

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv způsobu aktivace oocytů prasete na intracelulární
distribuci izoforem NO-syntázy
Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Michaela Faitová

Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vliv způsobu aktivace oocytů prasete na intracelulární distribuci izoforem NO-syntázy“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4.2016

Bc. Michaela Faitová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za odborné vedení a Ing. Lence Tůmové, Ph.D. za cenné rady při zpracování práce, za čas strávený konzultacemi a za její trpělivost během mé práce v laboratoři.

Vliv způsobu aktivace oocytů prasete na intracelulární distribuci izoforem NO-syntázy

Souhrn

Aktivace oocytu je složitý proces zahrnující prolomení druhého meiotického bloku, exocytózu kortikálních granul a dokončení druhého meiotického dělení. Oocyt je aktivován penetrující spermií. V *in vitro* podmínkách je však fertilizace u prasat na rozdíl od jiných hospodářských zvířat stále málo účinná z důvodu vysoké polyspermie. Jednou z možností, jak zvýšit produkci *in vitro* embryí u prasat, je partenogenetická aktivace oocytů. Tu je možné navodit pomocí umělých stimulů, mezi které patří i donory oxidu dusnatého (NO).

NO je molekula volného plynu, která plní funkci důležitého biologického posla v organismu. NO je syntetizován z L-argininu pomocí enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS). NOS se nachází v různých typech buněk a tkání a existuje ve třech izoformách (neuronová – nNOS, endoteliální – eNOS, indukovatelná – iNOS), které se od sebe liší svojí lokalizací, způsobem aktivace a funkcí. NOS a NO hraje klíčovou roli i v regulaci reprodukčních procesů včetně období růstu a zrání savčích oocytů. NO je zapojen i do regulace procesu aktivace oocytu, avšak přesný mechanismus této regulace není zcela objasněn a není zřejmé, zda nemůže být ovlivněn i způsobem aktivace.

Cílem diplomové práce bylo lokalizovat jednotlivé izoformy NO-syntázy (nNOS, eNOS, iNOS) v prasečích oocytech imunocytochemickou metodou za účelem ověření hypotézy, že intracelulární distribuce jednotlivých izoforem není závislá na způsobu aktivace prasečích oocytů. V oocytech prasete byly lokalizovány všechny tři izoformy NOS. Isoforma nNOS byla v oocytech v metafázi II (MII) lokalizována zejména v korové oblasti. Po aktivaci oocytu byl zaznamenán fluorescenční signál nNOS též v prvojádrech a v cytoplazmě v okolí prvojader. eNOS byla zaznamenána zejména v cytoplazmě a v oblasti meiotického vřeténka oocytů v MII. Po aktivaci vykazovaly partenogeneticky aktivované oocyty i zygoty velmi slabý imunofluorescenční signál eNOS. iNOS byla lokalizována zejména v korové oblasti oocytů v MII i v aktivovaných oocytech. V zygotách se protein vyskytoval též v cytoplazmě v okolí prvojader. Rozdíl v lokalizaci jednotlivých izoforem NOS mezi partenogeneticky aktivovanými oocyty a zygotami nebyl zaznamenán. Z výsledků vyplývá, že způsob aktivace oocytu prasete nemá vliv na intracelulární distribuci jednotlivých izoforem NOS.

Klíčová slova: oocyt, aktivace, IVF, NOS, prase

Effect of porcine oocyte activation mode on intracellular distribution of NO-synthase isoforms

Summary

Oocyte activation is a complex process involving exit from the second meiotic block, cortical granules exocytosis and the completion of the second meiotic division. The oocyte is activated by sperm penetration. In porcine, *in vitro* fertilization is not very effective due to high polyspermy, with respect to other species. The parthenogenetic activation (PA) is possibility to increase *in vitro* production of embryos in pigs. PA can be induced by artificial stimuli, including nitric oxide (NO) donors.

NO is a molecule of free gas and acts as an important molecular messenger. NO is synthesized from L-arginine through the action of nitric oxid synthase (NOS). NOS is found in a variety of cell types and exists in three isoforms (neuronal – nNOS, endothelial – eNOS, inducible – iNOS). These isoforms differ in their localization, function and activation signal. NOS and NO play a key role in the regulation of reproductive processes including growth period and maturation of mammalian oocytes. NO is involved in the regulation of oocyte activation, however the exact mechanism of this regulation is not fully understood. It is not clear, if the mechanism could be influenced by the method of activation.

The aim of this thesis was localized the different NOS isoforms (nNOS, eNOS, iNOS) in porcine oocyte using immunocytochemical method to verify the hypotesis that intracellular distribution of NOS isoforms are not dependent on the oocyte activation mode. In porcine oocyte were localized all three NOS isoforms. nNOS isoform was localized mainly in the cortex area in MII oocytes. After oocyte activation, nNOS fluorescence signal was noticed also in pronucleus and the cytoplasm near pronuclei. eNSO isoform was localized particularly in the cytoplasm and the meiotic spindle in MII oocytes. After oocyte activation, eNOS immunofluorescence signal was very low in the parthenogenetically activated oocyte and zygotes. iNOS was detected mainly in the cortex area in both of MII oocytes and activated oocytes. The protein occured also in the cytoplasm near pronuclei in zygotes. The difference in the localization of NOS isoforms between parthenogenetically activated oocyte and zygote were not reported. These results indicate that the activation method of of porcine oocyte does not effect the intracellular distribution of NOS izoforms.

Keywords: activation, IVF, NOS, porcine, oocyte

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Oogeneze	10
3.1.1	Množení zárodečných buněk.....	10
3.1.2	Růst oocyty a folikulogeneze.....	12
3.1.3	Meiotické zrání oocyty	16
3.1.4	Aktivace oocyty.....	19
3.2	Oxid dusnatý	26
3.2.1	Vlastnosti a syntéza oxidu dusnatého (NO).....	26
3.2.2	NOS izoformy	27
3.2.3	Struktura izoforem.....	28
3.2.4	Význam NO v organismu.....	28
3.2.5	Role NO v reprodukci samic.....	29
3.2.6	Význam NO v reprodukčních biotechnologiích	30
4	Materiál a metody	32
4.1	Materiál	32
4.1.1	Odběr vaječníků	32
4.1.2	Získání plně meioticky kompetentních oocytů.....	32
4.2	Metody	33
4.2.1	<i>In vitro</i> kultivace oocytů.....	33
4.2.2	Partenogenetická aktivace oocytů.....	33
4.2.3	<i>In vitro</i> fertilizace	33
4.2.3.1	Příprava spermií	33
4.2.3.2	<i>In vitro</i> fertilizace.....	35
4.2.4	Lokalizace izoforem NOS imunocytochemickým barvením oocytů	35
4.2.5	Vyhodnocení experimentu	36
4.3	Experimentální schéma	37
5	Výsledky	38
6	Diskuze	43
7	Závěr	46
8	Seznam literatury.....	47
9	Seznam použitých zkratk	55

1 Úvod

Prasata jsou důležitá nejen z hlediska živočišné produkce, ale i z hlediska biomedicínského. Díky jejich genetické, anatomické a fyziologické podobnosti s lidmi jsou prasata považována za ideální experimentální model pro studium a rozvoj nových terapií humánních nemocí a technik asistované reprodukce. Pro výzkumné účely a pro produkci transgenních zvířat je však zapotřebí velké množství kvalitních embryí produkovaných *in vitro*. Produkce *in vitro* embryí závisí na úspěšné *in vitro* fertilizaci. I přes prudký rozvoj reprodukčních biotechnologií v posledních letech zůstává *in vitro* fertilizace u prasat na rozdíl od jiných hospodářských zvířat stále málo účinná. Mezi hlavní příčiny patří vysoká polyspermie. Jednou z možností, jak zvýšit produkci *in vitro* embryí u prasat, je partenogenetická aktivace oocytů. Tu je možné navodit pomocí umělých stimulů, mezi které patří i donory oxidu dusnatého (NO).

NO je dvouatomová molekula volného plynu, která proniká volně skrz membrány buněk a plní funkci důležitého biologického posla v organismu. NO je syntetizován z L-argininu pomocí enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS). NOS existuje ve třech izoformách (neuronová – nNOS, endoteliální – eNOS, indukovatelná – iNOS) a byla nalezena v různých typech buněk a tkání. NOS a NO hraje klíčovou roli i v regulaci reprodukčních procesů včetně období růstu a zrání savčích oocytů. NO-dependentní signální kaskáda je zapojena i do regulace procesu aktivace oocytu. Přesný mechanismus této regulace však není zcela objasněn. Z tohoto důvodu není ani známo, zda se od sebe liší zapojení signální kaskády NOS/NO při partenogenetické aktivaci od aktivace spermií při *in vitro* fertilizaci.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je lokalizace jednotlivých izoform NO-syntázy (nNOS, eNOS, iNOS) v prasečích oocytech imunocytochemickou metodou za účelem ověření hypotézy, že intracelulární distribuce jednotlivých izoform není závislá na způsobu aktivace prasečích oocytů.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

3.1.1 Množení zárodečných buněk

Oogeneze představuje složitý proces, při kterém dochází k vývoji oocytů společně s vývojem folikulů. Začíná již v období fetálního vývoje a dokončen je v období pohlavní dospělosti (Picton *et al.*, 1998; Fair, 2003). Tento proces je regulován velkým množstvím intra-ovariálních a extra-ovariálních faktorů (Sánchez a Smitz, 2012). Oogeneze začíná tvorbou primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells – PGC) (Picton *et al.*, 1998). Prozatím existuje jen několik málo informací o genech a faktorech, které regulují tvorbu oocytů z PGC a uspořádání oocytů v primordiálních folikulech (Hurk a Zhao, 2005).

Proces formování oocytů zahrnuje 7 fází:

- Tvorba PGC
- Migrace PGC do budoucích gonád
- Osídlení gonád PGC
- Diferenciace PGC v oogonie
- Množení oogonií
- Zahájení meiózy
- Zastavení v diplotenní fázi profáze I meiózy (Hurk a Zhao, 2005)

Primordiální zárodečné buňky vznikají ve žlutkovém váčku (Hummitzsch *et al.*, 2013), jsou vysoce pohyblivé a schopné reagovat na chemické stimuly, které jim umožňují migrovat z místa původu do pohlavní lišty (Picton *et al.*, 1998). U prasete byly PGC zaznamenány již 18. den po koitu v oblasti zárodečné lišty. Jejich počet se během fetálního vývoje dramaticky zvyšuje. Zatímco 20. den po koitu bylo pozorováno přibližně 5 tisíc PGC, 50. den po koitu jich už byl jeden milion. Následně jejich mitotická aktivita klesá a současně se zvyšuje nekróza. Výsledkem je přibližně 500 tisíc PGC po narození (Black a Erickson, 1968).

Migrace, proliferace a osídlení rozvíjejících se pohlavních žláz PGC jsou řízeny mnoha faktory (Sánchez a Smitz, 2012). Jako klíčové byly identifikovány: transformující růstový

faktor β (TGF- β) a kostní morfogenetický protein (BMP-4), BMP-8b pocházející z extra-embryonálního ektodermu a BMP-2 pocházející z entodermu (Hurk a Zhao, 2005). Studie *in vitro* prováděné u myši ukázaly, že BMP2 a BMP4 zvyšují množství PGC (Sánchez a Smitz, 2012). Embrya, která vykazovala heterogenní koncentraci BMP měla množství PGC značně zredukované. Zdá se, že koncentrace těchto faktorů určuje množství vytvořených PGC (Hurk a Zhao, 2005). Pro přežití PGC je vyžadováno několik faktorů jako například $\text{FIG}\alpha$, faktor zodpovědný za včasnou expresi glykoproteinu, který v průběhu dalšího vývoje vytvoří *zonu pellucidu* či dva vazebné proteiny NANOS3 a DND1, které chrání PGC před apoptózou (Sánchez a Smitz, 2012).

Migrace PGC je umožněna díky kontaktnímu vedení mezi PGC a substrátem, přes který migrují, prostřednictvím C-kit receptoru, exprimovaným na povrchu PGC a jeho ligandu Kit ligand (KL, označován také jako faktor kmenových buněk), který je exprimován v somatických buňkách, nacházejících se podél migračních cest (Hurk a Zhao, 2005). Kromě toho je C-kit receptor a jeho ligand také nezbytný pro přežití PGC během embryonálního vývoje (Fair, 2003). Glykoproteiny například fibronektin, mohou jako součásti extracelulárního matrix vytvořit migrační cestu a stimulovat tak migraci PGC (Hurk a Zhao, 2005). Hurk a Zhao (2005) dále předpokládají, že některé chemické atraktanty, produkované v oblasti genitální lišty tam mohou PGC nasměrovat a zároveň ovlivnit jejich mitotickou aktivitu. Takovým atraktantem by mohl být TGF β 1 či aktivin, ale tyto domněnky zatím nejsou prokázány a vyžadují ještě hlubší zkoumání. Sánchez a Smitz (2012) uvádějí, že aktivin zvyšuje počet PGC u lidí, ale u myši naopak proliferaci PGC inhibuje. Mutace genů, kódujících tyto faktory mohou mít za následek vznik nedostatečného množství PGC (Sánchez a Smitz, 2012).

PGC migrují pod kontrolou faktoru kmenových buněk ze žloutkového váčku přes primitivní střevo do dorzálního okruží a následně do genitální lišty (Hummitzsch *et al.*, 2013). Jakmile PGC osídlí genitální lištu, začnou se diferencovat podle dostupných pohlavních chromozómů buď v oogonie nebo spermatogonie, které vykazují vysokou frekvenci mitotické aktivity a vysokou transkripční aktivitu (Hurk a Zhao, 2005). Počty zárodečných mitóz se postupně zvyšují, a když dosáhnou vrcholu, začnou klesat až na nulu, to znamená, že počet zárodečných buněk je určen ještě před narozením nebo krátce po něm

(Black a Erickson, 1968). PGC podstupují v rozvíjejícím se ovariu mitotické dělení s neúplnou cytokinezí, čímž dochází k formování shluků oogonií (Sánchez a Smitz, 2012). Na ultrastrukturální úrovni neexistují žádné rozdíly mezi PGC a oogonií. Rozdíl je však v tom, že oogonie jsou spojeny mezibuněčnými můstky (Bielanska-Osuchowska, 2006). Oogonie začínou být obklopovány somatickými buňkami, které pocházejí z mezonefros a následně tvoří shluky zárodečných buněk či kortikální pruhy. Uvnitř kortikálních pruhů podstoupí oogonie další replikaci DNA a poté, co vstoupí do meiózy, se stanou oocyty prvního řádu (Hurk a Zhao, 2005; Hummitzsch *et al.*, 2013).

