oocyty byly kultivovány v podmínkách *in vitro* 48 hodin. SNAP nemá neúčinnou formu, proto byly oocyty podrobeny reverzi v čistém mediu (jako u experimentu s AG).

#### 4.6.4 Účinek donoru SNAP a AG na meiotické zrání oocytů

V tomto experimentu byl sledován vliv efektivní koncentrace inhibitoru AG (5mM) a různých koncentrací SNAP na zrání meioticky kompetentních oocytů. Inhibitor NOS a donor NO byly aplikovány do media současně. SNAP byl použit v koncentracích: 0,03 mM, 0,05 mM a 0,1 mM. Oocyty byly opět rozděleny do dvou skupin a následně kultivovány v podmínkách *in vitro* 48 hodin. Jedna skupina byla experimentální (s přídatkem 5mM AG a daným množstvím SNAPu) a druhá skupina byla kontrolní (kultivace probíhala pouze v čistém mediu s přídatkem PG600). Poté byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a fixovány pro stanovení stádia meiotického zrání (dle Motlíka a Fuly, 1986). Zjišťovali jsme, zda SNAP dokáže zvrátit inhibiční účinek aminoguanidinu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Účinek aminoguanidinu na oocyty

Aminoguanidin v koncentracích 10 mM, 7,5 mM a 5 mM inhiboval meiotické zrání oocytů. Koncentrace aminoguanidinu 2,5 mM neměla na meiotické zrání oocytů vliv a oocyty po 48 hodinách dosáhly druhé meiotické metafáze (91,95 %). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.1 a grafu 5.1

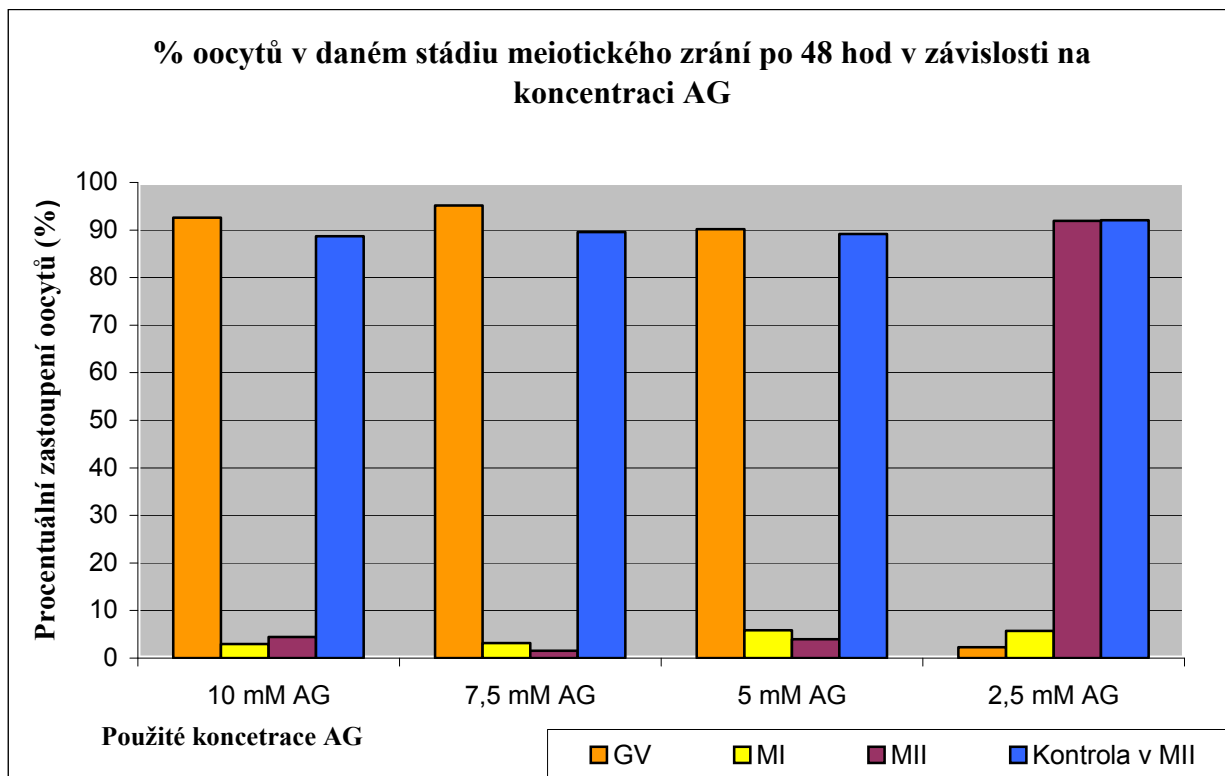
Tabulka 5.1

Stádium jaderného zrání	% oocytů v daném stadiu meiotického zrání po 48 hod			
	10 mM AG	7,5 mM AG	5 mM AG	2,5 mM AG
<b>GV</b>	92,60 ± 4,69 <sup>A</sup>	95,14 ± 4,06 <sup>A</sup>	90,15 ± 4,89 <sup>A</sup>	2,29 ± 2,96 <sup>A</sup>
<b>MI</b>	2,98 ± 3,11 <sup>B</sup>	3,16 ± 2,66 <sup>B</sup>	5,88 ± 2,64 <sup>B</sup>	5,75 ± 2,40 <sup>A</sup>
<b>MII</b>	4,43 ± 3,54 <sup>B</sup>	1,58 ± 2,14 <sup>B</sup>	3,98 ± 3,28 <sup>B</sup>	91,95 ± 4,08 <sup>B</sup>
<b>Kontrola v MII</b>	<b>88,71 ± 2,60<sup>A</sup></b>	<b>89,59 ± 3,56<sup>A</sup></b>	<b>89,16 ± 3,18<sup>A</sup></b>	<b>92,08 ± 2,26<sup>B</sup></b>

Statisticky významný rozdíl  $P < 0,01$  v řádcích (mezi stádiem GV= stádium zárodečného vajíčka, metafází I a metafází II) je vyjádřen odlišnými superskripty (<sup>A,B,C</sup>)



Graf 5.1



## 5.2 Účinek L-NAME a D-NAME na oocyty

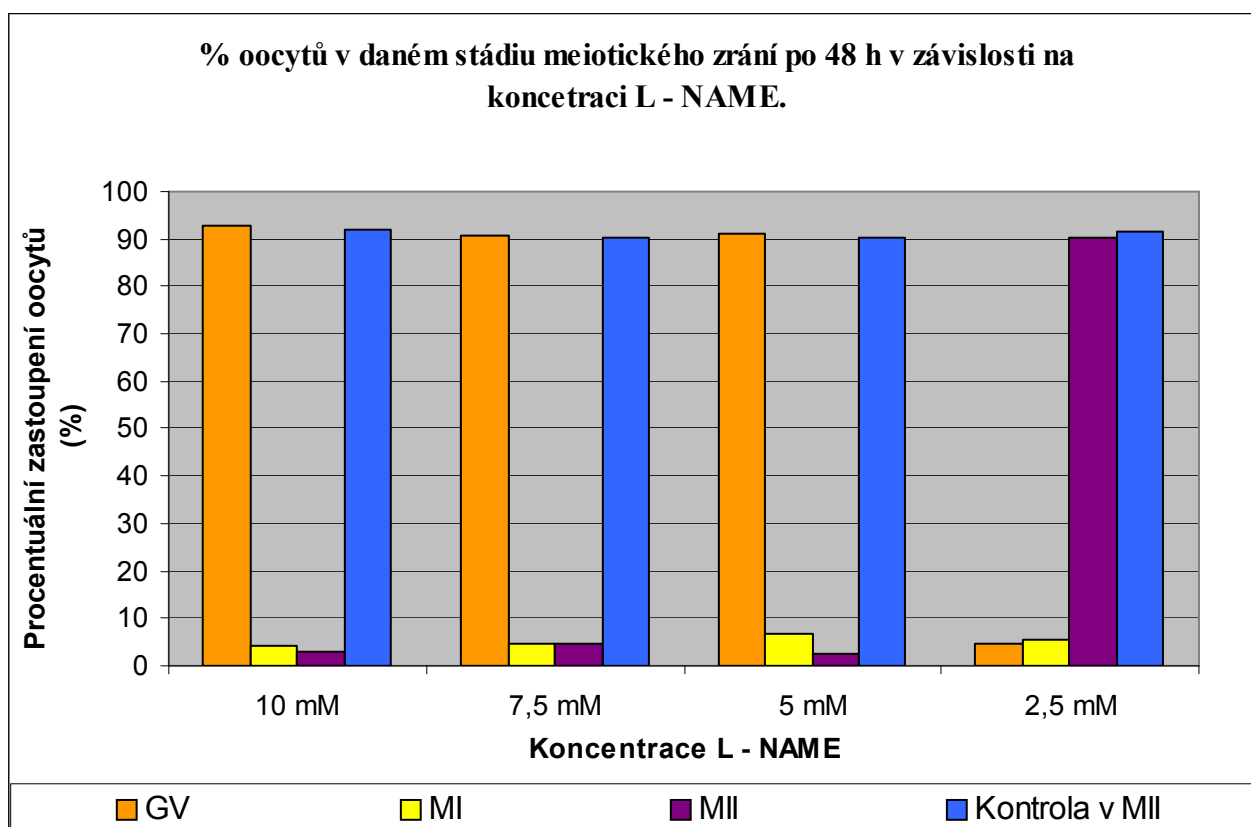
Kultivace meioticky kompetentních oocytů s L-NAME v koncentraci 10 mM, 7,5 mM a 5 mM výrazně ovlivnila meiotické zrání těchto oocytů (tab 5.2). Po kultivaci s těmito koncentracemi inhibitoru se ve stádiu MII nacházelo statisticky významně méně oocytů (méně než 5%) oproti kontrolní skupině, kde stádium MII dosáhlo přes 90% oocytů (graf 5.2) a to i po kultivaci s D-NAME (neaktivní konformer k L-NAME, který se používá jako kontrola) (graf 5.3). Výsledky se podobají výsledkům z předchozího experimentu s AG. Použití vyšších koncentrací tohoto inhibitoru zabránilo prolomení prvního meiotického bloku a vysoké procento oocytů zůstalo ve stádiu GV. Koncentrace 2,5 mM již neovlivnila meiotické zrání oocytů. Do stádium MII došlo přes 90% oocytů, což se statisticky významně neliší v porovnání s kontrolními skupinami (kontrola i D-NAME). Statisticky není významný rozdíl ani mezi procenty oocytů ve stádiu GV a MI oproti kontrolním skupinám.