Před tím, než se oocyty zastaví v diplotenní fázi, projdou leptotenní, zygotenní a pachytenní fází meiotické profáze I (Picton *et al.*, 1998; Hurk a Zhao, 2005). Každá fáze je charakterizována konkrétní konfigurací chromozómů (Fair, 2003) a dochází při nich k řadě zásadních změn, zahrnující párování homologních chromozómů, synapsi chromozómů a rekombinaci genetického materiálu neboli crossing overu (Sánchez a Smitz, 2012). V těchto raných meiotických fázích, kdy jsou zapotřebí různé DNA opravující proteiny a mnoho dalších faktorů pro správné seřazení chromozómů a rekombinaci, jsou oocyty extrémně citlivé, což má za následek degeneraci mnoha z nich (Hurk a Zhao, 2005). Následně oocyty postoupí do diplotenní fáze, nazývané také jako fáze diktyotenní, která představuje prodlouženou klidovou fázi (Sánchez a Smitz, 2012). Pozastavení meiózy závisí na vysoké hladině cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) tvořené oocytem prostřednictvím stimulace GPR3 receptoru (G-protein-coupled receptor) (Mehlmann, 2005). Oocyty v diktyotenní fázi jsou větší než oogonie a mají více cytoplazmatických organel. Také prošly genetickou rekombinací mateřské a otcovské DNA (Picton *et al.*, 1998; Hurk a Zhao, 2005). V období klidové fáze meiózy dochází k rozpadu shluků zárodečných buněk a zahájení tvorby folikulu (Sánchez a Smitz, 2012). Diplotenní fáze trvá až do období pohlavní dospělosti, kdy se plně dorostlý folikul setká s LH vlnou, která stimuluje oocyt k obnovení meiózy (Hurk a Zhao, 2005).

3.1.2 Růst oocyty a folikulogeneze

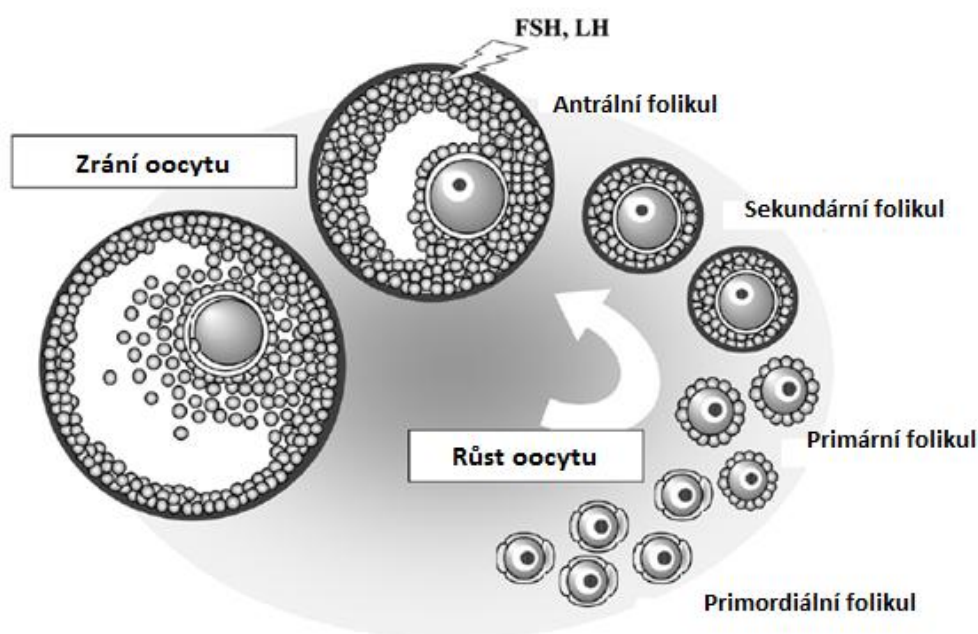
Folikulogeneze a oogeneze jsou dva procesy, které spolu úzce souvisí a nelze je od sebe oddělit. Jakékoliv odchylky od koordinace mohou znamenat poruchu reprodukce. Jakmile je aktivován primordiální folikul k růstu, roste i oocyt a to nezávisle na

gonadotropinech (Plant a Zeleznik, 2014). Pouze malé množství nerostoucích prasečích oocytů o velikosti 30 μm dorůstá do finální velikosti 120 μm , dozraje a následně ovuluje (Miyano, 2003).

Poté, co oocyt vstoupí do klidové fáze meiózy, nastává období růstu, při kterém oocyt přibližně stokrát zvětší svůj objem (Miyano, 2005). Kolem oocytu se začíná tvořit jedna vrstva dlaždicovitých granulózních buněk (označovaných také jako pre-granulózní), a tím dochází k formování primordiálního folikulu (Fair, 2003; Fortune, 2003; Sánchez a Smitz, 2012). Mnoho oocytů, které nejsou obklopeny granulózními buňkami, podléhá apoptóze. Apoptóza je klíčový proces, který reguluje množství primordiálních folikulů (Sánchez a Smitz, 2012). Primordiální folikuly představují konečnou zásobu oocytů, které zůstávají v klidové fázi, dokud nejsou stimulovány k dalšímu růstu. Faktory, které ovlivňují tvorbu primordiálních folikulů, nejsou doposud zcela objasněny (Fair, 2003).

Prvním znamením, že oocyt vstoupil do fáze růstu, jsou morfologické změny granulózních buněk, které se mění na kubické. V této fázi se folikul nazývá „primární“ folikul (Miyano, 2005). Přechod od primordiálního stádia k primárnímu může být zdlouhavý a folikuly v této fázi mohou obsahovat dlaždicovité i kubické granulózní buňky zároveň (Fortune, 2003). Po těchto morfologických změnách se folikuly dále vyvíjí, granulózní buňky aktivně prolifерují a vytváří druhou vrstvu kolem oocytu (Fortune, 2003; Miyano 2005). Jednovrstevný primární folikul se mění ve vícevrstevný sekundární (pre-antrální) folikul (Miyano, 2005; Hurk a Zhao, 2005), který dosahuje u prasnic v průměru 300 μm , zatímco oocyt dosahuje v průměru maximálně 90 μm . Následuje přeměna v antrální (terciární) folikul ve kterém se tvoří velká, tekutinou naplněná antrální dutina (Miyano, 2005).

Obr. č. 1 Růst a zrání oocyty ve vaječníku



Převzato z Miyano, T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. Journal of Reproduction and Development. 51 (2). 169-176.

Oocyty musí nejprve projít fází růstu, aby mohly pokračovat v jaderném zrání a následně podstoupit proces oplození a buněčné dělení. Během růstu oocytů dochází nejen k velkému nárůstu RNA a proteinové syntézy, ale také se zvyšuje množství ribozómů, mitochondrií a dalších organel (Hurk a Zhao, 2005). Jednou z nejvýraznějších změn v růstové fázi je vylučování glykoproteinové membrány, zvané *zona pellucida* (ZP), která tvoří ochrannou vrstvu kolem oocyty (Hunter, 2003; Hurk a Zhao, 2005; Miyano, 2005). ZP je secernována výhradně oocytem do perivitelinního prostoru (Picton *et al.*, 1998) a skládá se ze tří proteinů – ZP1, ZP2 a ZP3, z nichž každý je nezbytný pro správnou funkci ZP (Picton *et al.*, 1998; Hunter, 2003). Protein ZP1 tvoří spojení mezi proteiny ZP2 a ZP3. Protein ZP3 působí jako receptor pro navázání spermie a vyvolání akrozomální reakce. Po akrozomální reakci protein ZP2 působí jako sekundární receptor a usnadňuje spermií proniknutí skrz ZP. Následně enzymy přítomné v kortikálních granulích způsobí modifikaci ZP a tím zabrání polyspermii (Picton *et al.*, 1998). Zona proteiny jsou také nezbytné pro normální vývoj folikulů a jejich exprese vyžaduje transkripční faktor Fig- α (Hurk a Zhao, 2005). Granulózní

buňky jsou během růstu folikulů a vzniku antra rozděleny do anatomicky a funkčně odlišných typů buněk. Kumulární buňky mají přímý metabolický kontakt s oocytem a murální granulózní buňky tvoří vrstevnatý epitel podél bazální laminy folikulu (Picton *et al.*, 1998). Folikulární buňky obklopující *zonu pellucidu* tvoří vrstvu zvanou *corona radiata* (Rastogi, 2007) V těchto specializovaných kumulárních buňkách jsou vytvořeny cytoplazmatické výběžky, jako jsou desmosomy a systém gap junctions, které pronikají skrz *zonu pellucidu* do membrány oocytu (Picton *et al.*, 1998). Toto spojení umožňuje přenos živin, metabolických prekurzorů (například aminokyselin a nukleotidů), informačních molekul (například hormonů, neurotrofinů a růstových faktorů) a inhibičních a stimulačních signálů meiózy (Hurk a Zhao, 2005). Velikost a stádium folikulu, ve kterém je dokončen růst oocytu se druhově liší. Zatímco myší oocyty jsou téměř plně dospělé již v časném antrálním folikulu, prasečí oocyty nedokončí svůj růst, dokud folikul nevstoupí do pozdní antrální fáze (Miyano, 2005). Vývoj folikulu doprovázený růstem oocytu je zdoluhavý proces, který od zahájení růstu primordiálního folikulu do preovulačního stádia trvá u prasat přibližně tři měsíce (Miyano, 2003).

Zahájení růstu folikulu je nezávislé na folikulostimulačním hormonu (FSH). Přejít primárního folikulu na sekundární je poháněn spíše lokálními, intraovariálními, parakrinními faktory, produkovanými oocyty, granulózními a thekálními buňkami (Sánchez a Smitz, 2012). Je známo několik růstových faktorů a cytokinů, které jsou zapojeny do růstu oocytu a folikulárního vývoje (Moniruzzaman a Miyano, 2007). Skupina transformačního růstového faktoru β (TGF- β) ovládá folikulogenezi prostřednictvím autokrinního/parakrinního mechanismu a později se podílí také na ovulaci (Erickson a Shimasaki, 2000). Do skupiny TGF- β patří růstový diferenciační faktor 9 (GDF-9) a kostní morfogenetický protein 15 (BMP-15) (Erickson a Shimasaki, 2000; Paulini a Melo, 2011), které jsou exprimovány v oocytu během folikulárního vývoje. Tyto růstové faktory stimulují proliferaci a diferenciaci somatických folikulárních buněk během vývoje folikulu a také jsou zásadní pro aktivaci primordiálních folikulů (Paulini a Melo, 2011). Bylo prokázáno, že GDF-9 získaný z oocytů vyvolává změny v genové expresi, které jsou nezbytné pro správnou folikulogenezi (Erickson a Shimasaki, 2000). GDF-9 je zásadní také pro tvorbu sekundárního folikulu. Samice myší postrádající GDF-9 vykazovaly blok ve vývoji folikulů za hranici primární fáze. Při absenci GDF-9 většina granulózních buněk nebyla schopna proliferace a podlehlá atrezii. Kromě toho GDF-9

kontroluje dostupnost biologicky aktivního aktivinu či inhibinu (Hurk a Zhao, 2005), který dle Ericksona a Shimasakiho (2000) hraje velice důležitou roli v diferenciaci folikulů. Zdá se, že progrese raného vývoje folikulů vyžaduje působení ještě několik dalších faktorů exprimovaných v oocytu či granulózních buňkách. Mezi takové faktory patří TATA vazebný protein 2 (TBP2), který má na starost kontrolu transkripce během oogeneze nebo anti-Müllerian hormon (AMH) nezbytný k udržování rovnováhy mezi počtem aktivovaných primordiálních folikulů a folikulů, které zůstávají v klidové fázi (Sánchez a Smitz, 2012). Kromě toho AMH snižuje reakci folikulů na FSH a tím může modifikovat jejich růst (Hurk a Zhao, 2005). Dalším faktorem, který se podílí na zahájení růstu folikulů a proliferaci granulózních buněk je c-Kit receptor a jeho ligand. Nedávné studie naznačují, že v prvotní aktivaci folikulu hraje roli také nervový růstový faktor (NGF) (Sánchez a Smitz, 2012).

3.1.3 Meiotické zrání oocytu

Meiotické zrání savčích oocytů je zdlouhavý proces, který je řízen několika faktory (Tsafriri *et al.*, 1982). Jak již bylo zmíněno, začíná v průběhu fetálního vývoje, ale je pozastaveno v pozdním diplotenním stádiu (Sedmíková *et al.*, 2003). Meióza je znovu obnovena v dospělosti v důsledku prudkého zvýšení gonadotropinů v preovulačním období (Tsafriri *et al.*, 1982). Pouze plně vyvinutý folikul společně s plně dorostlým oocytem je schopen reagovat na cyklickou vlnu gonadotropinů (Miyano, 2005; Wu *et al.*, 2006). Luteinizační hormon (LH) vyvolává expresi epidermálního růstového faktoru ve stěnách granulózních buněk, který působí na kumulární buňky a má za následek spuštění zrání oocytů. LH receptory jsou umístěny na murálních granulózních buňkách, nikoliv na kumulárních buňkách či oocytu, to znamená, že mechanismus, kterým LH stimuluje zrání oocytů, je nepřímý (Mehlmann, 2005). Během obnovení meiózy dochází ke kondenzaci chromatinu, rozpadu zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown – GVBD) a vyčlenění prvního pólového tělíska (Tsafriri *et al.*, 1982; Sun a Nagai, 2003). Na rozdíl od myších oocytů, v prasečích oocytech je ke kondenzaci chromatinu a k GVBD nutná aktivní transkripce a translace (Hunter, 2000). Plně dorostlý oocyt po GVBD prochází metafází I, anafází I a telofází I až do metafáze II, kde se meióza znovu zastaví. Schopnost projít všemi těmito fázemi se nazývá meiotická kompetence (Sedmíková *et al.*, 2003). Prasečí oocyty jsou plně dorostlé a meioticky kompetentní, když dosahují velikost 120 μm (Tichovská *et al.*,

2011) ve folikulu o průměru tři a více milimetrů. V metafázi II dochází znovu k zastavení meiózy a nastává druhý meiotický blok. K dalšímu obnovení meiózy dojde až po stimulaci oocytu spermií, kdy oocyt dokončí zrání a vyčlení se druhé pólové tělísko. Poté dochází k dekonenzaci chromatinu spermie a mateřských chromozómů a vytvoření samčího a samičího prvojádra (Sun a Nagai, 2003).