Tabulka 5.2

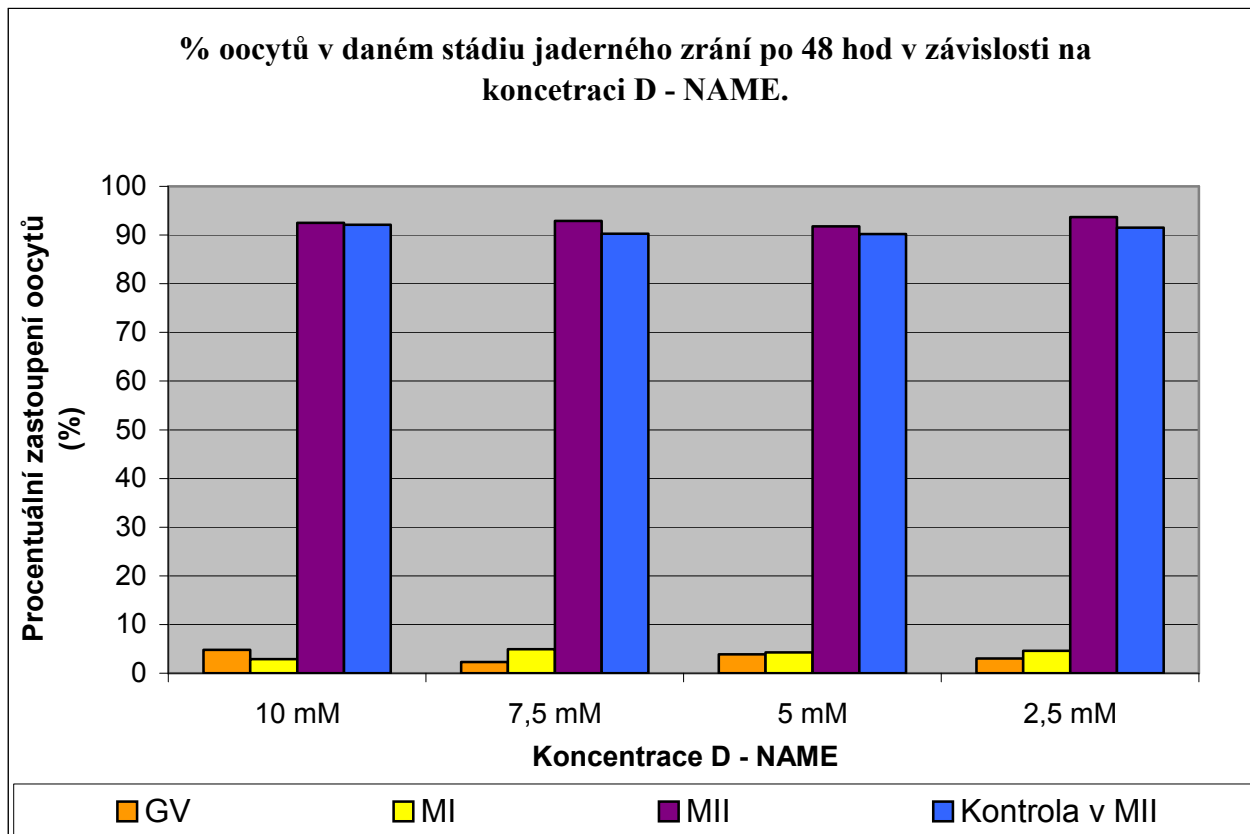
Použitá látka	Stádium jaderného zrání	% oocytů v daném stadiu meiotického zrání po 48 hod			
		10 mM	7,5 mM	5 mM	2,5 mM
L-NAME	GV	92,7 ± 4,9 <sup>A</sup>	90,8 ± 2,5 <sup>A</sup>	91,0 ± 2,2 <sup>A</sup>	4,5 ± 3 <sup>A</sup>
	MI	4,4 ± 3,8 <sup>B</sup>	4,7 ± 2,2 <sup>B</sup>	6,7 ± 3,2 <sup>B</sup>	5,4 ± 2,5 <sup>A</sup>
	MII	2,9 ± 2,9 <sup>B</sup>	4,7 ± 2,2 <sup>B</sup>	2,4 ± 2,2 <sup>B</sup>	90,2 ± 2,1 <sup>B</sup>
D-NAME	GV	4,8 ± 4,0 <sup>B</sup>	2,3 ± 2,3 <sup>B</sup>	3,9 ± 3,1 <sup>B</sup>	3,0 ± 3 <sup>A</sup>
	MI	2,9 ± 2,8 <sup>B</sup>	4,9 ± 2,4 <sup>B</sup>	4,3 ± 3,4 <sup>B</sup>	4,6 ± 3,3 <sup>A</sup>
	MII	92,5 ± 1,6 <sup>A</sup>	92,9 ± 3,1 <sup>A</sup>	91,8 ± 1,7 <sup>A</sup>	93,7 ± 2,8 <sup>B</sup>
Kontrola	MII	92,1 ± 1,9 <sup>A</sup>	90,3 ± 2,5 <sup>A</sup>	90,2 ± 2,9 <sup>A</sup>	91,5 ± 3,3 <sup>B</sup>

Statisticky významný rozdíl  $P < 0,01$  v řádcích (mezi stádiem GV= stádium zárodečného vajíčka, metafázi I a metafázi II) je vyjádřen odlišnými superskripty (<sup>A,B,C</sup>)

Graf 5.2



Graf 5.3



### 5.3 Účinek SNAP na oocyty.

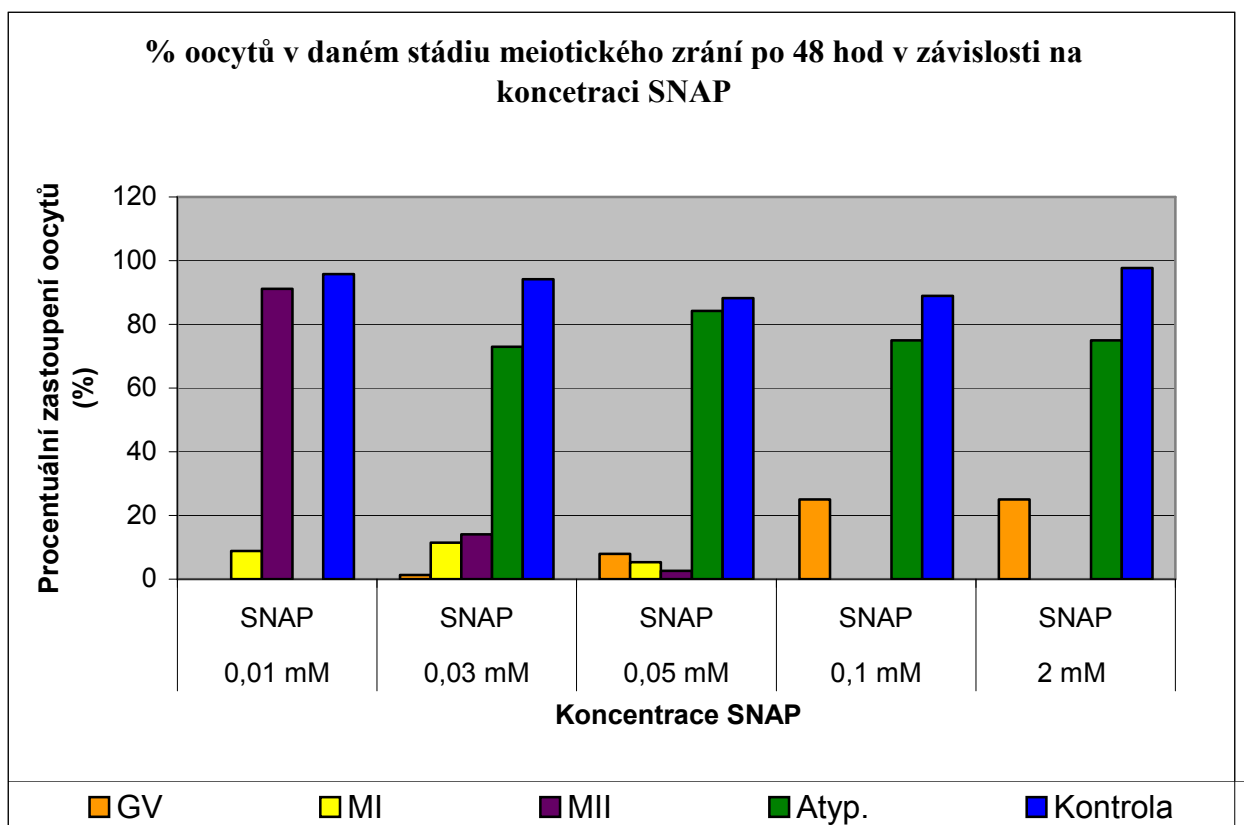
Z výsledků je zřejmé (tab. 5.3 a graf 5.4), že kultivace oocytů s přidaným SNAP v koncentracích 0,03 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 2 mM významně ovlivnila meiotické zrání. Po kultivaci s NO donorem v těchto koncentracích byl u většina oocytů zjištěn atypický vývoj (nad 73%), toto procento se zvyšuje s narůstající koncentrací SNAP. Koncentrace 0,01 mM již meiotické zrání neovlivnila, přes 90% oocytů došlo do stádia M II, což je srovnatelné s kontrolní skupinou.