Folikulární reakce na preovulační nárůst LH zahrnují změnu v produkci steroidů, kdy granulózní buňky začnou secernovat progesteron namísto estrogenu, a také dochází k produkci kyseliny hyaluronové, která způsobí expanzi kumulárních buněk a přerušení gap junctions spojení mezi kumulárními buňkami a oocytem (Picton *et al.*, 1998; Hurk a Zhao, 2005). V reakci na zvýšenou hladinu LH, dochází také k eliminaci jednoho nebo více inhibičních faktorů, jako například inhibitoru zrání oocytů (oocyte maturation inhibitor – OMI). Odstranění těchto inhibitorů vede k aktivaci cyklinů, fosfatáz a kináz, které jsou nezbytné pro jaderné zrání oocytů (Hunter, 2000), trvající u prasat přibližně 44 hodin (Hurk a Zhao, 2005). I když jaderně zralé oocyty mohou být oplodněny, mohou být vývojově nekompetentní v důsledku nedostatku některých, zatím nedefinovaných, cytoplazmatických faktorů, které jsou potřebné pro zajištění cytoplazmatického zrání. Rozvoj plného vývojového potenciálu je podmíněn synchronním jaderným a cytoplazmatickým zráním (Sun a Nagai, 2003).

Na regulaci obnovení meiózy se podílí řada faktorů. Mezi dvě důležité signální molekuly patří faktor podporující metafázi (Metaphase promoting factor - MPF) a mitogenem aktivované protein kinázy (mitogen-activated protein kinases – MAPK) (Sun a Nagai, 2003).

MPF je komplex tvořený cyklinem B (regulační subjednotka) a p34^{cdc2} kinázou (katalytická subjednotka) (Picton *et al.*, 1998; Hurk a Zhao, 2005). Množství subjednotek p34^{cdc2} kinázy a cyklinu B je srovnatelné jak v rostoucích tak i v plně dorostlých oocytech. Nicméně rostoucí oocyty obsahují fosforylovaný p34^{cdc2} a nejsou schopny aktivovat MPF, dokud nedokončí svůj růst. Aktivace MPF je obvykle vyvolaná tyrosinovou defosforylací p34^{cdc2} a syntézou cyklinu B. V plně dorostlém prasečím oocytu se syntetizovaný cyklin B a p34^{cdc2} nachází už ve společném komplexu (Sun a Nagai, 2003). Aktivovaný MPF je schopen

fosforylovat proteiny, které tvoří jaderný obal a které se podílí na kondenzaci chromatinu a reorganizaci cytoskeletu (Hurk a Zhao, 2005). V konečném důsledku dochází k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozómů a vytvoření meiotického vřeténka. To vše je nezbytné pro úspěšné oplození a podporu raného vývoje embrya. Aktivita MPF v prasečích oocytech se hodnotí pomocí měření aktivity histonu (H1) kinázy (Hunter, 2000). Ta prudce stoupá v MI fázi, klesá během anafáze a telofáze I, a opět se zvyšuje při MII fázi. Zvýšení aktivní formy MPF až na hladinu efektivní koncentrace vyžaduje aktivní syntézu proteinů (Sun a Nagai, 2003). Po oplození aktivita MPF klesá a je dokončeno druhé zrací dělení. Tento pokles MPF aktivity nastává současně s výstupem z metafáze I a II, to naznačuje, že inaktivace MPF je pro tento výstup nezbytná. Podle některých studií by mohlo stanovení MPF aktivity sloužit jako indikátor cytoplazmatického zrání prasečích oocytů, a tedy „kvality“ oocytů (Hunter, 2000).

Mezi další kinázy, které se podílí na zrání oocytů, patří MAPK (Hunter, 2000; Hurk a Zhao, 2005), které fosforylují cytoskeletální proteiny a jadernou laminu, což je nezbytné pro meiotické dělení buněk (Hunter, 2000). V savčích oocytech se nacházejí dvě isoformy MAPK a to ERK1 (P44) a ERK2 (P42) (Hunter, 2000; Hurk a Zhao, 2005). MAPK existuje v inaktivní formě v prasečím oocytu již v GV stádiu a je aktivována v období GVBD. Nutnost aktivity MAPK pro obnovení meiózy u prasečích oocytů je však stále sporná. Bylo zjištěno, že v G2/M přechodovém stádiu se část cytoplazmatické MAPK přesune do zárodečného váčku a existuje v aktivní formě ještě před GVBD (Sun a Nagai, 2003). MAPK kinázy jsou aktivovány pomocí MEK, specifické MAPK kinázy (Hurk a Zhao, 2005). Kromě toho aktivace těchto dvou izoform vyžaduje aktivní syntézu proteinů (Hunter, 2000). MAPK je potřebná pro udržení aktivní MPF a k zastavení v MII fázi (Hurk a Zhao, 2005). K aktivaci MAPK dochází před nebo současně s MPF v prasečích oocytech. Na rozdíl od MPF, MAPK aktivita zůstává vysoká i při vydělení pólového tělíska. Je jasné, že MPF i MAPK se podílejí na regulaci procesu zrání, ale jejich přesný fyziologický význam zatím není plně objasněn (Hunter, 2000). Schopnost rostoucího oocytu získat meiotickou kompetenci je v korelaci s jejich schopností aktivovat MPF a MAPK (Sun a Nagai, 2003).

Rozhodující význam pro meiotické zrání oocytů má cAMP (Hurk a Zhao, 2005). Do oocytů je transportován z kumulárních buněk pomocí systému gap junctions

(Sun a Nagai, 2003). Po expanzi kumulárních buněk a přerušení gap junctions spojení mezi kumulárními buňkami a oocytem dochází ke snížení koncentrace cAMP v oocytu a k deaktivaci protein kinázy A (PKA), která je závislá na cAMP, a k redukci inhibičních vlivů purinů na udržování klidové fáze meiózy (Picton *et al.*, 1998). Zvýšená hladina cAMP v oocytech, způsobená farmakologickou manipulací, způsobí blokádu meiózy. Vysoká hladina cAMP udržuje klidovou fázi meiózy pravděpodobně prostřednictvím PKA. (Hurk a Zhao, 2005). Také zde existuje jistá možnost, že cAMP inhibuje GVBD prostřednictvím regulace aktivity MAPK (Sun a Nagai, 2003).

3.1.4 Aktivace oocyty

Většina savčích oocytů je po ovulaci zastavena v MII fázi a meióza je dokončena až po oplodnění oocyty spermii. Spermie způsobí uvolnění z meiotického bloku prostřednictvím signální dráhy, která doposud není zcela objasněná, nicméně je zřejmé, že určující roli během aktivace oocytů hrají vápník, MPF a jeho stabilizační molekuly. Proces oplození začíná u savců interakcí mezi spermii a ZP (Raz a Shalgi, 1998). Poté, co spermie pronikne skrz ZP, se dostává přes perivitelliní prostor až k oolemě, kde dochází k navázání a splynutí spermie s membránou a k oplození oocyty (Raz a Shalgi, 1998; White *et al.*, 2010), který se stále nachází v MII fázi (Raz a Shalgi, 1998). V akrozomu spermii se nachází spermiový lysozymu podobný protein (sperm lysozyme-like protein – SLLP1), jehož struktura byla identifikována teprve v nedávné době. SLLP1 vykazuje vysokou afinitu k receptoru SAS1B v oolemě oocyty. Kromě toho se zjistilo, že molekuly tohoto proteinu jsou vybaveny hrotem, který zřejmě usnadňuje spermii pevné přichycení na povrch oocyty. K potvrzení této hypotézy je však nezbytné další zkoumání (Zheng *et al.*, 2015). Dalším možným vysvětlením vazby spermie a oocyty je, že se disintegrin na membráně spermie váže s integrinem na plazmatické membráně oocyty. (Raz a Shalgi, 1998). V této době už spermie prošla akrozomální reakcí a díky tomu se mohou ligandy přítomné na vnitřní akrozomální membráně dostat do kontaktu s receptory na oolemě. Tyto receptory umožní vazbu spermie na plazmatickou membránu oocyty a pravděpodobně přes ni předávají signál dovnitř oocyty, který následně spustí proces aktivace oocyty. Aktivace oocyty je definována sérií metabolických změn, které v něm nastávají (White *et al.*, 2010). Tyto morfologické a biochemické reakce jsou rozděleny mezi „časné“ a „pozdní“ procesy. Mezi časné procesy patří přechodný vzestup hladiny Ca^{2+} ,

který má za následek kortikální reakci (CR) a znovuzahájení meiózy. Exocytóza kortikálních granul je následována změnami struktury glykoproteinů ZP, které zabrání proniknutí další spermie a vzniku polyspermie. Mezi pozdní procesy aktivace oocytů patří vydělení druhého pólového tělíska, dekondenzace hlavičky spermie, přijímání maternální mRNA, formace prvojádra a zahájení syntézy a štěpení DNA (Raz a Shalgi, 1998).

Vazba spermie k plazmatické membráně oocytu navozuje uvolnění intracelulárního Ca^{2+} , které začíná od místa průniku spermie a dále se šíří přes oocyt jako vlna (Alberio *et al.*, 2001). Vápník funguje jako univerzální sekundární posel v buňkách při řízení různých biologických procesů, jako například při proliferaci, diferenciaci, apoptóze atd. Při fertilizaci hraje vápník hlavní roli a podílí se tak od samého začátku života. Spermie nepředstavuje pouze nositele genetického materiálu, ale také vyvolá vzestup hladiny intracelulárního Ca^{2+} a následně aktivuje oocyt nacházející se ve druhém meiotickém bloku (Heytens *et al.*, 2008). Počáteční zvýšení hladiny Ca^{2+} je zřejmě pro zahájení aktivace oocytu rozhodující, nicméně jako možný induktor některých aspektů aktivace oocytů se zdá být také protein kináza C (PKC) (Raz a Shalgi, 1998). Na rozdíl od ostnokožců, ryb a žab, u kterých je popsáno pouze jednorázové uvolnění vápníku, u savců (myši, křečků, potkanů, králíků, prasat, skotu a lidí) jsou pozorovány opakující se oscilace v průběhu několika hodin. První vápníková vlna pochází z místa proniknutí spermie, zatímco následné oscilace vznikají v kortikální oblasti vegetálního pólu. Vápníkové oscilace mají nízkou frekvenci. Objevují se v intervalu 6 – 31 minut u myši a 8 – 25 minut u skotu. Tento interval se postupně prodlužuje a může trvat až několik hodin, dokud není vytvořeno prvojádro. Savčí oocyt iniciuje tvorbu prvojádra 2 – 6 hodin po proniknutí spermie, v závislosti na živočišném druhu (Alberio *et al.*, 2001).

Mechanismus, kterým spermie působí zvýšení hladiny Ca^{2+} a jeho následnou oscilaci zatím není příliš jasný (Raz a Shalgi, 1998; Alberio *et al.*, 2001). Existují dvě základní hypotézy. Ta první předpokládá, že spermie interaguje s receptorem umístěným v plazmatické membráně oocytu, což má za následek aktivaci signálních drah, které vedou k aktivaci oocytu. Tento receptor je pravděpodobně spojen s GTP proteinem nebo má tyrosin kinázovou aktivitu a má tak schopnost indukovat aktivaci fosfolipázy C (PLC). PLC stimuluje hydrolýzu fosfatidylinositol4,5-bisfosfátu (PIP₂) za vzniku diacylglycerolu (DAG) a 1,4,5-inositoltrifosfátu (IP₃), které společně způsobují uvolnění Ca^{2+} (White *et al.*, 2010). DAG také

představuje aktivátor PKC. PKC je klíčovým enzymem v přenosu signálů. Úloha PKC v aktivaci savčích oocytů je doposud stále kontroverzní. Bylo však prokázáno, že PKC aktivovaná pomocí biologicky aktivních esterů forbolu v MII oocytech indukuje exocytózu kortikálních granul (CG), usnadňuje modifikaci ZP a vznik bloku proti polyspermii. Jiné studie prokázaly obnovení buněčného cyklu v oocytech ošetřených aktivátory PKC (Raz a Shalgi, 1998). Druhá hypotéza předpokládá, že do oocytu je uvolňován faktor spermie, který interaguje s neznámým cílem v cytosolu, přičemž dochází ke vzniku Ca^{2+} oscilací. Existuje celá řada důkazů, které tuto teorii podporují. Injikování spermií do křeččích a myších oocytů vyvolává podobné Ca^{2+} oscilace, jako přirozený proces oplodnění. Jako faktor spermie, který je zapojen do aktivace myších oocytů, iniciuje vznik Ca^{2+} oscilací a partenogenetický rozvoj do stádia blastocysty se ukázala být fosfolipáza C specifická pro spermie zvaná PLC ζ (White *et al.*, 2010). PLC ζ se nachází v perinukleárním prostoru spermií a katalyzuje tvorbu IP $_3$, který spouští uvolňování intracelulárního Ca^{2+} a následně indukuje Ca^{2+} oscilace v oocytu (Heytens *et al.*, 2008). Tyto výsledky naznačují, že aktivace oocytů u myši a lidí může být zprostředkována rozpustným faktorem, nezávislým na receptoru v plazmatické membráně oocytu (White *et al.*, 2010). Podle Alberia *et al.* (2001) má určitý vliv na udržení Ca^{2+} oscilací také cyklin B. Při poklesu cyklinu B dochází k ukončení oscilací, naopak pokud je stabilizovaná forma cyklinu B injikována do oocytu, oscilace vápníku pokračují donekonečna (Alberio *et al.*, 2001).