Tabulka 5.3

Stádium jaderného zrání	% oocytů v daném stadiu meiotického zrání po 48 hod				
	0,01 mM SNAP	0,03 mM SNAP	0,05 mM SNAP	0,1 mM SNAP	2 mM SNAP
GV	0 <sup>A</sup>	1,3 <sup>A</sup>	7,9 <sup>A</sup>	25 <sup>A</sup>	25 <sup>A</sup>
MI	8,8 <sup>A</sup>	11,5 <sup>A</sup>	5,3 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
MII	91,2 <sup>B</sup>	14,1 <sup>A</sup>	2,6 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>
Atyp.	0 <sup>A</sup>	73 <sup>B</sup>	84,2 <sup>B</sup>	75 <sup>B</sup>	75 <sup>B</sup>
Kontrola	95,8 <sup>B</sup>	94,2 <sup>B</sup>	88,2 <sup>B</sup>	88,9 <sup>B</sup>	97,7 <sup>B</sup>

Statisticky významný rozdíl  $P < 0,01$  v řádcích (mezi stádiem GV= stádium zárodečného vajíčka, metafázi I a metafázi II) je vyjádřen odlišnými superskripty (<sup>A,B,C</sup>)

Graf 5.4



## Účinek SNAP a AG na oocyty

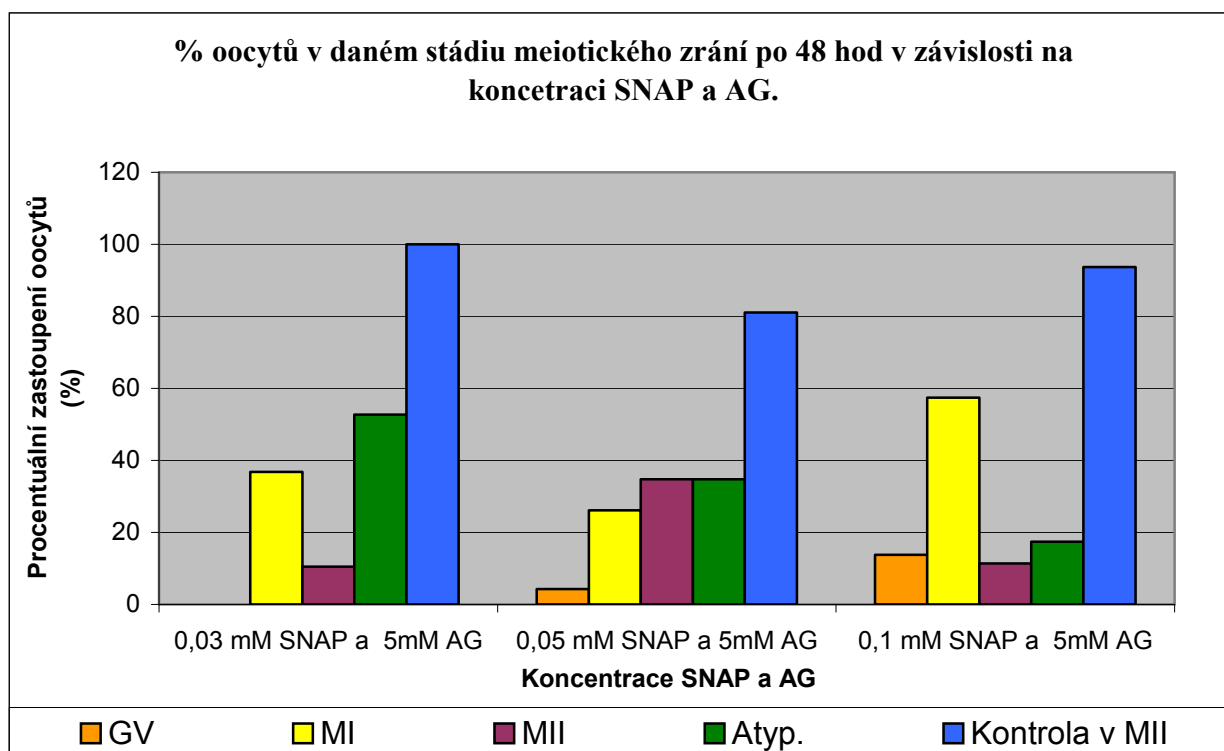
Přidání AG a SNAP do kultivačního média mělo vliv na meiotické zrání oocytů, protože do stádia M II došlo podstatně méně oocytů v experimentálních skupinách než-li ve skupinách kontrolních (tab 5.4 a graf 5.5). Po ukončení kultivace byla zjištěna přítomnost atypicky vyvinutých oocytů (až 52%). Experimentální skupina s 5 mM AG a 0,05 mM SNAP měla nejvyšší procento oocytů ve stádiu M II (34,8%).

Tabulka 5.4

Stádium jaderného zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání po 48 hod		
	0,03 mM SNAP + 5 mM AG	0,05 mM SNAP + 5 mM AG	0,1 mM SNAP + 5 mM AG
GV	0 <sup>A</sup>	4,3 <sup>A</sup>	13,8 <sup>A</sup>
MI	36,8 <sup>A</sup>	26,1 <sup>A</sup>	57,4 <sup>A</sup>
MII	10,5 <sup>A</sup>	34,8 <sup>A</sup>	11,4 <sup>A</sup>
Atyp.	52,7 <sup>B</sup>	34,8 <sup>A</sup>	17,4 <sup>A</sup>
Kontrola	81,5 <sup>B</sup>	81,1 <sup>B</sup>	93,7 <sup>B</sup>

Statisticky významný rozdíl  $P < 0,01$  v řádcích (mezi stádiem GV= stádium zárodečného vajíčku, metafází I a metafází II) je vyjádřen odlišnými superskripty (<sup>A,B,C</sup>)

Graf 5.5



## 6 Diskuze

Pomocí farmakologické inhibice byl sledován účinek NO syntázy na oocyty s dokončenou růstovou periodou a plnou meiotickou kompetencí. Oocyty savců mohou exprimovat některou z izoform NOS. V myších oocytech byly detekovány dvě izoformy NOS, eNOS a iNOS (Jablonka - Shariff *et al.*, 1997; Huo *et al.*, 2005). U prasat byly detekovány eNOS i iNOS jak v oocytech, tak také v jejich kumulárních buňkách (Hattori *et al.*, 2000). Třetí z NOS izoform, nNOS, nebyla v oocytech detekována. Pouze Abe *et al.* (1999) detekovali mRNA pro nNOS v myších oocytech. Bylo použito dvou typů inhibitorů pro odlišení účinků obou hlavních izoform vyskytujících se v ovariích prasete. Pro detekci vlivu indukovatelné izoformy byl použit iNOS specifický inhibitor aminoguanidin, který má nízkou toxicitu (Makita *et al.*, 1992). Pro odlišení vlivu eNOS izoformy byl použit nespecifický inhibitor NOS, L-NAME, který inhibuje katalytickou činnost všech třech izoform, s nejvyšším účinkem k eNOS izoformě. Byl sledován vliv těchto inhibitorů o různých koncentracích na oocyty. Tento inhibitor také velice dobře prostupuje skrz buněčné membrány (Wolff *et al.*, 1997).

Naše výsledky naznačují, že použití vyšších dávek AG v kultivačním médiu, blokuje GVBD prasečích oocytů s plnou meiotickou kompetencí. Efekt AG na oocyty je závislý na jeho dávce. Dávky 10 mM; 7,5mM a 5mM účinně blokovaly meiotické zrání oocytů, většina oocytů zůstala ve stádiu GV (90,15 – 95,14% oocytů). Kultivace s 2,5 mM AG již nemá vliv na meiotické zrání oocytů. Účinné koncentrace AG, které inhibují meiotické zrání oocytů prasete tedy jsou 10 mM; 7,5mM a 5mM. Tyto výsledky ukazují, že se signální kaskáda iNOS/NO pravděpodobně účastní řízení přechodu z GV do MI, regulace meiotického znovuzahájení a procesu GVBD.

Naše výsledky korespondují s výsledky Tao *et al.* (2004), kteří rovněž potvrdili inhibiční účinek aminoguanidinu na prasečí oocyty. Vliv AG na zrání oocytů potkana sledovali Nakamura *et al.* (2002), kteří popisují, že tento inhibitor působí naopak na zrání stimulačně a urychluje rozpad zárodečného váčku a celý proces meiotického znovuzahájení. Tento dvojitý účinek AG může být způsoben odlišnými kultivačními podmínkami a různými živočišnými druhy. Zjistili jsme, že u prasete aminoguanidin působí na meiotické zrání již v jeho samém počátku a narušuje u prasete proces GVBD. Protože aminoguanidin nemá D neúčinný konformer, byla u oocytů s plnou meiotickou kompetencí provedena reverze, oocyty byly nejprve kultivovány 48 hodin s nejvyšší koncentrací aminoguanidinu, 10 mM, a poté 24 hodin v čistém médiu. Bylo testováno, zda koncentrace 10 mM AG není pro oocyty toxická, oocyty po odstranění inhibitoru po 24 hodinové kultivaci znovu zrály. Reverze u meioticky kompetentních oocytů měla za následek

vysoký nárůst podílu partenogeneticky aktivovaných embryí. Výsledky naznačují, že iNOS/NO dependentní signální kaskáda je zapojena do řízení meiotického zrání oocyty prasete a pravděpodobně se mění její regulace během zrání a aktivace, kdy se množství nutného NO pro oocyt pravděpodobně snižuje.

L-NAME inhibitor měl na meiotické zrání oocytů prasete podobný účinek jako aminoguanidin. Vysoké procento oocytů s těmito koncentracemi L-NAME nedokázalo dokončit meiotické zrání do stádia metafáze II. Podobně působí L-NAME na meiotické zrání oocytů potkana a rovněž myši (Bu *et al.*, 2003; Jablonka - Shariff *et Olson*, 2000).

Jablonka-Shariff *et al.*(1999) uvádí, že u potkanů po 48 hodinové kultivaci s výrazně nižší koncentrací 0,1 –1 mM L-NAME se relativně vysoké procento oocytů (průměrně 28 %) nacházelo ve stádiu metafáze I a ve stádiu metafáze II se nacházelo podle použité koncentrace 45 – 65 % oocytů. Postupně se zvyšující se dávkou se v experimentech u potkanů zvyšovalo procento oocytů, které se nacházely ve vývojově nižších fázích meiotického zrání. Podobný efekt byl pozorován i u myších oocytů. Na rozdíl od těchto prací se v naší práci po kultivaci s vyššími koncentracemi L-NAME ve stádiu MI nacházelo jen nízké procento oocytů (4,4 – 6,7 %). Většina oocytů zůstala zabržděna v GV (90,8 – 92,7%).

Změny v meiotickém zrání po aplikaci inhibitorů NOS se podobaly těm, které byly pozorovány u oocytů získaných od zvířat s vyblokováným genem pro některou z izoform NOS (Jablonka - Shariff *et Olson*, 1998; 1999; 2000; Sengoku *et al.*, 2001; Bu *et al.*, 2003; Huo *et al.*, 2005). Pro meiotické zrání je důležitý NO produkovaný jak iNOS, tak také eNOS izoformou. Otázkou zůstává, jakým mechanismem se NO v oocyty uplatňuje. Často působí prostřednictvím aktivace rozpustné guanylát cyklázy (Ignarro *et al.*, 1987; Murad, 1994). Je také aktivátorem enzymů z rodiny MAP kináz, inhibuje enzymy cytochromu P - 450 včetně P - 450 aromátázy (Snyder *et al.*, 1996).

Dále jsme zjišťovali, jak oxid dusnatý z externího zdroje ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů. Z předchozích experimentů provedených na Katedře veterinárních disciplín ČZU v Praze bylo známo, že donor NO SNAP v koncentraci 2mM přidáný k oocytům ve stádiu MII aktivuje tyto oocyty ze 71%. Tuto koncentraci donoru jsme proto použili jako výchozí pro kultivaci oocytů s ukončenou růstovou fází (120  $\mu$ m). U oocytů došlo po 48 hodinové kultivaci s NO donorem ke snížení počtu oocytů ve stádiu první a druhé meiotické metafáze. Po 24 hodinové reverzi v čistém médiu oocyty nepokračovaly ve zrání. Námi použitá koncentrace oxidu dusnatého byla pro oocyty toxická a narušila jejich životaschopnost. Stejně jako 2mM SNAP působila na oocyty také koncentrace 0,1 mM, která aktivuje prasečí oocyty ve stádiu druhé meiotické metafáze ze 68%. Koncentraci jsme proto snížili na 0,05 mM a poté na 0,03 a

0,01 mM. 0,01 mM SNAP již inhibiční účinek na oocyty nemělo. Oocyty kultivované 48 hodin v médiu s NO donorem v této koncentraci zrály z 91% do druhé meiotické metafáze.

Z literatury je známo, že vysoká množství oxidu dusnatého vedou v somatických buňkách ke vzniku toxických reakčních produktů, k čemuž dochází pravděpodobně také v oocytech (Schrammel et al., 1996). V některých typech buněk NO vyvolává apoptózu a poškození DNA (Elman et al., 1993).

Je známo, že vysoké koncentrace NO dodané SNP (nitroprussid sodný) donorem inhibují meiotické zrání oocytů myši, zatímco nízké koncentrace NO donoru zrání stimulují (Bu *et al.*, 2003). Nízké dávky (0,1  $\mu$ M) donoru oxidu dusnatého, nitroprusidu sodného (SNP), stimulují zrání komplexů myších oocytů a jejich kumulárních buněk do stádia druhé meiotické metafáze (Sengoku *et al.*, 2001). Nízké dávky donoru NO stimulují meiotické zrání oocytů prasete. Dále jsme sledovali, zda externě dodaný oxid dusnatý ve formě NO donoru dokáže zabránit inhibičnímu účinku NOS inhibitorů. Použita byla efektivní koncentrace aminoguanidu, 5 mM. SNAP byl použit v koncentracích 0,03 mM, 0,05 mM a 0,1 mM. Ve všech třech skupinách většina oocytů dokázala prolomit meiotický blok a prošla rozpadem zárodečného váčku. Fáze M II však dosáhla jen malá část z nich. Velká část oocytů zrála atypicky. Podobný experiment provedli Sengoku *et al.* (2001), kteří sledovali kombinovaný účinek NO donoru a inhibitoru na komplexy myších oocytů s kumulárními buňkami. Zjistili, že v případě myších oocytů lze účinek NO inhibitoru donorem NO plně zvrátit. Zjistili, že donor a inhibitor ovlivňují pouze komplexy myších oocytů s kumulárními buňkami, nikoli však oocyty samotné, což dokládá význam kumulárního obalu pro oocyty. K podobným výsledkům dospěli také Bu *et al.* (2003 a). Když byl SNP intraperitoneálně injikován myším společně s L - NAME, nedošlo k inhibici meiotického zrání oocytů získaných od těchto experimentálních zvířat. Ošetření komplexů oocytů s kumulárními buňkami nízkými dávkami SNP (24 hodin kultivace, dávka  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  mol/l) stimulovalo meiotické zrání do druhé metafáze, a to i za přítomnosti hypoxantinu, jež má schopnost zrání blokovat.

Příliš nízké ( $10^{-8}$ ) a vysoké ( $10^{-4}$  a  $10^{-3}$ ) koncentrace SNP neměly na zrání oocytů blokových hypoxantinem vliv. Výsledky těchto dvou studií naznačují, že NO může jak stimulovat, tak také inhibovat meiotické zrání myších oocytů v závislosti na dávce, což potvrdily také naše experimenty provedené na prasečích oocytech.



## 7 Závěr

Oxid dusnatý je velmi důležitou signální molekulou pro řadu fyziologických pochodů. Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, podle které je NO zapojen do regulace meiotického znovuzahájení prasečích oocytů. Nejprve byl sledován vliv NO – syntázy na průběh meiotického zrání prasečích oocytů metodou farmakologické inhibice.

Po 48 hodinovém ošetření plně meioticky kompetentních oocytů NOS inhibitory aminoguanidinem a L-NAME v koncentraci od 5 do 10 mM bylo narušeno meiotické zrání oocytů. Nižší koncentrace inhibitorů zrání neovlivňovaly. Efekt inhibitoru byl závislý na dávce. Po 24 hodinové reverzi oocytů s ukončeným růstem v čistém médiu došlo k vysokému nárůstu podílu partenogeneticky aktivovaných embryí. Inhibitory NOS blokují meiotické zrání oocytů již na samém počátku, oocyty nejsou schopny projít rozpadem zárodečného vajíčku.

Po 48 hodinové kultivaci oocytů s 0,05 – 2 mM NO donoru SNAP došlo ke snížení počtu oocytů ve stádiu první a druhé meiotické metafáze. Použitá koncentrace oxidu dusnatého byla pro oocyty toxická a narušila životnost oocytů. Oocyty byly dále kultivovány se SNAP v koncentraci 0,01 - 0,05 mM. Koncentrace 0,01 mM již inhibiční účinek na oocyty neměla. Sledován byl také vliv NO donoru SNAP v kombinaci se specifickým inhibitorem AG. AG byl v jednotné koncentraci 5mM a SNAP byl v koncentracích 0,03 - 0,1 mM. Do stadia M II došlo nejvíce oocytů ve skupině s koncentrací 0,05mM. Procento však nebylo vysoké (34%). Pravděpodobně nebylo dosaženo ideální koncentrace donoru NO, který by vyprodukoval přesné množství NO, které oocyt potřebuje pro pokračování v meiotickém zrání.

Zde uvedené experimenty prokazují, že NO má vliv na překonání prvního meiotického bloku a je patrně důležitým signálem pro meiotické znovuzahájení prasečích oocytů.

## 8 Použitá literatura

- Abe K., Matsuoka K., Inoue N., Taga M., Kato T. (1999) Messenger RNA of neuronal nitric oxide synthase is expressed and possibly functions in mouse oocytes and embryos during preimplantation development. *Biomed. Res. – Tokyo*. 20: 61 – 65.
- Aguilar E., Tena-Sempere M., Gonzalez D., Pinilla L. (1996): Control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats by excitatory amino acids. *Andrologia*. 28: 163–169.
- Albertini D. F. (1992): Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte: Interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *BioEssays*. 14(2): 97-103.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630 s.
- Alderton K.W., Cooper Ch. E., Knowles G. R. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem* 357: 593 – 615.
- Alderton K.W., Cooper Ch. E., Knowles G. R. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem*. 357: 593 – 615.
- Alioua A., Tanaka Y., Wallner M., Hofmann F., Ruth P., Meera P., Toro L. (1998): The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.*, 273: 32950–32956.
- Andreopoulos S., Papapetropoulos A. (2000): Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol*. 34: 147-157.
- Anger M., Klima J., Kubelka M., Procházka R., Motlik J., Schultz R. M. (2004): Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev*. 69: 11-16.
- Bahnson T. D., Pandol S. J., Dionne V. E. (1993): Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem*. 268: 10808–10812.
- Balligand J. L., Cannon P. J. (1997): Nitric Oxide Synthases and Cardiac Muscle. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 17: 1846–1858.
- Bauersachs J., Fleming I., Fraccarollo D., Busse R., Ertl G. (2001): Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide

anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc. Res.* 51: 344-350.