Jedním z prvních aspektů aktivace oocytu je kortikální reakce (Raz a Shalgi, 1998). Savčí kortikální granula jsou malé, kulovité orgány, ohraničené jednoduchou membránou, které se nacházejí v kortikální oblasti pod oolemou (Wassarman, 1988) a obsahují enzymy, jako jsou proteinázy a glykosidázy. Po navázání spermie a oocytu dochází k fúzi kortikálních granul s oolemou a následnému vylití jejich obsahu do perivitelinního prostoru. Obsah CG mění glykoproteiny ZP a vytváří tak blok proti navázání dalších spermií. Biochemické změny ZP, ke kterým dochází během procesu fertilizace, zatím nejsou plně objasněny. ZP $_2$ podstupuje částečnou proteolýzu a je převeden na ZP $_2$ f zatímco ZP $_3$, který působí jako primární receptor pro spermie, ztrácí schopnost vázat akrozóm intaktních spermií.

Dalším aspektem aktivace oocytu je znovuzahájení buněčného cyklu. Při aktivaci dochází k výstupu oocytu z druhého meiotického bloku, k znovuzahájení meiózy a vydělení

druhého pólového tělíska (Raz a Shalgi, 1998) Následně je haploidní genom každé z gamet obklopen vlastním jaderným obalem a vznikají dvě odlišná prvojádra (samčí a samičí), která tvoří zygotu. V prvojádrech probíhá první mitotická fáze „S“ a tvoří se od každého chromozómu dvě kopie. Po této přechodné prvojaderné fázi dochází k rozpadu prvojaderného obalu, přetrvává kondenzace chromozomů a následuje první mitotické dělení (Neill, 2006).

Druhý meiotický blok je charakteristický vysokou hladinou komplexu cyklin B/cdk1, který je známý jako MPF (Alberio *et al.*, 2001; Heytens *et al.*, 2008). MPF udržuje oocyty v metafázi II a je zřejmě také zapojen do několika hlavních znaků buněčného dělení jako je rozložení jádra, kondenzace chromozómu, přestavba cytoskeletu a pozastavení transkripční aktivity. MPF aktivita je regulována aktivitou cytotatického faktoru (CSF) (Heytens *et al.*, 2008), který se skládá alespoň ze tří proteinů: Mos, MAPk (MAP kinase) a p90^{Rsk} (Alberio *et al.*, 2001). Během druhého meiotického bloku CSF chrání MPF před destrukcí tak, že udržuje anafázi podporující komplex (APC) v neaktivním stavu. Během fertilizace musí hladina MPF klesnout natolik, aby byl oocyt schopný dokončit meiózu a zahájit zrání. Vápník aktivuje kalmodulin dependentní kinázu II (CaMKII), což je enzym, citlivý na frekvenci Ca²⁺ oscilací. CaMKII přímo aktivuje APC a také podporuje degradaci CSF. V důsledku toho dochází k uvolnění APC. Aktivace APC způsobuje pokles MPF aktivity a současně dochází k prolomení druhého meiotického bloku. Ca²⁺ oscilace zabraňují aktivitě MPF a podílí se tak na úspěšné aktivaci oocytu (Heytens *et al.*, 2008).

Partenogenetická aktivace

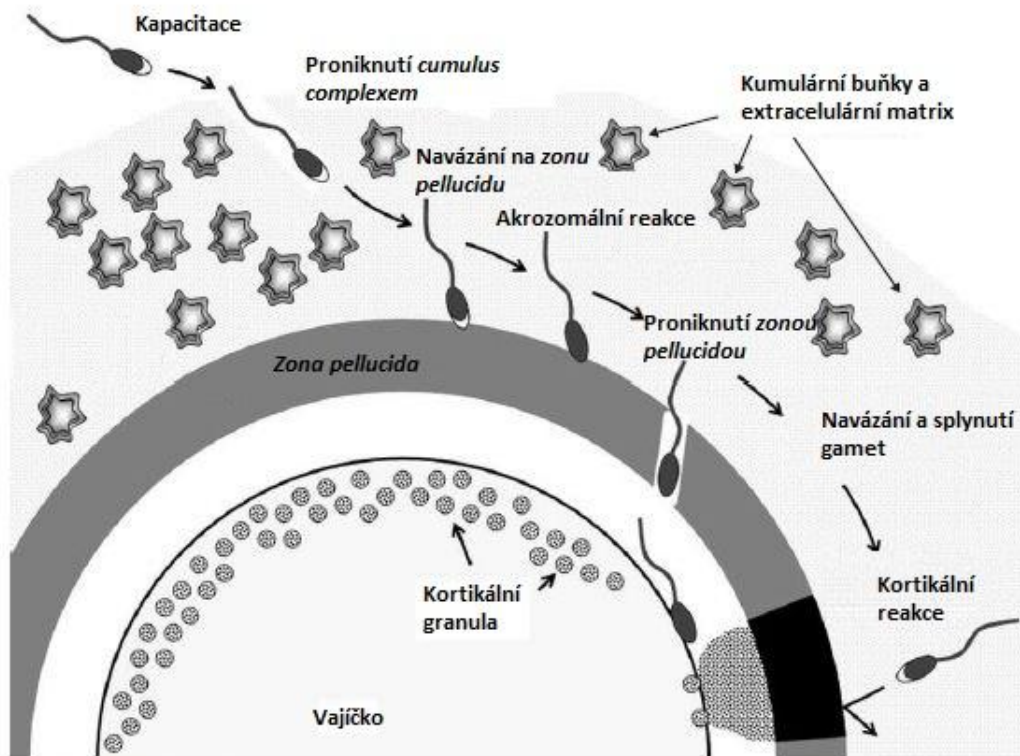
Aktivace oocytů umělými stimuly je součástí mnoha důležitých biotechnologických metod a hraje klíčovou roli během meiózy. Jak již bylo zmíněno, u většiny savců, včetně prasat, je meióza zastavena v metafázi II, přičemž další vývoj je plně závislý na aktivačním stimulu, jenž za přirozených podmínek představuje spermie vyvolávající Ca²⁺ oscilace (Procházka *et al.*, 1992; Petr *et al.*, 2000). Aktivační kompetence oocytů zahrnuje schopnost zralého oocytu podstoupit exocytózu CG, tvorbu prvojádra a dokončení meiózy. Tyto schopnosti oocyt získává v průběhu meiotického zrání, které je spojeno se zvýšením specifických molekul, které jsou do těchto procesů zapojeny, jako např. receptor IP3 (IP3R), glutathion a CaMKII (Neill, 2006). Partenogenetická aktivace savčích oocytů *in vitro*

podmínkách může být navozena prostřednictvím umělých stimulů (Wei-Hua *et al.*, 1998; Hiroyuki *et al.*, 2002), např. pomocí ethanolu (Wang *et al.*, 1998; Hiroyuki *et al.*, 2002), vápníkových ionoforů nebo elektrických pulzů (Wang *et al.*, 1998; Wei-Hua *et al.*, 1998; Hiroyuki *et al.*, 2002). Dalším stimulem, který spouští aktivaci oocytů je oxid dusnatý (NO), který představuje velmi důležitou signální molekulu (Petr *et al.* 2005). Zatímco spermie způsobuje vícenásobné zvýšení hladiny Ca^{2+} , u uměle aktivovaných oocytů bylo pozorováno pouze jednorázové zvýšení (Wei-Hua *et al.*, 1998). Účinnost umělých stimulů je závislá na živočišném druhu, složení použitého kultivačního média a na stáří oocytů (Wang *et al.*, 1998).

***In vitro* fertilizace (IVF)**

Fertilizace je proces, při kterém se spojí haploidní gamety (spermie a vajíčko) a vznikne geneticky odlišný jedinec (Ducibella, 1998; Neill, 2006). Tento proces představuje přesně uspořádaný sled buněčných interakcí, a objasnění základních mechanismů může přispět k pochopení základních buněčných procesů. Za přirozených fyziologických podmínek dochází k oplodnění obvykle v ampuli vejcovodu. Předpokládá se, že v tomto místě už má spermie za sebou kompletní kapacitaci. Oocyt je obalen ZP a vrstvami buněk *cumulus oophorus*. Těmito vrstvami musí spermie proniknout, aby se mohla spojit s oocytem (Neill, 2006).

Obr. č. 2 Interakce vajíčka a spermie



Převzato z Neill, J. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3rd Edition*. Elsevier. p. 3296. ISBN: 978-0125154000.

Navázání spermie na plazmatickou membránu oocyty spouští obnovení buněčného cyklu a exocytózu CG, která způsobuje změny ZP, jenž mají za následek vznik bloku proti polyspermii. Všechny tyto změny jsou úzce spjaty s Ca^{2+} oscilací (Wang *et al.*, 1998; Coy *et al.*, 2002) a mohou se objevit už 3 hodiny po prvním kontaktu spermie a oocyty (Coy *et al.*, 2002). Zvýšená hladina Ca^{2+} také indukuje inaktivaci MPF a CSF, které jsou nezbytné pro udržení oocyty v metafázi II. Všechny tyto události jsou nezbytné pro úspěšné oplodnění a raný vývoj embrya (Wang *et al.*, 1998). Během fertilizace dochází k typickým změnám. Ty se však mohou v *in vitro* podmínkách lišit v závislosti na složení fertilizačního média. Tekutina, ve které probíhá IVF je zcela odlišná od oviduktální tekutiny a zatím neexistuje žádné médium, které by jí plně nahradilo (Coy *et al.*, 2002). Nedávné studie ukázaly, že oviduktální tekutina způsobuje rezistenci ZP k proteolýze pomocí glykoproteinu specifického pro ovidukt (oviduct-specific glycoprotein – OVGP1), což má za následek zvýšení monospermie. Bylo prokázáno, že kokultivace embrya s oviduktálními buňkami nebo kultivace embrya *in vivo*

ve vejcovodu zvířete zvyšuje úspěšnost dalšího vývoje po IVF. Má se za to, že prostředí vejcovodu a pravděpodobně oviduktální tekutina obsahují důležité molekuly, které mají vliv na interakci spermií a vajíčka a následně na vývojovou kompetenci zygoty. Další studie prováděné mimo jiné i u prasat prokázaly, že doplnění kultivačního média o oviduktální proteiny jako je OVGP1 a derivát iC3b má za následek větší množství *in vitro* produkovaných embryí. Nicméně mechanismus, kterým tyto proteiny působí, není zatím jasný (Lloyd *et al.*, 2009). Coy *et al.* (2002) tvrdí, že koncentrace Ca^{2+} ve fertilizačním médiu představuje klíčový faktor. Nicméně i když je v médiu vysoká koncentrace Ca^{2+} , je pro IVF u prasat častá abnormální fertilizace, a to zřejmě v důsledku polyspermie. Tento problém je předmětem mnoha studií (Coy *et al.*, 2002).

Savčí oocyty, stejně jako embrya, jsou pro každý druh specifická. Prasečí oocyty se vyznačují vysokým obsahem lipidů, uložených převážně ve formě lipidových kapiček v cytoplasmě, což má negativní vliv na jejich manipulaci. Díky tomu jsou biotechnologické postupy u prasat mnohem méně pokročilé, než u skotu (Gajda, 2009). IVF představuje stále kritický faktor, protože dosud nebyla vyřešena otázka polyspermie (Romar *et al.*, 2016). Ta u prasat představuje zvláště významný problém. Jedním z faktorů, který má zřejmě vliv na polyspermii je *in vitro* zrání oocytů. Bylo prokázáno, že mnohem méně oocytů zrajících v *in vitro* podmínkách se vyvinulo do stádia blastocysty ve srovnání s oocyty, zrajícími v *in vivo* podmínkách (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014). I přes všechna zlepšení, kterých bylo dosaženo v posledních deseti letech, stávající IVF systémy stěží dosahují 50 – 60 % úspěšnosti. Jakýkoliv pokrok v technologiích asistované reprodukce (ART) vyžaduje zlepšení míry monospermie. Je nezbytné zjistit mechanismy, které působí za fyziologických podmínek *in vivo* a přenést tyto znalosti do ART (Romar *et al.*, 2016).

3.2 Oxid dusnatý

3.2.1 Vlastnosti a syntéza oxidu dusnatého (NO)

Oxid dusnatý (NO) je nepolární dvouatomová molekula volného plynu, která dokáže volně pronikat skrz membrány buněk. Při laboratorní teplotě a tlaku se jedná o bezbarvý plyn, jehož maximální rozpustnost ve vodě je podobná rozpustnosti čistého kyslíku (Dixit a Parvizi, 2001), je velmi nestabilní a má krátký poločas rozpadu (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014). Na rozdíl od uhlíku nebo kyslíku nemá NO tendenci při standardní teplotě a tlaku dimerizovat. U zvířat plní funkci důležitého biologického posla (Dixit a Parvizi, 2001) a hraje důležitou roli v intracelulární a extracelulární signalizaci (Petr *et al.* 2005). Na rozdíl od jiných molekul, jejichž signální mechanismy a biologické účinky byly studovány po mnoho let, procesy NO signalizace začaly být intenzivně studovány teprve v posledních letech (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014). Přenos signálu pomocí plynu, který je produkován jednou buňkou, proniká skrz membrány a reguluje funkci ostatních buněk, představuje nový princip pro signalizaci v biologických systémech (Dixit a Parvizi, 2001).

Oxid dusnatý je syntetizován v různých buňkách z molekulárního kyslíku a L-argininu (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014) pomocí katalytického působení enzymu syntázy oxidu dusnatého (NOS) (Bu *et al.*, 2003; Kupková a Beneš, 2004; Petr *et al.*, 2005; Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014) za vzniku citrulinu a nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADP+) (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014). NOS byla poprvé lokalizována ve vaskulárním endotelu, mozku a v makrofázích. Na základě toho byly klasifikovány tři izoformy v závislosti na tkáni původu a dle funkčních a strukturálních vlastností (Dixit a Parvizi, 2001).