- Beavo J. A., Hardman J. G., Sutherland E. W. (1971): Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 246: 3841-3846.
- Bevers M. M., Izadyar F. (2002): Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197: 173-178.
- Bian K., Murad F. (2003): Nitric oxide (NO) - biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Front. Biosci.* 8: 264 – 278.
- Biel M., Zong X., Ludwig A., Sautter A., Hofmann F. (1999): Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 151–171.
- Bird G. St. J., Putney J. W. Jr. (1993): Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.* 268: 21486–21488.
- Bischof G., Brenman J., Bredt D. S., Machen T. E. (1995): Possible regulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. *Cell Calcium* 17: 250–262.
- Biswas S., Kabir S.N., Pal A.K. (1998): The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J. Reprod. Fertil.* 114: 157–161.
- Black J. D. (2000): Protein kinase C - mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5: 5172–5176.
- Boggs S, Huang L. X., Stuer D. J. (2000): Formation and reactions of the heme-dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. *Biochemistry.* 39: 2332 –2339.
- Bonavera J. J., Sahu A., Kalra P. S., Kalra S. P. (1993): Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology.* 133: 2481–2487.
- Boolell M., Allen M. J., Ballard S. A., Gepi-Attee S., Muirhead G. J., Naylor A. M., Osterloh I. H., Gingell C. (1996): Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 8: 47–52.
- Bornslaeger E. A., Mattei P. M., Schultz R. M. (1986): Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte regulation. *Dev. Biol.* 114: 453-462.

- Bornslaeger E. A., Wilde W. M., Schultz R. M. (1984): Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.* 105: 488-99.
- Bredt D. S., Snyder S. H. (1992): Nitric - oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 8: 3 – 11.
- Bredt D., Snyder S. (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 175–195.
- Brune B., Lapetina E. G. (1995): Protein thiol modification of glyceraldehyde – 3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling. *Gen Eng .* 17: 149 – 164.
- Bryk R., Wolff D.J. (1998): Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N-6-(1-inoethyl) lysine. *Biochemistry* 37 (14): 4844-4852.
- Bu S., Xia G., Tao Y., Lei L., Zhou B. (2003 b) Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell - enclosed oocytes in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 207: 21 – 30.
- Bu S., Xia G., Xie H., Guo Y., Tao Y. (2003 a) Nitric oxide produced by cumulus cells stimulates maturation of mouse oocytes. *Chin. Sci. Bull.* 48: 72 – 75.
- 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. *Mol. Cell. Endocrinol.* 5961: 1-9.
- Buccione R., Schroeder A. C., Eppig J. J. (1990): Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol. Reprod.* 43: 543-547.
- Campbell J. S., Seger R., Graves J. D., Graves L. M., Jensen A. M., Krebs E. G. (1995): The MAP kinase cascade. *Rec. Prog. Horm. Res.* 50: 131–159.
- Carabelli V., D'Ascenzo M., Carbone E., Grassi C. (2002): Nitric oxide inhibits neuroendocrine Ca(v)1 L-channel gating via cGMP-dependent protein kinase in cell-attached patches of bovine chromaffin cells. *J. Physiol.- London*, 541: 351–366.
- Carroll J., Swann K., Whittingham D., Whitaker M. (1994): Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[Ca^{2+}]$  oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development.* 120: 3507–3517.
- Cataldi M., Secondo A., D'Alessio A., Sarnacchiaro F. Colao A.M., Amoroso S., Di Renzo G.F., Annunziato L. (1999): Involvement of phosphodiesterase-cGMP- PKG pathway in intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations in pituitary GH(3) cells. *Biochim. Biophys. Acta-Mol Cell Res.*, 1449: 186–193.

- Ceccatelli S., Hulting A. L., Zhang X., Gustafsson L., Villar M., Hokfelt T. (1993): Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11292–11296.
- Cecconi S., Rossi G. (2001): Mouse antral oocytes regulate preantral granulosa cell ability to stimulate oocyte growth in vitro. *Deve. Biol.* 233: 186-191.
- Černý J., Hruban V., Jandura B., Majzlík I. (1995): *Genetika obecná* . 1.vyd. ČZU. Praha. 436 s.
- Chiodera P., Volpi R., Caffarri G., Capretti L., Magotti M. G., Coiro V. (1995): Mediation by nitric oxide of LH-RH-stimulated gonadotropin secretion in human subjects. *Neuropeptides.* 29: 321–324.
- Choi T., Aoki I., Mori M., Yamashita M., Nagahama Y., Kohmoto K. (1991) Activation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development.* 113: 789 – 795.
- Clapham D. E. (1995): Calcium signaling. *Cell.* 80: 259–268.
- Clapper D. L., Lee H. C. (1985) In.: 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. *Anim. Reprod. Sci.* 70: 235–249.
- Clapper D.L., Walseth T.F., Dargie P.J., Lee H.C. (1987): Pyridine-nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea-urchin egg microsomes desensitized to inositol triphosphate. *J. Biol. Chem.* 262: 9561–9568.
- Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S. (1998): Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione, *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 7631 – 7636.
- Conti M., Kasson B.G., Hsueh A. J. W. (1984): Hormonal regulation of 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterases in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 114: 2361-68.
- Corbett J.A., Tilton R.G., Chang K., Hasan K.S., Ido Y., Wang J.L., Sweetland M.A., Lancaster J.R. Jr., Williamson J.R., McDaniel M.L. (1992): Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41: 552–556.
- Cornwell, T. L., Pryzwansky, K. B., Wyatt, T. A., Lincoln, T. M. (1991). Regulation of sarcoplasmic reticulum phosphorylation by localized cyclic GMP- dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 40: 923-931.

- Coucovanis E. C., Sherwood S. W., Carswell Crumpton C., Spack E. G., Jones P. P. (1993): Evidence that the mechanism of preantral germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 209: 238-247.
- D'Ascenzo M., Martinotti G., Azzena G.B., Grassi C. (2002): CGMP/protein kinase G-dependent inhibition of N-type Ca<sup>2+</sup> channels induced by nitric oxide in human neuroblastoma IMR32 cells. *J. Neurosci.* 22: 7485–7492.
- Dai Y., Lee C., Hutchings A., Sun Y., Moor R. (2000): Selective requirement for cdc25c protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 62: 519–532.
- Dail W. G., Sanborn C. R., Ratner A. (1980): Immunocytochemical localization of cyclic AMP and cyclic cGMP in rat ovarian tissue. *Biol. Reprod.* 22: 281-288.
- Dedieu T., Gall L., Crozet N., Sevellec C., Ruffini S. (1996): Mitogen - activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 351–358.
- Dekel N. (1995): Molecular control of meiosis. *Trends. Endocrin. Met.* 6: 165–169.
- Dekel N., Beers W. H. (1978): Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75: 4369-4373.
- Dekel N., Galiani D., Sherizly I. (1988): Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 56: 115-121.
- Dierks E., Burstyn N. (1998): The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 358.
- Dixit V. D., Parvizi N. (2001) Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 65: 1 – 16.
- Driancourt M. A., Thuel B. (1998): Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid – a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 345-362.
- Duvilanski B. H., Zambruno C., Seilicovich A., Pisera D., Lasaga M., Diaz M. C., Belova N., Rettori V., McCann S. M. (1995): Role of nitric oxide in the control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 170–174.
- Ellman C., Corbett J. A., Misko T. P., McDaniel M., Beckerman K. P. (1993): Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary—a potential role for nitric oxide in the ovulatory process. *J. Clin. Invest.* 92: 3053-3056.

- Eppig J. J. (2001): Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals – a review. *Reproduction*. 122: 829-838.
- Fan H. Y., Li M. Y., Tong C., Chen D. Y., Xia G. L., Song X. F., Schatten H., Sun Q. Y. (2002): Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 63: 480-487.
- Fasolato C., Hoth M., Penner R. (1993): A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.* 268: 20737–20740.
- Ferin M., Jewelewicz R., Warren M. (1997): *Menstruační cyklus*. Praha. Grada Publishing. 15-76.
- Ferrero R., Rodríguez-Pascual F., Miras-Portugal M. T., Torres M. (2000): Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase activity inhibition through cyclic GMP-dependent dephosphorylation. *J. Neurochem.* 75: 2029-2039.
- Findlay J. K., Drummond A. E., Britt K. L., Dyson M., Wreford N. G., Robertson D. M., Groome N. P., Jones M. E. E., Simpson E. R. (2000): The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163: 81-87.
- Francis S. H., Turko I. V., Corbin J. D. (2001): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 65: 1–52.
- Fukao M., Mason H. S., Britton F. C., Kenyon J. L., Horowitz B., Keef K. D. (1999): Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Activates Cloned BK<sub>Ca</sub> Channels Expressed in Mammalian Cells by Direct Phosphorylation at Serine 1072. *J. Biol. Chem.* 274: 10927–10935.
- Fulka J. Jr. (1983): Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific fusion. *Exp. Cell. Res.* 146: 212–218.
- 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. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 378-382.
- Fulka J. Jr., Leibfried-Ruthledge M. L., First N. L. (1991): Effect of 6 - dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29: 379–384.
- Galione A., Lee H.C., Busa W.B. (1991): Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sea-urchin egg homogenates: Modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*. 253: 1143–1146.
- Gomez-Fernandez J.C., Torrecillas A., Corbalan-Garcia S. (2004): Diacylglycerols as activators of protein kinase C (Review). *Mol. Membr. Biol.* 21: 339–349.

- Gotoh Y., Nishida E., Matsuda S., Shiina N., Kosako H., Shiokawa K., Akiyama T., Ohta K., Sakai H. (1991): In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase - activated MAP kinase. *Nature*. 349: 251–254.
- Graeff R.M., Franco L., De Flora A., Lee H.C. (1998): Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 118–125.
- Grasselli F., Ponderato N., Basini G., Tamanini C. (2001) Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Dom. Anim. Endocrinol.* 20: 241 – 252.
- Gross A. B., Rossmannith W., Kabigting E., Cadd G., Clifton D., Steiner R. (1994): The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons. *J. Endocrinol.* 140: R5-R8.
- Gross S. S., Wolin M. S. (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 737 – 769.
- Hafez E. S. E., Hafez B. (2000): *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Lippincott. Williams and Wilkins. 68-81.
- Hagemann L. J. (1999): Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*. 51: 449-459.
- Hančová H., Vlková M. (2002): *Biologie I. v kostce*. 2. vyd. Centa. Brno. 112 s.
- Hashimoto N., Kishimoto T. (1988): Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 126: 242-252.
- Hattori M. A., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. (2001): Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function. *Mol. Cell. Biochem.* 219: 121 – 126.
- Hattori M.A., Nishida N., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. (2000): FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 24: 65–73.
- Haug L.S., Jensen V., Hvalby O., Walaas S.I., Ostvold A.C. (1999): Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* 274: 7467–7473.
- He C. L., Damiani P., Parys J. B., Fissore R. A. (1997): Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57: 1245-1255.
- Hefler L. A., Gregg A. R. (2002) Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. *Fertil Steril.* 77: 147 – 151.



- Hemmens B., Mayer B. (1998): Nitric oxide Protocols. Edited by Tisheradge MA, Totowa, New Jersey: Humana. 100.
- Hillensjö T., Kripner A. S., Pomerantz S. H., Channing C. P. (1979): Action of porcine follicular fluid oocyte maturation in vitro: Possible role of the cumulus cells. In: Channing C. P., Marsh J. M., Sadler W. A. editors. Ovarian follicular and corpus luteum function. New York. Plenum Press. 283-291.
- Hirschfield A. N. (1991): Development of follicles in the mammalian ovary. International Review Of Cytology. 124: 42-101.
- Hobbs A. J. (1997): Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. Trend. Pharmacol. Sci. 18: 484-491.
- Hofmann F., Ammendola A., Schlossmann J. (2000): Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. J. Cell Sci. 113: 1671–1676.
- Hubbard C. J. (1983): The effect in vivo of alterations in gonadotropins and cyclic nucleotides on oocyte maturation in the hamster. Life. Sci. 33: 1695-1702.
- Hubbard C. J. (1986): Cyclic AMP changes in the component cells of graafian follicles: possible influences on maturation in the follicleenclosed oocytes of hamsters. Dev. Biol. 118: 343-51.
- Hubbard C. J., Price J. (1988): The effects of follicle-stimulating hormone and cyclic guanosine 3-5-monophosphate-phosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 39: 829-838.
- Huo L. J., Fan H. Y., Liang C. G., Yu L. Z., Zhong Z. S., Chen D. Y., Sun Q. Y. (2004) Regulation of ubiquitin – proteasome pathway on pig oocyte meiotic maturation and fertilization. Biol. Reprod. 71: 853 – 862.
- Hyttel P., Fair T., Avery B., Callesen H., Greve T. (1999): Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. Reprod. Dom. Anim. 34: 447-454.
- Iadecola C (1997) Trends Neurosci 20:132–139, pmid:9061868.
- Ignarro L. J. (1999): NO in vascular biology, Angew Chem Int Ed. 38: 1882 –1892.
- Ignarro L. J., Adams J. B., Horwitz P., Wood K. S. (1986): Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. J. Biol. Chem. 261: 4997–5002.
- Ignarro L. J., Burga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G. (1987): Endotelium-derived relaxing factor produced realased from artery and vein is nitric oxide, Proc Natl Acad Sci USA 84: 9265 – 9269.

- Ignarro L. J., Fukuto J. M., Griscavage J. M., Rogers N., Byrens R. E. (1993): Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparisons with enzymatically formed nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8103 – 8107.
- Inoue M., Naito K., Nakayama T., Sato E. (1995): Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocyte. *Zygote*. 3: 265-271.
- Irniger S. (2002): Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett.* 532: 7–11.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Francis, S. H., et al. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 431-437.
- Jablonka - Sharif A., Olson L.M. (2000) Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus - oocyte complexes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 412 - 421.
- Jablonka - Shariff A., Basuray R., Olson L. M. (1999) Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 6: 95 – 101.
- Jablonka-Shariff A., Olson L.M. (1998): The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139: 2944–2954.
- 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.
- Janssens S. P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D. B., Bloch K. D. (1992): *J. Biol. Chem.* 267: 14519 – 14522.
- Jenner S., Farndale R. W., Sage S. O. (1994): The effect of calcium-store depletion and refilling with various bivalent cations on tyrosine phosphorylation and Mn<sup>2+</sup> entry in fura-2-loaded human platelets. *Biochem. J.* 303: 337–339.
- Jones K. T. (2004): Turning it on and off: M - phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 10 (1): 1–5.
- Juilfs D. M., Soderling S., Burns F., Beavo, J. A. (1999): Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135: 67–104.
- Kaiser F. E., Dorigi M., Muchnick J., Morley J. E., Patrick P. (1996): Regulation of gonadotropins and parathyroid hormone by nitric oxide. *Life. Sci.* 59: 987–992.

- Kanayama N., Miyano T., Lee J. (2002): Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate cdc - 2 kinase and MAP kinase. *Zygote*. 10:261–10270.
- Kastrop P. M., Bevers M. M., Destree O. H., Kruij T. A. M. (1990): Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 90: 305-310.
- Kaufman M.L., Homa S.T. (1993): Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *J. Exp. Zool.* 265: 69–76.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992). Detection of cGMPdependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur. J. Biochem.* 208: 467-473.
- Kiesel L., Bertges K., Rabe T., Runnebaum B. (1986): Gonadotropin releasing hormone enhances polyphosphoinositide hydrolysis in rat pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 861–867.
- Kishimoto T. (1999): Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Dev. Biol.* 214(1): 1-8.
- Kishimoto T. (2003): Cell-cycle control during meiotic maturation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Dec. 15(6): 654-63.
- Koesling D., Böhme E., Schultz G. (1991): Guanylyl cyclases, a growing family of signal – transducing enzymes. *FASEB Journal.* 5: 2785-2791.
- Koesling D., Friebe A. (1999): Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 135: 41-65.
- Koesling D., Herz J., Gausepohl H., Niroomand F., Hinsch K. D., Mülsch A., Böhme E., Schultz G., Frank R. (1988): The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS. Lett.* 239: 29-34.
- Koglin M., Vehse K., Budaeus L., Scholz H., Behrends S. (2001): Nitric oxide activates the  $\beta_2$  subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *J. Biol. Chem.* 276: 30737-30743.
- Komalavilas, P. and Lincoln, T. M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* 271: 21933-21938.
- Koppenol, W.H. and Traynham, J.G. (1996) Say NO to nitric oxide: Nomenclature for nitrogen and oxygencontaining compounds. *Methods Enzymol.* 268: 3-7.

- Kubelka M., Anger M., Kalous J., Schultz R. M., Motlík J. (2002): Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Mol. Reprod. Dev.* 63: 110–118.
- Kuo, J. F., and Greengard, P. (1970). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3,4 – monophosphate. *J. Biol. Chem.* 245: 2493-2498.
- Kupková Z., Beneš L. (2004): Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem. listy* 98: 116 – 122.
- Kwan H-Y., Huang Y., Xiaoqiang Y. (2000): Store-operated calcium entry in vascular endothelial cells is inhibited by cGMP via a protein kinase G-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 275: 6758-6763.
- Lamas, S., Michel, T., a Collins, T. (1992). Effects of interferon-gama on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 90: 879-887.
- Lane H. A., Nigg E. A. (1996): Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk 1) in the functional maturation of mitotic cells. *J. Cell. Biol.* 135: 1707-1713.
- Larsen W .J., Wert S. E., Brunner G. D. (1987): Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulations. *Dev Biol* 122: 61-71.
- Lazar S., Galiani D., Dekel N. (2002): cAMP-dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Mol. Endocrinol.* 16: 331-341.
- Lee H.C. (1996): Modulator and messenger functions of cyclic ADP-ribose in calcium signalling. *Recent Prog. Hormone Res.* 51: 355–389.
- Lee, M. R., Li, L. and Kitazawa, T. (1997). Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272: 5063-5068.
- Levesque J. T., Sirard M. A. (1996): Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 55: 1427-1436.
- Licht P., McCreery B. R., Barnes R., Pang R. (1983): Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 124–145.
- Licht P., Porter D. A. (1987): Role of gonadotropin-releasing hormone in the regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. In: Norris D. O.,

Jones A. E. (eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York. Plenum Press. 61–85.