- Neuronová konstitutivní NO-syntáza (NOS I nebo nNOS)
- Endoteliální konstitutivní NO-syntáza (NOS III nebo eNOS)
- Indukovatelná NO-syntáza (NOS II nebo iNOS); Dixit a Parvizi, 2001; Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014)

3.2.2 NOS izoformy

Jednotlivé izoformy se od sebe liší svojí funkcí, lokalizací, kinetikou a způsobem aktivace (Kupková a Beneš, 2004). Mohou se nacházet v různých typech buněk a tkání a zároveň jedna buňka může exprimovat více než pouze jednu izoformu (Dixit a Parvizi, 2001; Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014).

Neuronová konstitutivní NO-syntáza (NOS I nebo nNOS)

Tato izoforma je závislá na Ca^{2+} a kalmodulinu a je ve zvýšené míře exprimována v mozku. Kromě nervového systému byla nNOS identifikována také v kosterní svalovině, v pankreatických β -buňkách, v samčích pohlavních orgánech, v hypofýze, v dřeni nadledvin, v *macula densa* a nefronech ledvin. Gen nNOS se skládá z 29 exonů a 28 intronů a kóduje protein z 1434 aminokyselin (Dixit a Parvizi, 2001).

Endoteliální konstitutivní NO-syntáza (NOS III nebo eNOS)

Zdá se, že eNOS je funkčně podobná nNOS. Také je konstitutivní a závislá na hladině Ca^{2+} a na kalmodulinu. eNOS je převážně exprimována v buňkách cévního endotelu, ale také v pyramidových neuronech hipokampu, v syncytiotrofoblastu a v krevních destičkách (Dixit a Parvizi, 2001). Hattori a Tabata (2006) lokalizovali eNOS v oocytech primordiálních folikulů, ale také ve zralých folikulech (Hattori a Tabata, 2006). eNOS obsahuje 26 exonů a 25 intronů, kódujících protein z 1203 aminokyselin (Dixit a Parvizi, 2001).

Konstitutivně exprimovaná NOS neobsahuje vázaný kalmodulin, v přítomnosti Ca^{2+} dochází k aktivaci enzymu, který katalyzuje produkci NO během několika sekund v reakci na různé stimuly (Dixit a Parvizi, 2001). Tato izoforma je zodpovědná za nepřetržité uvolňování NO (Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014) a je exprimována za různých fyziologických podmínek, například při hemodynamickém stresu nebo při poranění nervů (Hattori a Tabata, 2006).

Indukovatelná NO-syntáza (NOS II nebo iNOS)

Tato izoforma je exprimována v mnoha typech buněk v reakci na zánětlivé cytokiny a lipopolysacharidy (Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014). iNOS je nezávislá na Ca^{2+}

a kalmodulinu a je schopna vytrvale syntetizovat 100 až 1000 krát větší množství NO než konstitutivní izoformy přibližně hodinu po vystavení vyvolávajícímu podnětu. iNOS obsahuje kalmodulin tak pevně vázaný, že je považován spíše za její podjednotku, než za kofaktor (Dixit a Parvizi, 2001; Hattori a Tabata, 2006). Gen pro iNOS se skládá z 26 exonů a 25 intronů, kódujících protein z 1153 aminokyselin (Dixit a Parvizi, 2001).

3.2.3 Struktura izoformem

Všechny tři izoformy NOS vykazují bidomérovou strukturu (Alderton *et al.*, 2001) to znamená, že se skládají ze dvou stejných monomerů a jsou funkčně rozděleny do dvou hlavních domén (oblastí) – N-terminální oxidázovou doménu a C-terminální reduktázovou doménu (Hattori a Tabata, 2006). N-terminální oxidázová doména obsahuje vazebná místa pro hem, BH₄ a L-arginin (Groves a Wang, 2000; Alderton *et al.*, 2001; Hattori a Tabata, 2006). Hem skupina, připomínající cytochrom P450, představuje reaktivní centrum oxidační reakce (Groves a Wang, 2000). C-terminální reduktázová doména obsahuje vazebná místa pro redoxní kofaktory nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD) (Groves a Wang, 2000; Alderton *et al.*, 2001; Hattori a Tabata, 2006) a přenáší elektrony z NADPH na hem (Hattori a Tabata, 2006). Obě domény jsou spojeny přes místo rozpoznávající kalmodulin (CaM) (Alderton *et al.*, 2001).

3.2.4 Význam NO v organismu

NO je důležitá signální molekula, která v organismu plní rozličné funkce (Dixit a Parvizi, 2001). Pozitivní vliv má na kardiovaskulární systém. Podílí se na vazodilataci hladké svaloviny prostřednictvím cyklického guanosin-mono-fosfátu (cGMP) a cGMP dependentní protein kinázy. Účastní se také nespecifické imunity, kdy zasahuje především proti virům, bakteriím a nádorům. V centrálním nervovém systému plní funkci buněčného posla. Nadbytek NO má však neurotoxické účinky, které jsou způsobené jeho reakcí se superoxidem za vzniku toxického peroxodisitanu. V důsledku této reakce může dojít k poškození DNA a apoptóze (Kupková a Beneš, 2004). Dixit a Parvizi (2001) uvádí, že NO napomáhá také samčímu kopulačnímu chování (Dixit a Parvizi, 2001) a má vliv i na životaschopnost a motilitu spermií (Revelli *et al.*, 2001).

3.2.5 Role NO v reprodukci samic

NO je zapojen do mnoha fyziologických procesů, včetně reprodukce (Petr *et al.* 2005; Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014). Ovlivňuje regulaci sekrece gonadotropinů a to jak na úrovni hypotalamu, tak na úrovni hypofýzy. NO stimuluje sekreci gonadotropiny uvolňujícího hormonu (gonadotropin-releasing hormone – GnRH) pomocí enzymu obsahující hem – guanylátcyklázy. Jak bylo zjištěno, nitroprusid sodný (SNP), jakožto donor NO, může stimulovat sekreci GnRH z hypotalamu. Dále se NO podílí na regulaci hladiny LH, navíc stimulací hormonu uvolňujícího LH (LH-releasing hormon – LHRH) zprostředkovává sexuální chování u samic potkanů (Dixit a Parvizi, 2001). NO zasahuje také do procesu aktivace savčích oocytů (Petr *et al.* 2005). Jak uvádí Petr *et al.* (2010) NO je schopný indukovat partenogenetickou aktivaci. Mechanismy, kterými NO ovlivňuje aktivaci savčích oocytů, zatím nejsou zcela objasněny. Zdá se ale, že NO nepředstavuje primární stimul pro aktivaci oocytů. U mořských ježků a myši bylo prokázáno, že prudký nárůst intracelulárních vápenatých iontů nastal ještě před jakýmkoliv zvýšením hladiny NO (Petr *et al.*, 2010). Dixit a Parvizi (2010) uvádí, že NO působí jako důležitý mediátor v procesu ovulace prostřednictvím jeho stimulačního účinku na sekreci prostaglandinu. Aminoguanidin (AG), specifický inhibitor iNOS, způsobuje inhibici ovulace z 50 %. Tento inhibiční účinek AG byl kompletně odstraněn pomocí donoru NO – nitroprusidu sodného (Dixit a Parvizi, 2001).

NO hraje v reprodukci dvojí roli a to v závislosti na jeho koncentraci. Při nízkých koncentracích stimuluje časně reprodukční procesy. Nadbytek ale i nedostatek NO však mají negativní důsledky. U savčích oocytů, v podmínkách *in vitro*, bylo zjištěno, že vysoká koncentrace NO inhibuje meiotické zrání, způsobuje oxidační stres a apoptózu. Nízká koncentrace naopak chrání před oxidačním stresem, stimuluje meiotické zrání v *in vitro* podmínkách a prodlužuje časový interval, který je optimální pro fertilizaci (Tichovská *et al.*, 2011; Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014).

V samičím reprodukčním ústrojí byly lokalizovány všechny tři izoformy NOS (Bu *et al.*, 2003; Romero-Aguirregomezcorra *et al.*, 2014), nNOS a eNOS byly lokalizovány na povrchu epitelu, v buňkách stromatu, oocytech, thekálních buňkách a v endoteliálních buňkách cév. iNOS byla lokalizována na povrchu epitelu, v oocytech a v buňkách mnohvrstevných

a antrálních folikulů (Kim *et al.*, 2001). Zdá se, že zde funguje určitý intraovariální systém, generující NO. Izoformy NOS jsou regulovány gonadotropiny. U potkanů bylo zjištěno, že aktivita a produkce eNOS a iNOS se v průběhu ovariálního cyklu mění. mRNA iNOS roste během rané fáze proestru. K počátečnímu zvýšení exprese proteinu iNOS dochází během pozdní fáze proestru, která je doprovázena preovulačním zvýšením hladiny estradiolu a LH. Poté exprese iNOS klesá. Přítomnost proteinu eNOS byla zjištěna během preovulační fáze. Cyklické změny v expresi jednotlivých izoform NOS ve vaječniku podporují hypotézu, že NO přímo ovlivňuje ovariální funkci (Dixit a Parvizi, 2001). Myši s vyblokováním eNOS genu vykazují výrazně slabší ovulaci (o 63 %) a je u nich zpožděno meiotické zrání oocytů, přičemž oocyty jsou zastaveny v MI fázi. U samic s vyblokováním nNOS genu nebyla zaznamenána žádná změna. Zdá se, že do produkce NO ve vaječnících je zapojena primárně eNOS, která je také zodpovědná za zprostředkování procesů, vedoucích k ovulaci (Dixit a Parvizi, 2001).

3.2.6 Význam NO v reprodukčních biotechnologiích

V současné době se v chovu hospodářských zvířat významně rozvíjí reprodukční biotechnologie a to především oplodnění *in vitro*, klonování pomocí přenosu jader, produkce transgenních zvířat či přenos embryí. Biotechnologie u prasat postupují pomalu a jejich účinnost je zatím stále nízká. Vzhledem k tomu, že prasata se využívají nejen jako hospodářská zvířata, ale představují také významný biomedicínský model, je třeba zvýšit účinnost biotechnologických metod používaných u těchto živočichů. Klíčovým faktorem je používání plně dorostlých oocytů s meiotickou kompetencí, které jsou schopny absolvovat meiotické zrání až do MII fáze (Tichovská *et al.*, 2011). Proto se stále zvyšuje poptávka po dostatečném množství kvalitních oocytů (Nevoral *et al.*, 2013).

Úloha NOS a NO ve fyziologických procesech byla studována různými metodami, například pomocí genového knockoutu nebo NOS inhibitorů (Nevoral *et al.*, 2013). Tichovská *et al.* (2011) zjistili, že NOS inhibitory aminoguanidin a nespecifický inhibitor N^w-nitro-L-arginin metylester (L-NAME) blokuje meiotické zrání hned na počátku, u oocytů s částečnou nebo plnou meiotickou kompetencí. Dále se ukázalo, že velké množství NO, přidané do *in vitro* kultivačního média narušuje životaschopnost oocytů. Tyto experimenty tedy potvrdily spojení NO s obdobím růstu oocytů a se schopností získat meiotickou

kompetenci. Je ale jasné, že NO není jediný stimul, který reguluje růstovou fází (Tichovská *et al.*, 2011). Kromě růstové fáze má NO klíčovou roli i během zrání oocytů. Nedostatek NO vede k narušení zrání oocytů *in vitro* i *in vivo*, které se projevuje zpomalením rozpadu zárodečného váčku, sníženým počtem oocytů schopných dosáhnout metafáze II a nevydělením prvního pólového tělíška (Bu *et al.*, 2003; Jablonka-Shariff a Olson, 1998; 2000; Tao *et al.*, 2004). Pro *in vitro* zrání prasečích oocytů je nezbytná aktivita iNOS (Romero-Aguirregomezcorta *et al.*, 2014). NO jako součást mikroprostředí oddaluje stárnutí oocytů, a tím snižuje polyspermii (Miao *et al.*, 2009). Přídavek donorů NO a ani inhibitorů NOS do kultivačního média během zrání oocytů však nezvyšuje účinnost IVF u prasat (Romero-Aguirregomezcorta *et al.*, 2014). Inhibitory L-NAME a aminoguanidin dokážou navíc potlačit programovanou smrt i lýzu oocytů. Pro potvrzení úlohy NO jsou však nezbytné další experimenty (Nevoral *et al.*, 2013).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Odběr vaječníků

Vaječníky byly odebírány od šesti měsíčních hybridních prasniček (Bílé ušlechtilé x Landrace) o jateční hmotnosti 110 kg, které byly poráženy na jatkách v neznámé fázi pohlavního cyklu. Během jedné hodiny po porážce byly vaječníky převezeny do laboratoře ve fyziologickém roztoku (0,9% chlorid sodný) o teplotě 38°C, která byla zajištěna pomocí vytemperované termoláhve. V laboratoři pak byly vaječníky propláchnuty v čistém fyziologickém roztoku, také o teplotě 38°C.

4.1.2 Získání plně meioticky kompetentních oocytů

Aspirací folikulární tekutiny z folikulů o velikosti 2 až 5 milimetrů byly získávány plně meioticky kompetentní oocyty o velikosti vnitřního průměru 120 – 125 μm . Aspirace byla prováděna pomocí 20 G jehly, která byla spojena s 20 ml stříkačkou. Následně byly oocyty pod stereomikroskopem přenášeny do modifikovaného média M199 pomocí skleněné kapiláry. Médium M199 bylo obohaceno o laktát vápenatý (0,06 mg/ml), pyruvát sodný (0,25 mg/ml), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), a 10 % fetální telecí sérum. Pro další experiment byly vybrány pouze ty oocyty, které měly kompaktní vrstvu kumulárních buněk a homogenní cytoplazmu.