- Licht P., Tsai P. S., Sotowska-Brochocka J. (1994): The nature and distribution of gonadotropin-releasing hormones in brains and plasma of ranid frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 186–198.
- Liu, Q. and Gross, S.S. (1996) Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol.* 268: 311-324.
- Livneh E., Fishman D. D. (1997): Linking protein kinase C to cell cycle control. *Eur. J. Biochem.* 248: 1–9.
- Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U. and De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 307-312.
- Lorca T., Cruzalegui F. H., Fesquet D., Cavadore J. C., Mery J., Means A., Doree M. (1993): Calmoduline - dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature.* 366: 270-273.
- Lundy T., Smith P., O'Connell A., Hudson N. L., McNatty K. P. (1999): Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115(2): 251-262.
- Macháty Z., Funahashi H., Day B. N., Prather R. S. (1997): Developmental changes in the intracellular  $Ca^{2+}$  release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 56: 921–930.
- Makita Z., Vlassara H., Rayfield E., Cartwright K., Friedman E., Rodby R., Carami A. Bucala R. (1992): Hemoglobin AGE: A circulation marker of advanced glycosylation. *Science* 258: 651-653.
- Makris A., Ryan K. J. (1978): Cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in hamster pre-ovulator follicle stimulated with LH and FSH. *Acta Endocrinol* 87: 158-63.
- Marvan F., Hampl A., Hložánková E., Kesan J., Massanyi L., Vernerová E., Jelínek K. (1998): *Morfologie hospodářských zvířat*. 2.vyd. Praha. Nakladatelství Brázda. 304s.
- Masui Y., Markert C. L. (1971): Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146.
- Matifat F., Hague F., Brule G., Collin T. (2001): Regulation of  $InsP_3$  - mediated  $Ca^{2+}$  release by CaMK II in *Xenopus* oocytes. *Pflugers. Arch.* 441: 796–801.
- Matsuda S., Kosako H., Takenaka K., Moriyama K., Sakai H., Akiyama T., Gotoh Y., Nishida E. (1992): *Xenopus* MAP kinase activator – identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *Embo. Journal.* 11(3): 973-982.

- McAllister-Lucas L. M., Sonnenburg W. K., Kadlecsek A., Seger D., Trong, H. L., Colbran J. L., Thomas M. K., Walsh K. A., Francis S. H., Corbin, J. D. (1993): The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* 268: 22863–22873.
- McGee E. A., Hsueh A. J. W. (2000): Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine. Reviews.* 21(2): 200-214.
- McPherson P. S., Campbell K. P. (1993): The ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *J. Biol. Chem.* 268: 13765–13768.
- Mehta J.L., Chen L.Y., Kone B.C., Mehta P., Turner P. (1995): Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.*, 125: 370–377.
- Meinecke B., Krischek C. (2003): MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus - enclosed pig oocytes. *Zygote.* 11: 7–16.
- Mellor H., Parker P. J. (1998): The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281–292.
- Messinger S. M., Albertini D. F. (1991) Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 100: 289 – 298.
- Misko T.P., Moore W.M., Kasten T.P., Nickols G.A., Corbett J.A., Tilton R.G., McDaniel M.L., Williamson J.R., Currie M.G. (1993): Selective-inhibition of the inducible nitric-oxide synthase by Aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233(1): 119-125.
- Miyano T. (2003): Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology.* 59: 61-72.
- Miyazaki S. (1991): Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cel. Calcium.* 12: 205-216.
- Moncada S., Higgs E. A. (1995): Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB. J.* 9: 1319-1330.
- Moncada S., Rees D.D., Schulz R., Palmer R.M. (1991): Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2166–2170.
- Monniaux D., Huetc, Besnard N., Clément F., Bosc M., Pisselet C., Monget P., Mariana J.C. (1997): Follicular growth and ovaria dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil.* 51: 3-23.
- Moretto M., Lopez F. J., Negro-Vilar A. (1993): Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology.* 133: 2399–2402.

- Motlík J., Fulka J. (1986) Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25: 87 – 96.
- Motlík J., Kubelka M. (1990) Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 27: 366 – 375.
- Murad F. (1994): Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO cyclic GMP signal transduction system, *Adv Pharmacol.* 26: 19 –33.
- Murphy M. P. (1999): Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411: 401–414.
- Murray A., Hunt T. (1993): *The cell cycle*. Oxford: Oxford. Univerzity. Press. pp 1-251.
- Naito K., Toyoda Y. (1991): Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 93: 467-473.
- 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., Arai K., Saheki S., Kuno T., Buechler W., Murad F. (1990): Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* 265: 16841-16845.
- Nakane M., Saheki S., Kuno T., Ishii K., Murad F. (1988): Molecular cloning of a cDNA coding for a 70 kDa subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 1139-1147.
- Naor Z., Leifer A. M., Catt K. J. (1980): Calcium-dependent actions of gonadotropin-releasing hormone on pituitary guanosine 39,59-monophosphate production and gonadotropin release. *Endocrinology.* 107: 1438–1445.
- Nathan C. (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB. J.* 6: 3051-3064.
- Nathan C., Xie Q. W. (1994): Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell.* 78: 915–918.
- Nathan, C. F. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- Nebreda A. R., Gannon J. V., Hunt T. (1993): Newly synthesized protein(s) must associate with p34cdc2 to activate MAP kinase and MPF during progesterone - induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 14: 5597–5607.
- Nigg E. A. (1998): Polo-like kinases: Positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin. Cell. Biol.* 10: 776-783.

- Nishizuka Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature*. 344: 661.
- Nurse P. (1990): Universal control mechanism regulating onset of M - phase. *Nature*. 344: 503–508.
- O’Keefe S., Wolfes H., Kiessling A. A., Cooper G. M. (1989): Microinjection of anti-sense c-mos oligonucleotides prevents meiosis II in the maturing mouse egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 7038-7042.
- Orly J. (1989): Orchestrated expression of steroidogenic side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 37: 155-162.
- Papapetropoulos A., Go C. Y., Murad F., Catravas J. D. (1996): Mechanism of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 117: 147-155.
- Papapetropoulos A., Marczin N., Mora G., Milici A., Murad F., Catravas J. (1995): Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension*. 26: 696-704.
- Parekh, A. B., Penner, R. (1997): Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77: 901–930.
- Parrish J. J., Kim C. I., Bae I. H. (1992): Current concepts of cell - cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*. 38: 277 – 296.
- Parrot A., Skinner M. K. (1999): Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 40(9): 4262-4271.
- Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J. C., Nigg E. A. (1990): Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substances of cdc2 kinase. *Cell*. 60: 791-801.
- Peter R. E. (1983): Evolution of neurohormonal regulation of lower vertebrates. *Am. Zool.* 23: 685–695.
- Peterson D.A., Peterson D.C., Archer S., Weir E.K. (1992): The non specificity of specific nitric oxide synthase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 797-801.
- Petr J., Chmelíková E., Dorflerová A., Jeřeta M., Kuthanová Z. (2007): Effects of protein kinase C on parthenogenetic activation of pig oocytes using calcium ionophore or nitric oxide-donor. *Czech J. Anim. Sci.* (in press).
- Petr J., Rozinek J., Hruban V., Jílek F., Sedmíková M., Vaňourková Z., Němeček Z. (2001): Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 196–204.



- Petr J., Rozinek J., Jílek F. (1997): Cyclopiazonic acid induces accelerated progress of meiosis in pig oocytes. *Zygote*. 5: 193–205.
- Pfeifer A., Klatt P., Massberg S., Ny L., Sausbier M., Hirneiss C., Wang G. X., Korth M., Aszodi A., Andersson K. E., Krombach F., Mayerhofer A., Ruth P., Fassler R., Hofmann F. (1998): Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 17: 3045–3051.
- Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P. and Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev. Phys. Biochem. Pharmacol.* 135: 105-149.
- Phillips T. J., Hen R., Crabbe J. C. (1999) Complications associated with genetic background effects in research using knockout mice. *J. Psychopharmacol.* 147: 5 – 7.
- Plilz R. B., Broderick K. E. (2005): Role of cyclic GMP in gene. *Frontiers in Bioscience* 10: 1239 – 1268.
- Pozzan T., Rizzuto R., Vsipe P., Meldolesi J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 595–636.
- Racowsky C. (1985): Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. *J. Exp. Zool.* 234: 87-96.
- Randriamampita C., Tsien R. Y. (1993): Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature*. 364: 809–814.
- Rapoport R.M. (1986): Cyclic guanosine-monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidyl inositol hydrolysis in rat aorta. *Circ. Res.*, 58: 407–410.
- Rapoport, R. M. (1989). Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidyl inositol hydrolysis in rat aorta. *Circ. Res.* 58: 407-410.
- Ratner A., Sanborn C. R. (1980): Effect of endogenous LH secretion on ovarian cyclic AMP and cyclic GMP levels in the rat. *Life. Sci.* 26: 439-445.
- Reece W. O. (1998): *Fyziologie domácích zvířat*. Praha: Grada Publishing. 347-385.
- Rees D.D., Palmer R.M.J., Hodson H.F., Moncada S. (1989): A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96: 418-424.
- Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F., Moncada S. (1990): Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746-752.

- Romanovský A., Činčerová A., Čížek F., Dvořák P., Kaprálek F., Kubišta V., Nedvídek J., Opatrný Z., Pazourek J., Pikálek P., Sefert J., Slavíková Z., Váňa J., Závada V. (1988): *Obecná biologie*. Praha. SPN. 1-695.
- Rozinek J., Vaňourková Z., Sedmíková M., Lanská V., Petr J., Rajmon R., Jílek F. (2003): Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig oocytes maturing in vitro: Effects of verapamil. *Zygote*. 11: 253–260.
- Russwurm M., Behrends S., Harteneck C., Koesling D. (1988): Functional properties of a naturally occurring isoform of guanylyl cyclase. *Biochem. J.* 335: 125-130.
- Sagata N. (1997): What does Mos do in oocytes and somatic cells? *BioEssays*. 19(1): 13-21.
- Salustri A., Petrunaro R., Felici M., Conti M., Siracusa G. (1985): Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cellenclosed oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 3: 797-802.
- Salvemini D., Misko T. P., Masferrer J. L., Seibert K., Currie M. G., Needleman P. (1993): Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 7240-7244.
- Sato E., Koide S. S. (1987): Biochemical transmitters regulating the arrest and resumption of meiosis in oocytes. *Int. Rev. Cytol.* 106: 1-33.
- Schmidt K., Klatt P., Mayer B. (1993) Characterization of endothelial cell amino acid transport systems involved in the actions of nitric oxide synthase inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 44: 615 – 621.
- Schmitt A., Nebreda A. R. (2002): Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *J. Cell. Sci.* 115: 2457–2459.
- Schrammel A., Behrends S., Schmidt K., Koesling D., Mayer B. (1996): Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-oneas a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 50: 1-5.
- Schrey M. P. (1985): Gonadotropin releasing hormone stimulates the formation of inositol phosphates in rat anterior pituitary tissue. *Biochem. J.* 226: 563–569.
- Schultz R. M., Montgomery R. R., Belanoff J. R. (1983): Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dcv. Biol.* 97: 264-273.

- Sedmíková M., Rajmon R., Petr J., Švestková D., Chmelíková E., Bantirgu A., Rozinek A.J., Jílek F. (2006): Effect of protein kinase C inhibitors on porcine oocyte activation. *J. Exp. Zool. Part. 305*: 376–382.
- Senbon S., Hirao Y., Miayano T. (2003): Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: Lessons from in vitro culture. *J. Reprod. Dev. 49*: 259.
- 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. *Mol. Reprod. Dev. 58*: 262–268.
- 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. *Mol. Reprod. Dev. 58*: 262 – 268.
- Sergei D. R., Rybalkina I. G., Feil R., Hofmann F., Beavo A. J. (2002): Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE 5) phosphorylation in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem. 277*: 3310-3317.
- Shimouchi A., Janssens S. P., Bloch D. B., Zapol W. M., Bloch K. D. (1993): cAMP regulates soluble guanylate cyclase  $\beta$ 1-subunit gene expression in RLF-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. 265*: L456-L461.
- Shiraishi K., Okada A., Shirakawa H., Nakanishi S., Mikoshiba K., Miyazaki S. (1995): Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and inositol - 1,4,5 - triphosphate receptor and the spatial pattern of  $Ca^{2+}$  release during maturation of hamster oocyte. *Dev. Biol. 170*: 594–606.
- Sigmund C. D. (2000) Viewpoint: are studies in genetically altered mice out of control? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20*: 1425 – 1429.
- Sirard M. A. (2001): Resumption of meiosis mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology. 55*: 1241–1254.
- Sládeček F. (1986) Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia. Praha. 480s.
- Smolenski A., Bachmann C., Reinhard K., Honig-Liedl P., Jarchau T., Hoschuetzky H., Walter U. (1998): Analysis and Regulation of Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Serine 239 Phosphorylation in Vitro and in Intact Cells Using a Phosphospecific Monoclonal Antibody. *J. Biol. Chem. 273*: 20029–20035.
- Snyder G. D., Holmes R. W., Batas J. N., Van Voorhis B. J. (1996): Nitric oxide inhibits aromatase activity: Mechanisms of action. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 58*: 63 – 69.

- Snyder G., Naor Z., Fawcett C. P., McCann S. M. (1980): Gonadotropin release and cyclic nucleotides: evidence for luteinizing hormone-releasing hormone-induced elevation of guanosine 3',5'-monophosphate levels in gonadotrophs. *Endocrinology*. 107: 1627–1633.
- Sousa M., Barros A., Tesařík J. (1996): The role of ryanodine – sensitive  $Ca^{2+}$  stores in the  $Ca^{2+}$  oscillation machine of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 265 – 272.
- Southan G.J., Szabó C. (1996): Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 51: 383-394.
- Stojkovic M., Motlík J., Kölle S., Zakchartchenko V., Alberio R., Sinowatz F., Wolf E. (1999): Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 335–342.
- Stuehr D. J. (1999): Mammalian nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1411: 217 – 230.
- Sugiura K., Naito K., Iwamori N., Kagii H., Goto S., Ohashi S., Yamanouchi K., Tojo H. (2001): Germinal vesicle materials are not required for the activation of MAP kinase in porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 215–220.
- Sun Q. Y., Lai L., Park K. W., Kuhholzer B., Prather R. S., Schatten H. (2001): Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen - activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 64: 879–889.
- Sun Q. Y., Nagai T. (2003): Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 49: 347–359.
- Sun Q. Y., Rubinstein S., Breitbart H. (1999): MAP kinase activity is down regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg activation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 310–318.
- Suzuki H., Kagawa N., Toyokawa K. (2002): Pronuclear migration and cytoskeletal organization of porcine oocytes activated by various stimuli. *J. Mammal.* 19: 96–103.
- Szabó C., Southan G.J., Thiemermann C. (1994): Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12472-12476.
- Takesue K., Hattori M. A., Nishida N., Kato Y., Fujihara N. (2001) Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. *J. Mol. Endocrinol.* 26: 259 – 265.

- Takesue K., Tбата S., Sato F., Hattori M. A. (2003) Expression of nitric oxide synthase - 3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *J. Reprod. Dev.* 49: 2.
- 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. *J. Anim. Physiol. Ann.* 89: 38 – 44.
- 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. *J. Anim. Physiol. Ann.* 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. *Mol. Cell. Endocrinol.* 222: 93 – 103.
- Thomas M. K., Francis S. H., Corbin J. D. (1990): Substrate-and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP- binding phosphodiesterase by cGMP. *J. Biol. Chem.* 265: 14971–14978.
- Titheradge M A (1999) *Biochim Biophys Acta* 1411:437–455, pmid:10320674.
- Törnell J., Billing H., Hillensjo T. (1991): Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum. Reprod.* 6: 411-422.
- Tranguch S., Huet - Hudson Y. (2003) Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 175 – 179.
- Uchiumi T., Longo D. L., Ferris D. K. (1997): Cell cycle regulation of the human polo-like kinase PLK promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 9166-9174.
- Ujiie K., Hogarth L., Danziger R., Drewett J. G., Yuen P., Pang I. H., Star R. (1994): Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 761-767.
- Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Tilly, B. C., Houtsmuller, A. B., Ehlert, E. M. E., Bot, A. G. M., Edixhoven, M., Boomaars, W. E. M., Lohmann, S. M. and De Jonge, H. R. (1998). Membrane targeting of cGMPdependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  $\bar{C}$ channel activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 1466-1471.
- Van Coppenolle F., Ahidouch A., Guilbault P., Ouadid H. (1997): Regulation of endogenous Ca<sup>2+</sup> channels by cyclic AMP and cyclic GMP-dependent protein kinases in *Pleurodeles* oocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 168: 155–161.

- Van de Wiel D. F., Bar-Ami S., Tsafiriri A., de Jong F. H. (1983): Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 68: 247-252.
- Vanderhyden B. (2002): Molecular basis of ovarian development and function. *Front. Biosci.* 7: 2006-2022.
- Verde F., Dogterom M., Stelzer E., Karsenti E., Leibler S. (1992): Control of microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development.* 120: 1017-1025.
- Verlhac M., 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.
- Viveiros M. M., Hirao Y., Eppig J. (2001): Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 235: 330-342.
- Vostal J. G., Jackson W. L., Shulman N. R. (1991): Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 16911–16916.
- Waldman S. A., Murad. F. (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39: 163–196.
- Walter, U. (1988). Distribution of cyclic GMP- dependent protein kinase in various rat tissues and cell lines determined by a sensitive and specific radioimmunoassay. *Eur. J. Biochem.* 118: 339-346.
- Wassarman P. (1988): The Mammalian Ovum. In: Knobil E., Neil J. editors. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press. 69-102.
- White, R. E., Lee, A. B., Shcherbatko, A. D., Lincoln, T. M., Schonbrunn, A. and Armstrong, D. L. (1993). Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature* 361: 263-266.
- Williams S. J. (2002): Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum. Reprod.* 8: 313–321.
- Wolff D.J., Lubeskie A. (1995): Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 316: 290-301.
- Wolff D.J., Lubeskie A., Li C. (1997): Inactivation and recovery of nitric oxide synthetic capability in cytokine-induced RAW 264.7 cells treated with "irreversible" NO synthase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 333: 73-82.

- Wu B., Ignatz G., Currie B., Yang X. Z. (1997): Expression of Mos proto-oncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 56: 260-267.
- Xu X., Star R. A., Tortorici G., Muallem S. (1994): Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.* 269: 12645–12653.
- Yamano H., Gannon J., Mahbubani H., Hunt T. (2004): Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 13(1): 2-3.
- Yamashita M., Mita K., Yoshida N., Kondo T. (2000): Molecular mechanisms of the initiation of oocyte maturation: general and species - specific aspects. *Prog. Cell. Cycle. Res.* 4: 115–129.
- Yamauchi J., Miyazaki T., Iwasaki S., Kishi I., Kuroshima M., Tei C., Yoshimura Y. (1997): Effect of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology* 138: 3630-3637.
- Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilisation. In: Knobil E., Neil J. editors. *The physiology of reproduction*. second edition. New York: Raven Press. 189-280.
- Yao L. J., Fan H. Y., Tong C., Chen D. Y., Schatten H., Sun Q. Y. (2003): Polo - like kinase - 1 in porcine oocyte meiotic maturation, fertilization and early embryonic mitosis. *Cell. Mol. Biol.* 49: 399–405.
- Ye J., Flint A. P. F., Luck M. R., Campbell K. H. S. (2003): Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction.* 125: 645–656.
- Yue C. P., White K. L., Reed W. A., Bunch T. D. (1995): The existence of inositol 1, 4, 5 – triphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development.* 121: 2645–2654.
- Zabel U., Hausler C., Weeger M., Schmidt H. H. H. W. (1999): Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. *J. Biol. Chem.* 274: 18149-18152.
- Zhao Y, Brandish P E, Ballou D P, Marletta M A (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14753–14758.
- Zini A., O'Bryan M.K., Magid M.S., Schlegel P.N. (1996): Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55: 935–941.

- Zwiller J., Revel M. O., Malviya A. N. (1985): Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro. *J. Biol. Chem.* 260: 1350-1353.