4.2 Metody

4.2.1 *In vitro* kultivace oocytů

Vybrané oocyty byly před kultivací nejprve třikrát propláchnuty v kultivačním médiu M199 a poté byly kultivovány ve čtyř-jamkových miskách NUNC, obsahující 1 ml modifikovaného média M199 s přidavkem 13,5 IU equinního choriového gonadotropinu: 6.6 IU humánního choriového gonadotropinu/ml (P.G. 600) při teplotě 39 °C a 5 % CO₂. Kultivace probíhala po dobu 46 hodin do stádia metafáze druhého meiotického dělení (MII). Oocyty použité pro kontrolu zrání byly po dobu 24 hodin fixovány v roztoku kyseliny octové a etanolu (poměr 1:3). Poté byly oocyty barveny 1 % orceinem a pod fázovým mikroskopem bylo hodnoceno stádium jaderného zrání. Do experimentu byly oocyty zařazeny pouze v případě, že alespoň 85 % z kontrolní skupiny zrání dosáhlo požadované MII fáze. Navíc bylo u oocytů kontrolováno vydělení prvního pólového tělíska pod stereomikroskopem.

4.2.2 Partenogenetická aktivace oocytů

In vitro zralé oocyty byly zbaveny kumulárních buněk pomocí tenkostěnné skleněné pipety a poté byly aktivovány ošetřením oocytů 25 μM kalcium ionoforem A 23187 po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byly oocyty třikrát opláchnuty v kultivačním médiu a kultivovány po dobu 18 – 20 hodin do stádia prvojader.

4.2.3 *In vitro* fertilizace

4.2.3.1 Příprava spermií

Pro *in vitro* fertilizaci byly používány inseminační dávky od kanců plemene Landrace s ověřenou plodností. Za účelem selekce živých spermií byl použit sloupcový gradient Percoll, který byl připraven z 2 ml 90 % Percollu (Tabulka č. 1), 2 ml 45 % roztoku Percollu vzniklého ředěním 90 % Percollu v BTS (Tabulka č. 2) v poměru 1:1 a 0,5 ml semene. Tento sloupcový gradient byl centrifugován při 2100 otáčkách za minutu, po dobu 30 minut, za účelem získat sediment s živými spermii. Poté byl tento sediment zředěn 5 ml TALP média (Tabulka č. 3) a znovu centrifugován při 2100 otáčkách za minutu, po dobu 10 minut, aby se odstranily zbytky Percollu a došlo ke kapacitaci spermií kofeinem obsaženým v médiu TALP. Vzniklý

sediment byl opět zředěn 1 ml čerstvého média TALP a z tohoto vzorku byla spočítána koncentrace spermií a hodnocena jejich pohyblivost. Pro experiment byly použity pouze vzorky, v nichž měly spermie vyšší pohyblivost, než 3 (v hodnocení na subjektivním žebříčku 0-5).

Tab. 1 Složení 90 % roztoku Percollu

Složka	Koncentrace (mM)
NaCl	0,97
HEPES	0,1
KCl	1
NaH ₂ PO ₄	0,1
NaHCO ₃	0,15
CaCl ₂	1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1
laktát sodný	0,001
Percoll	90 ml

Tab. 2 Složení ředidla BTS (Beltsville Thawing Solution)

Složka	Koncentrace (mM)
glukóza	0,0002
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	3,36
NaHCO ₃	15
citrát sodný	20
KCl	5

Tab. 3 Složení média TALP

Složka	g/100 ml redestilované H ₂ O
NaCl	0,666
KCl	0,024
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,01
laktát sodný	0,24 ml
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,0048
glukóza	0,09
NaHCO ₃	0,21
kofein	0,0388
laktát vápenatý.5H ₂ O	0,2466
polyvinylalkohol (PVA)	0,1
kanamycin	0,01
fenolová červeň	0,0001

4.2.3.2 *In vitro* fertilizace

In vitro zralé oocyty byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk a opláchnuty v médiu TALP, které bylo obohaceno o 3 mg/ml bovinního sérového albuminu a 0,12 mg/ml pyruvátu sodného. Opláchnuté oocyty byly přeneseny do 500 µl média TALP ve čtyř-jamkové misce NUNC a byly k nim přidány kapacitované spermie o koncentraci 1×10^6 spermií/ml. Společná kultivace spermií s oocyty trvala 20 – 30 minut v závislosti na rychlosti vazby spermií na vrstvu *zona pellucida* oocytů. Následně byly oocyty opláchnuty od nenavázaných spermií a kultivovány po dobu 18 – 20 hodin do stádia prvojader (zygoty).

4.2.4 Lokalizace izoforem NOS imunocytochemickým barvením oocytů

Oocyty, byly nejprve mechanicky zbaveny kumulárních buněk a pomocí 0,1 % pronázy i *zony pellucidy*. Poté byly fixovány v 2,5 % paraformaldehydu v BPS po dobu 60 minut

při laboratorní teplotě. Fixované oocyty byly nejprve dvě hodiny permeabilizovány pomocí 0,5 % Tritonu X-100 v PBS, poté byly krátce opláchnuty v 0,1 % Tweenu 20 v BPS a následně byly přes noc inkubovány v inkubačním médiu, při teplotě 4 °C. Inkubační médium obsahovalo 0,1 % BSA a 0,01 % Tweenu 20 v PBS spolu s primární protilátkou králičí anti-NOS, která byla ředěna v poměru 1:100. Další den byly oocyty při laboratorní teplotě promyty v roztoku 0,1 % Tweenu 20 v BPS, aby se odstranily zbytky nenavázané protilátky a opět inkubovány v inkubačním médiu se sekundární protilátkou anti-králičí IgG konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC). Inkubace probíhala jednu hodinu ve tmě při laboratorní teplotě. Takto kultivované oocyty byly ještě několikrát promyty v roztoku 0,1 % Tweenu 20 v PBS a poté v roztoku 0,1 % BSA v PBS po dobu 10 minut. Opláchnuté oocyty byly barveny barvivem Hoechst 33258 za účelem vizualizace chromatinu a opláchnuty v ekvilibračním pufru. Následně byly oocyty připevněny na podložní sklíčko v kapce glycerolu v BPS. Kontrolní skupina oocytů byla ošetřena stejně, pouze při první inkubaci nebyla do inkubačního média přidána primární protilátka.

4.2.5 Vyhodnocení experimentu

Oocyty byly pozorovány pod laserovým konfokálním mikroskopem (Leica SPE, Německo). Fluorescence FITC byla stanovena při emisní vlnové délce 520 nm. Laser byl nastaven konzistentně pro všechny analyzované vzorky. Fluorescence barviva Hoechst 33258 byla stanovena při emisní vlnové délce 410 nm.

Snímky z konfokálního mikroskopu byly hodnoceny pomocí programu analýzy obrazu (NIS Elements 2003, Laboratory Imaging, Česká republika). Průměrná intenzita signálu FITC byla měřena v oblasti prvojádra, cytoplazmy a korové oblasti oocytu či zygoty. U oocytů, které byly v metafázi II, se měřila intenzita fluorescence v oblasti meiotického vřeténka místo oblasti prvojádra. Data z každé měřené oblasti oocytu byla porovnávána s intenzitou fluorescence FITC v celém oocytu a tak byla stanovena relativní intenzita fluorescence pro jednotlivé oblasti.

Získaná data byla analyzována pomocí neparametrického testu ANOVA v programu Statistica, verze 12,0. Za statisticky významnou byla považována hodnota P nižší než 0,05.

4.3 Experimentální schéma

Pro zjištění vlivu způsobu aktivace na intracelulární distribuci izoform NOS byly oocyty rozděleny do tří experimentálních skupin dle vývojového stádia či způsobu aktivace:

1. 46 hodin kultivace *in vitro* (metafáze II)
2. 18 – 20 hodin po partenogenetické aktivaci
3. 18 – 20 hodin po IVF (zygoty)

V každé experimentální skupině byly následně nepřímou imunofluorescencí lokalizovány jednotlivé izoformy nNOS, eNOS a iNOS. Průměrný počet oocytů ve skupině byl 25 minimálně však 8 oocytů.

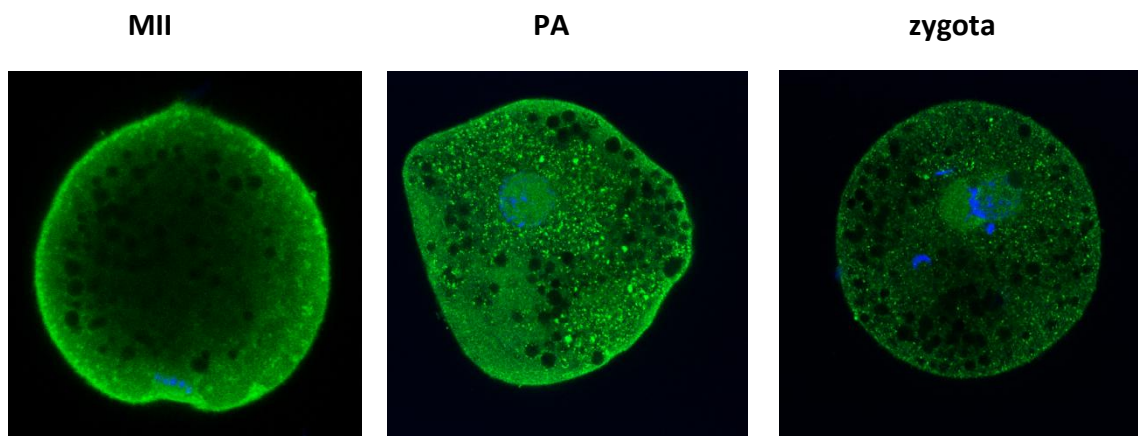
5 Výsledky

Cílem diplomové práce bylo lokalizovat jednotlivé izoformy NOS (nNOS, eNOS a iNOS) v prasečích oocytech a zjistit, zda způsob aktivace oocyty ovlivňuje jejich intracelulární distribuci. Pomocí imunocytochemického barvení byly lokalizovány všechny tři izoformy NOS ve zralých i v aktivovaných oocytech. Vliv způsobu aktivace na intracelulární distribuci jednotlivých izoform NOS nebyl prokázán.

Izoforma nNOS

Fluorescenční signál nNOS byl zaznamenán u oocytů v MII fázi zejména v korové oblasti oocyty (Obrázek č. 3). Po aktivaci oocyty fluorescence nNOS výrazně vzrostla a to zejména v cytoplazmě v okolí prvojader. V prvojádrech byla nNOS také lokalizována kromě oblasti jadérek, kde imunofluorescenční signál zaznamenán nebyl. Ani u jedné z pozorovaných oblastí však nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v intenzitě fluorescence mezi partenogeneticky aktivovanými oocyty a oocyty, jež byly *in vitro* fertilizovány (Tabulka č. 4).

Obr. č. 3 Intracelulární lokalizace izoformy nNOS ve zralých, v partenogeneticky aktivovaných a *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech



nNOS izoforma byla lokalizována nepřímou imunofluorescencí pomocí anti-nNOS protilátky v prasečích oocytech ve stádiu MII, v partenogeneticky aktivovaných prasečích oocytech (PA) a v *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech (zygota). Zeleně je označen protein pomocí FITC, modře je označen chromatin pomocí barviva Hoechst 33258. Oocyty byly snímány v rovině meiotického vřeténka nebo prvojádra při 400x zvětšení.

Tabulka č. 4 Relativní intenzita fluorescence nNOS ve zralých a v *in vitro* aktivovaných prasečích oocytech

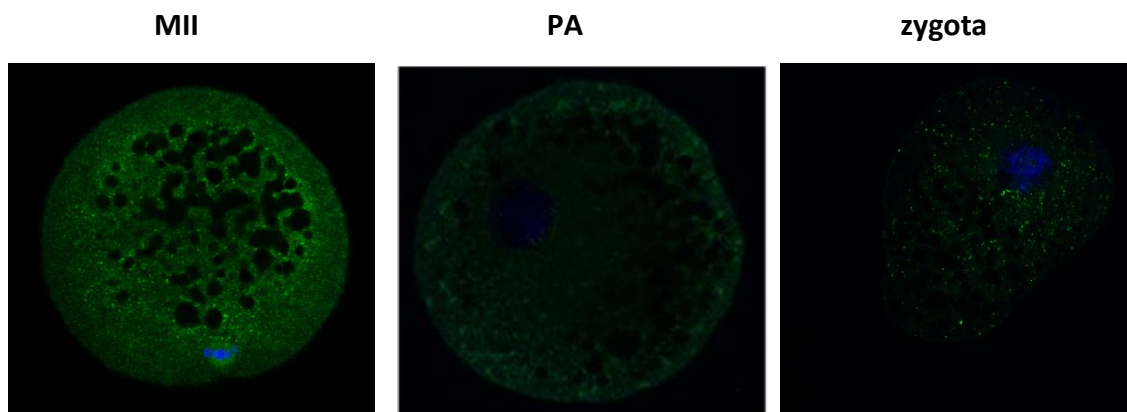
Skupina	N	oblast		
		prvojádra/meiotického vřeténka	korová oblast	cytoplazma
MII	20	0,89 ± 0,08 ^{aA}	1,15 ± 0,05 ^B	0,99 ± 0,09 ^A
PA	49	1,01 ± 0,09 ^b	1,02 ± 0,09	0,97 ± 0,05
zygota	25	1,06 ± 0,17 ^b	1,03 ± 0,14	0,91 ± 0,11

MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení; PA = partenogeneticky aktivované oocyty; N = počet hodnocených oocytů. Data jsou uváděna jako průměr ± směrodatná odchylka. Významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi jednotlivými skupinami oocytů (MII, PA, zygota) (sloupce) jsou označeny rozdílnými písmennými superskripty ^{a,b} a mezi jednotlivými oblastmi oocytu (oblast prvojádra/meiotického vřeténka, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých vývojových stádiích oocytu (řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty ^{A,B}.

Izoforna eNOS

Oocyty v MII fázi vykazovaly nejvyšší fluorescenční signál eNOS v cytoplazmě a v oblasti meiotického vřeténka. Po aktivaci oocytu došlo k výraznému poklesu fluorescence (Obrázek č. 4). Oocyty, jež byly aktivovány partenogeneticky, však vykazovaly signifikantně vyšší intenzitu fluorescence v korové oblasti, než oocyty, které byly aktivovány spermií během *in vitro* fertilizace (Tabulka č. 5). Fluorescence eNOS v oblasti prvojádra a v cytoplazmě nevykazovala statisticky významný rozdíl mezi partenogeneticky aktivovanými oocyty a zygotami.

Obr. č. 4 Intracelulární lokalizace izoformy eNOS ve zralých, v partenogeneticky aktivovaných a *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech



eNOS izoforma byla lokalizována nepřímou imunofluorescencí pomocí anti-eNOS protilátky v prasečích oocytech ve stádiu MII, v partenogeneticky aktivovaných prasečích oocytech (PA) a v *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech (zygota). Zeleně je označen protein pomocí FITC, modře je označen chromatin pomocí barviva Hoechst 33258. Oocyty byly snímány v rovině meiotického vřeténka nebo prvojádra při 400x zvětšení.

Tabulka č. 5 Relativní intenzita fluorescence eNOS ve zralých a v *in vitro* aktivovaných prasečích oocytech

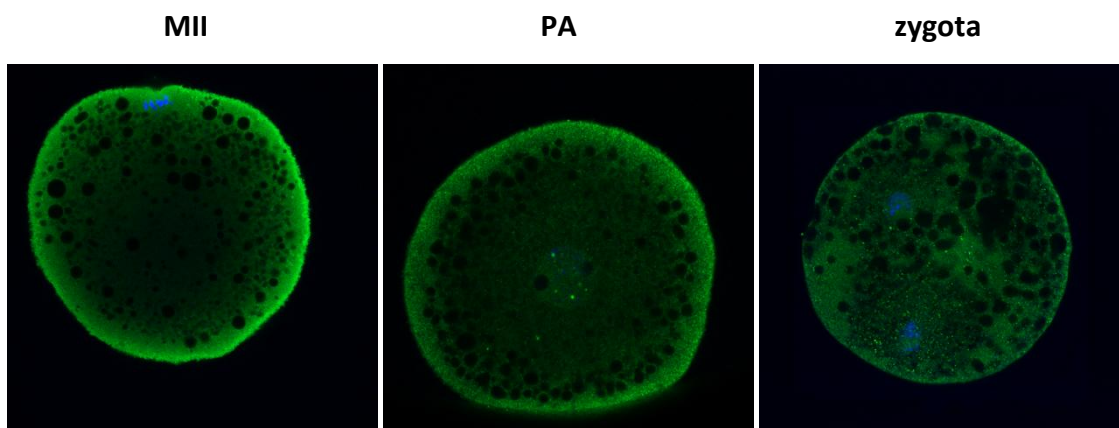
Skupina	N	oblast		
		prvojádra/meiotického vřeténka	korová oblast	cytoplazma
MII	27	1,01 ± 0,17 ^a	0,86 ± 0,33 ^{ab}	1,13 ± 0,19
PA	8	0,57 ± 0,48 ^{bA}	1,19 ± 0,24 ^{bAB}	1,24 ± 0,26 ^B
zygota	13	0,99 ± 0,48 ^{abAB}	0,46 ± 0,47 ^{aA}	1,55 ± 0,69 ^B

MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení; PA = partenogeneticky aktivované oocyty; N = počet hodnocených oocytů. Data jsou uváděna jako průměr ± směrodatná odchylka. Významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi jednotlivými skupinami oocytů (MII, PA, zygota) (sloupce) jsou označeny rozdílnými písmennými superskripty^{a,b} a mezi jednotlivými oblastmi oocytu (oblast prvojádra/meiotického vřeténka, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých vývojových stádiích oocytu (řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty^{A,B}

Izoforma iNOS

Izoforma iNOS byla lokalizována převážně v korové oblasti oocytů v MII fázi. Po aktivaci nadále přetrvávala nejvyšší intenzita fluorescence iNOS v korové oblasti, a to jak u partenogeneticky aktivovaných oocytů, tak u zygot (Obrázek č. 5). Stejně jako v případě nNOS nebyla iNOS pozorována v oblasti jadérek. Vyšší fluorescenční signál iNOS byl zaznamenán v cytoplazmě v okolí prvojader. Rozdíly v intenzitě fluorescence iNOS mezi partenogeneticky aktivovanými oocyty a zygotami však nebyly statisticky významné (Tabulka č. 6).

Obr. č. 5 Intracelulární lokalizace izoformy iNOS ve zralých, v partenogeneticky aktivovaných a *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech



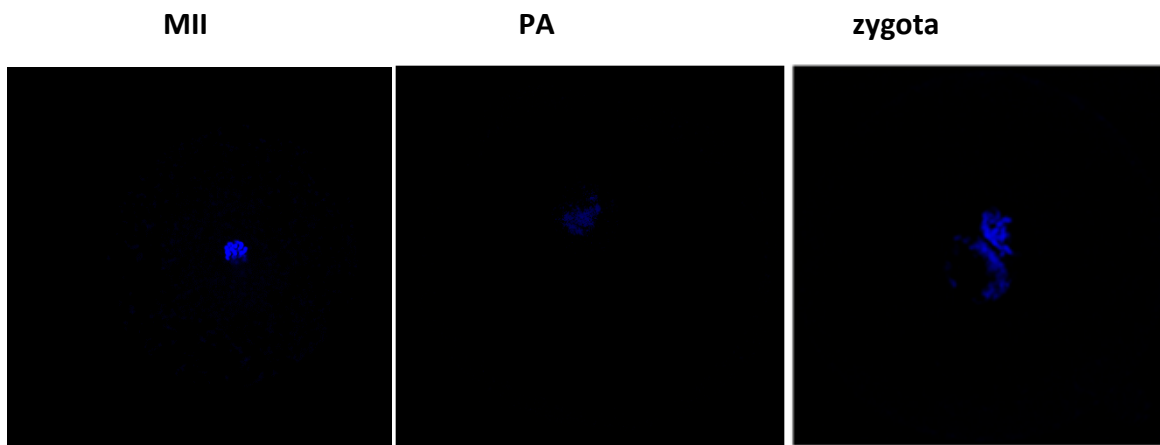
iNOS izoforma byla lokalizována nepřímou imunofluorescencí pomocí anti-iNOS protilátky v prasečích oocytech ve stádiu MII, v partenogeneticky aktivovaných prasečích oocytech (PA) a v *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech (zygota). Zeleně je označen protein pomocí FITC, modře je označen chromatin pomocí barviva Hoechst 33258. Oocyty byly snímány v rovině meiotického vřeténka nebo prvojádra při 400x zvětšení.

Tabulka č. 6 Relativní intenzita fluorescence eNOS ve zralých a v *in vitro* aktivovaných prasečích oocytech

Skupina	N	oblast		
		prvojádra/meiotického vřeténka	korová oblast	cytoplazma
MII	25	0,74 ± 0,33 ^A	1,32 ± 0,25 ^B	0,94 ± 0,12 ^{AB}
PA	28	0,92 ± 0,17 ^A	1,18 ± 0,17 ^B	0,90 ± 0,08 ^A
zygota	9	0,64 ± 0,18 ^A	1,28 ± 0,24 ^B	1,08 ± 0,19 ^B

MII = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení; PA = partenogeneticky aktivované oocyty; N = počet hodnocených oocytů. Data jsou uváděna jako průměr ± směrodatná odchylka. Významné rozdíly ($P < 0.05$) mezi jednotlivými skupinami oocytů (MII, PA, zygota) (sloupce) jsou označeny rozdílnými písmennými superskripty^{a,b} a mezi jednotlivými oblastmi oocytu (oblast prvojádra/meiotického vřeténka, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých vývojových stádiích oocytu (řádky) jsou označeny odlišnými písmennými superskripty^{A,B}

Obr. č. 6 Kontrola intracelulární lokalizace NOS ve zralých, v partenogeneticky aktivovaných a *in vitro* fertilizovaných prasečích oocytech



Oocyty v kontrolní skupině nebyly narozdíl od oocytů v experimentálních skupinách inkubovány s primární protilátkou, ale pouze s protilátkou sekundární konjugovanou s FITC. MII = oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení; PA = partenogeneticky aktivované oocyty. Modře je označen chromatin pomocí barviva Hoechst 33258. Oocyty byly snímány v rovině meiotického vřeténka nebo prvojádra při 400x zvětšení.

6 Diskuze

V této práci byly lokalizovány všechny tři izoformy NOS ve zralých a v aktivovaných oocytech prasete. Pro zjištění, zda během aktivace dochází k intracelulární redistribuci izoform NOS, byla lokalizace jednotlivých izoform zjišťována též v oocytech nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení. Fluorescenční signál izoform nNOS a iNOS byl zaznamenán zejména v korové oblasti oocyty. Oxid dusnatý, který je produkován iNOS, je důležitý pro expanzi kumulu a meiotické zrání oocyty (Tao *et al.*, 2005). V experimentech s myšimi oocyty došlo k zablokování rozpadu zárodečného váčku a vydělení pólového tělíska po ošetření aminoguanidinem, inhibítorem specifickým pro iNOS (Tao *et al.*, 2004). Isoforma eNOS byla zaznamenána v cytoplazmě a v meiotickém vřeténku prasečích oocytů nacházejících se ve stádiu metafáze II. Huo *et al.* (2005) naopak pozoroval okolo seřazených chromozómů v metafázi I a II akumulaci izoformy iNOS.

Prasečí oocyty po partenogenetické aktivaci, ale i po aktivaci oocyty spermií během *in vitro* fertilizace, vykazovaly změnu distribuce jednotlivých izoform NOS. Role NO v procesu aktivace prasečích oocytů byla již předtím prokázána experimenty, kdy *in vitro* zralé oocyty byly úspěšně aktivovány donory oxidu dusnatého. K aktivaci došlo i při mikroinjekci eNOS a kalmodulinu do oocyty prasete (Petr *et al.*, 2005). Kalmodulin aktivuje všechny izoformy NOS, hlavně eNOS a nNOS, a je regulován vápenatými ionty (Alderton *et al.*, 2001). Vápník tedy ovlivňuje signální kaskádu závislou na NO řadou mechanismů. Po ošetření oocytů kalcium ionoforem za účelem partenogenetické aktivace byla nNOS i iNOS lokalizována v oblasti prvojader. Isoforma iNOS byla lokalizována ve zralých i v aktivovaných oocytech zejména v korové oblasti oocyty. V zygotách myší byla fluorescence iNOS zaznamenána též v kortikální oblasti oocyty a v perinukleárním prostoru cytoplazmy. Po *in vitro* fertilizaci navíc došlo k významnému nárůstu aktivity iNOS, která dosáhla vrcholu v zygotách a ve 2-buněčných embryích (Nishikimi *et al.*, 2001). V korové oblasti oocyty se nachází aktinová mikrofilamenta, která jsou součástí kortikálního cytoskeletu a pomocí kterých dochází k migraci kortikálních granul směrem k oolemě a jejich následné exocytóze během oplození (Sun a Schatten, 2006). Je možné, že se iNOS podílí na řízení exocytózy kortikálních granul prostřednictvím regulace aktinových mikrofilament. Isoformy iNOS i nNOS byly pozorovány i v cytoplazmě v okolí prvojader zygot, kde se nachází síť

mikrotubulů nezbytných pro migraci prvojadere do středu vajíčka a jejich následnou syngamii (Schatten, 1994). Výskyt iNOS a nNOS v prvojádrech partenogeneticky aktivovaných oocytů i oocytů aktivovaných spermii během *in vitro* fertilizace naznačuje možnou souvislost se zapojením NO v procesu aktivace oocytu. Přítomnost iNOS byla prokázána i v samičím a samčím prvojádře aktivovaných oocytů myši (Huo *et al.*, 2005). Při lokalizaci eNOS byla naopak zaznamenána velice slabá imunofluorescence v oocytech po partenogenetické aktivaci i po *in vitro* fertilizaci. Z těchto výsledků by se dalo usuzovat, že eNOS není zapojena do procesu aktivace savčích oocytů. Experimenty jiných autorů však o jejím zapojení svědčí. U myši byl protein eNOS lokalizován v podobě drobných granulí v cytoplazmě a v prvojádře zygot myši (Nishikimi *et al.*, 2001). Injekování eNOS společně s kalmodulinem dokázalo navodit aktivaci oocytu prasete (Petr *et al.*, 2005). Použití inhibitoru L-NAME, který přednostně inhibuje eNOS, v kultivačním médiu během *in vitro* zrání prasečích oocytů mělo za následek snížení % penetrujících spermií do oocytu během IVF a nižší počet spermií navázaných na *zonu pellucidu*. Tyto výsledky naznačují, že je eNOS zapojena do interakce gamet během oplození. Jakým způsobem L-NAME modifikuje glykoproteiny *zony pellucidy* vedoucí k poklesu vazby spermií a jejich penetraci není zatím objasněno (Romero-Aguirregomez-corta *et al.*, 2014).

Aktivace oocytů je složitý proces, který zahrnuje prolomení druhého meiotického bloku, exocytózu kortikálních granul, dokončení druhého meiotického dělení a vydělení druhého pólového tělíska (Yoshida *et al.*, 1993; Williams, 2002; Yanagimachi, 2005). V přirozených podmínkách aktivuje oocyt spermie během oplození (Yanagimachi, 2005). V *in vitro* podmínkách je však fertilizace u prasat na rozdíl od jiných hospodářských zvířat stále málo účinná z důvodu vysoké polyspermie (Coy *et al.*, 2008). Jednou z možností, jak zvýšit produkci *in vitro* embryí u prasat, je partenogenetická aktivace oocytů. Tu je možné navodit pomocí umělých stimulů, mezi které patří i donory oxidu dusnatého, SNAP a SNP (Petr *et al.*, 2005; 2010). SNAP je zdrojem NO *in vivo*, neboť je z něj NO uvolňován po penetraci do buňky pomocí endogenních enzymů (Megson, 2000) a je vhodnější pro aktivaci prasečích oocytů (Petr *et al.*, 2005). Aktivace prasečích oocytů donorem NO probíhá alespoň částečně přes aktivaci rozpustné guanylát cyklázy (Friebe a Koesling, 2003). Pro partenogenetickou aktivaci oocytů donory NO je zřejmě specifická role cGMP-dependentní signální kaskády (Petr *et al.*, 2006). Nové studie však naznačují, že NO nemusí regulovat

procesy v oocytech pouze přes cGMP-dependentní signální dráhu, ale i pomocí S-nitrosylace proteinů (Zhang a Hogg, 2005). Plyn NO a donory NO mají potenciál indukovat S-nitrosylaci proteinů. NO může vyvolat S-nitrosylaci lipidových membrán organel jako jsou mitochondrie a endoplazmatické retikulum (Lee *et al.*, 2013) a též aktivovat i ryanodinové receptory. Aktivované ryanidinové receptory jsou schopny vyvolat partenogenetickou aktivaci oocytů nacházejících se v metafázi II (Petr *et al.*, 2002). Je možné, že NO může být zapojen do aktivace oocytu různými drahami. Avšak rozdíl v intracelulární distribuci jednotlivých izoform NOS produkující NO nebyl mezi oocyty aktivovanými partenogeneticky a oocyty aktivovanými spermií během *in vitro* fertilizace zaznamenán. Nicméně je nezbytné provést další experimenty k objasnění mechanismu aktivace oocytu pomocí oxidu dusnatého, aby bylo možné optimalizovat postupy partenogenetické aktivace prasečích oocytů a zvýšit tím *in vitro* produkci embryí.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda má způsob aktivace prasečích oocytů vliv na intracelulární distribuci izoform NO-syntázy (neuronální – nNOS, endoteliální – eNOS, indukovatelná – iNOS). Experiment byl vyhodnocován pomocí laserového konfokálního mikroskopu na základě intenzity fluorescence jednotlivých izoform. Získané snímky byly poté hodnoceny pomocí programu analýzy obrazu (NIS Elements 2003, Laboratory Imaging, Česká republika).

Izoforma nNOS byla u všech skupin oocytů (MII, PA, zygota) lokalizována zejména v korové oblasti, po aktivaci oocytů vzrostl imunofluorescenční signál také v oblasti prvojader. eNOS byla u oocytů v MII zaznamenána zvláště v cytoplazmě a v oblasti meiotického vřeténka. Po aktivaci oocytů však došlo k výraznému poklesu imunofluorescence. Pouze v korové oblasti byl zaznamenán u partenogeneticky aktivovaných oocytů silnější signál eNOS. Izoforma iNOS byla stejně jako nNOS zaznamenána především v korové oblasti oocytů v MII, partenogeneticky aktivovaných oocytů i zygot.

V oocytech byly pomocí imunocytochemické metody zaznamenány všechny tři izoformy NOS avšak statistické vyhodnocení získaných dat neprokázalo statisticky významný rozdíl v intenzitě fluorescence jednotlivých NOS v pozorovaných oblastech oocytu (oblast prvojádra, korová oblast, cytoplazma) mezi partenogeneticky aktivovanými oocyty a oocyty, jež byly aktivovány spermií při *in vitro* fertilizaci.

Na základě výsledků se zdá, že způsob aktivace prasečích oocytů nemá vliv na intracelulární distribuci jednotlivých izoform NO-syntázy.

8 Seznam literary

Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *The International Journal of Developmental Biology*. 45. 797-809.

Alderton, W. K., Cooper, Ch. E., Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357. 593-615.

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

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

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, Bo. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 207. 21-30.

Coy, P., Gadea J., Romar, R., Matás C., García E. 2002. Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction*. 124. 279-288.

Coy, P., Saavedra, M. D., Mondejar, I., Canovas, S., Romar, R., Aviles, M. 2008. Biological modifications of zona pellucida affecting resistance to proteases digestion, sperm binding, and monospermy are mediated by oviduct-specific glycoprotein in pig and cow. *Biology of Reproduction*. 78. 211-212.

Dixit, W. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65. 1-16.

- Ducibella, T. 1998. Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology*. 49. 53-65.
- Erickson, G. F., Shimasaki, S. 2000. The role of oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 11 (5). 193-198.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78 (3-4). 203-216.
- Fortune, J. E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78 (3-4). 135-163.
- Friebe, A., Koesling, D. 2003. Regulation of nitric oxide – sensitive guanylyl cyclase. *Circulation Research*. 93 (2). 96-105.
- Gajda, B. 2009. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. 9 (2). 97-112.
- Groves, J. T., Wang, Ch. C-Y. 2000. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4. 687-695
- Hattori, M., Tabata, S. 2006. Nitric oxid and ovarian function. *Animal Science Journal*. 77. 275-284
- Heytens, E., Soleimani, R., De Sutter, P. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 6 (4). 171-174.
- Hiroyuki, S., Yoko, T., Koji, T. 2002. Parthenogenetic development and cytoskeletal distribution of porcine oocytes treated by means of electric pulse and cytochalasin D. *Journal of Mammalian Ova Research*. 19. 6-11.

Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., Sado, Y., Ninomiya, A., Wilhelm, D., Rodgers, R. J. 2013. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. PLoS One. 8 (2). e55578. doi: 10.1371.

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

Hunter, R. H. F. 2003. Physiology of the Graafian follicle and ovulation, 1st edition. Cambridge University Press. p. 418. ISBN: 978-0521781985.

Huo, L. J., Liang, Ch. G., Yu, L. Z., Zhong, Z. S., Yang, Z. M., Fan, H. Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2005. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. Reproduction. 129 (4). 403-409.

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

Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. Endocrinology. 139 (6). 2944-2954.

Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. Molecular Reproduction and Development. 55. 412-421.

Kim, H., Moon, Ch., Ahn, M., Lee, Y., Kim, H, Kim, S., Ha, T., Jee, Y., Shin, T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. Journal of Veterinary Science. 6 (2). 97-101.

Kupková, Z., Beneš, L. 2004. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. Chemické listy. 98. 116-122.

- Lee, J., Reiter, W., Dohnal, I., Gregori, C., Beese-Sims, S., Kuchler K., Ammerer, G., Levin D. 2013. MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes and Development*. 27 (23). 2590-2601.
- Lloyd, R., E., Romar, R., Matás, M., Gutiérrez-Adán, A., Holt, W. V., Pilar, C. 2009. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction*. 137. 679-687
- Megson, I. L. 2000. Nitric oxide donor drugs. *Drugs of the Future*. 25. 701-715.
- Mehlmann, L. M., 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-799.
- Miao, Y. L., Kikuchi, K., Sun, Q. Y., Schatten, H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*. 15. 573-585.
- Miyano, T. 2003. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology*. 59 (1). 61-72.
- Miyano, T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 51 (2). 169-176.
- Moniruzzaman, M., Miyano, T. 2007. KIT-KIT Ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. *Journal of Reproduction and Development*. 53 (6). 1273-1281.
- Neill, J. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd Edition. Elsevier. p. 3296. ISBN: 978-0125154000

Nevoral, J., Krejčová, T., Peter, J., Melicharová, P., Vyskočilová, A., Dvořáková, M., Weingartová, I., Chmelíková, E., Tůmová, L., Hošková, K., Kučerová-Chrpová, V., Sedmíková, M. 2013. The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 58 (10). 453-459.

Nishikimi, A., Matsukawa, T., Hoshino, K., Ikeda, S., Kira, Y., Sato, E. F., Inoue, M., Yamada, M. 2001. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction*. 122. 957-963.

Pauliny, F., Melo, E. O. 2011. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (2). 354-361.

Petr, J., Chmelíková, E., Krejčová, T., Řehák, D., Novotná, B., Jílek, F. 2010. Parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with a nitric oxide donor. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 439-499.

Petr, J., Rajmon, R., Chmelíková, E., Tománek, M., Lanská, V., Přibánová, M., Jílek, F. 2006. Nitric oxide-dependent activation of pig oocytes: The role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*. 14. 9-16.

Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005. Activation of pig oocyte using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71. 115-122.

Petr, J., Rozinek, J., Jílek, F., Urbánková, D. 2000. Activation of porcine oocytes using cyclopiazonic acid, an inhibitor of calcium-dependent ATPases. *Journal Of Experimental Zoology*. 287. 304-315.

Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of *in vitro* matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*. 70 (3-4). 235-249.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145 (1-2). 27-37.

Plant, T. M., Zeleznik, A. J. 2014. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Fourth Edition. Academic Press. P. 2684. ISBN: 978-0123971753.

Procházka, R., Kaňka, J., Šutovský, P., Fulka, J., Motlík, J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *Journals of Reproduction and Fertility*. 96. 725-734.

Rastogi, S. C. 2007. *Essentials of Animal Physiology*, 4th edition. New age international. p. 578. ISBN: 978-81-224-2429-2.

Raz, T., Shalgi, R. 1998. Early events in mammalian egg activation. *Human Reproduction*. 13 (4). 133-145.

Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Oschetti, S., Bosia, A., Massobrio, M., Lindblom, B., Ghigo, D. 2001. Signaling pathway of nitric oxide induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 64. 1708-1712.

Romar, R., Funahashi, H., Coy, P. 2016. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*. 85(1). 125-134.

Romero-Aguirregomez-corta, J., Santa, Á., P., García-Vázquez, F. A., Coy, P., Matás, C. 2014. Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibition during Porcine In Vitro Maturation Modifies Oocyte Protein S-Nitrosylation and In Vitro Fertilization. *Plos One*. 9 (12). e115044. doi: 10.1371/journal.pone.0115044

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

- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. 60 (9). 1609-1620.
- Schatten G 1994. The centrosome and its mode of inheritance - the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Developmental Biology* 165. 299-335.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 45 (5). 347-359.
- Sun, Q. Y., Schatten, H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*. 131. 193-205.
- Tao, Y., Fu, Z., Zhang, M., Xia, G., Yang, J., Xie, H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222. 93-103.
- Tao, Y., Xie, H., Hong, H., Chen, X., Jang, J., Xia, G. 2005. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13 (1). 1-9.
- Tichovská, H., Petr, J., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Tůmová, L., Krejčová, M., Dörflerová, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal*. 5 (9). 1398-1405.
- Tsafiri, A., Dekel, N., Shalom, B-A. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 64. 541-551.
- Wang, W-H., Macháty, Z., Abeydeera, L. R., Prather, E. S., Day, B. N. 1998. *Biology of Reproduction*. 58. 1357-1366.

Wassarman, P., M. 1988. The mammalian ovum, in Kuobil, E., Neil, J. (eds.). Physiology of the Reproduction. Raven Press, New York, pp. 69-102.

Wei-Hua, W., Lalantha, R. A., Randall, S. P., Billy, N. D. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. Molecular Reproduction and Development. 51. 346-353

White, K., L., Pate, B., J., Sessions, B., R., 2010. Oolemma receptors and oocyte activation. Systems Biology In Reproductive Medicine. 56. 365-375.

Williams, C. J. 2002. Signalling mechanism of mammalian oocyte activation. Human Reproduction Update. 8 (4). 313-321.

Wu, D., Cheung, Q. C., Wen, L., Li. J. 2006. A growth-maturation system that enhances the meiotic and developmental competence of porcine oocytes isolated from small follicles. Biology of reproduction. 75 (4). 547-554.

Yanagimachi, R. 2005. Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. Reproductive Biomedicine online. 10 (2). 247-248.

Yoshida, M., Cran, D. G., Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. Molecular Reproduction and Development. 36 (4). 462-468.

Zhang, Y., Hogg, N. 2005. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. Free Radical Biology and Medicine 38. 831–838.

Zheng, H., Mandal, A., Shumilin, I. A., Chordia, M. D., Panneerdoss, S., Herr, J. C., Minor, V. 2015. Sperm Lysozyme-Like Protein 1 (SLLP1), an intra-acrosomal oolemmal-binding sperm protein, reveals filamentous organization in protein crystal form. Andrology. 3 (4). 756-771.

9 Seznam použitých zkratek

AG – Aminoguanidin, specifický inhibitor iNOS

AMH – anti-Müllerian hormon

APC – anafázi podporující komplex

ART – Technologie asistované reprodukce

BMP – kostní morfogenetický protein

CaM – kalmodulin

CaMKII – kalmodulin dependentní kináza II

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

CG – kortikální granula

cGMP – cyklický guanosin monofosfát

CR – kortikální reakce

CSF – cytostatický faktor

DAG – diacylglycerol

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAD – flavin adenin dinukleotid

FMN – flavin mononukleotid

FSH – folikulostimulační hormon

GDF-9 – růstový diferenciační faktor 9

GnRH – gonadotropiny uvolňující hormon

GV – zárodečný váček

GVBD – rozpad zárodečného váčku

IP3 – inositoltrifosfát

L-NAME – N^ω-nitro-L-arginin metylester, nespecifický inhibitor NOS

LH – luteinizační hormon

LHRH – hormon uvolňující luteinizační hormon

MAPK – mitogenem aktivované protein kinázy

MI – první meiotická metafáze

MII – druhá meiotická metafáze

MPF – faktor podporující metafázi

NADP⁺, NADPH – nikotinamidadenin dinukleotidfosfát

NO – oxid dusnatý
NOS, NO-syntáza – syntáza oxidu dusnatého
NOS I, nNOS – neuronová konstitutivní NO-syntáza
NOS II, iNOS – indukovatelná NO-syntáza
NOS III, eNOS – endoteliální konstitutivní NO-syntáza
NGF – nervový růstový faktor
OMI – inhibitor zrání oocytů
OVGP1 – glykoprotein specifický pro ovidukt
PGC – primordiální zárodečné buňky
PIP2 – fosfatidylinositolbisfosfát
PKA – protein kináza A
PKC – protein kináza C
PLC – fosfolipáza C
PLC ζ – fosfolipáza C zeta, specifická pro spermie
SNP – nitroprusid sodný, donor NO
SLLP1 – spermiový, lysozymu podobný protein
TBP2 – TATA vazebný protein 2
TGF- β – transformující růstový faktor β
ZP – *zona pellucida*