

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Metodiky hodnocení kumulární expanze využitelné pro
prasečí oocyty kultivované v *in vitro* podmínkách**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Zámotná

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

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Metodiky hodnocení kumulární expanze využitelné pro prasečí oocyty kultivované v *in vitro* podmínkách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Podpis autora práce:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za cenné rady a velkou vstřícnost při vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Nevoralovi za obětavou pomoc, trpělivost a přátelský přístup. Děkuji také své rodině za velkou podporu během celého studia.

Souhrn

Rozvoj reprodukčních biotechnologií závisí na dostupnosti dostatečného počtu kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách. Během meiotického zrání dochází u meioticky kompetentních oocytů k procesům, které vedou k dosažení druhé meiotické metafáze. Simultánně s meiotickým zráním probíhá kumulární expanze. Kumulární expanze spočívá v produkci extracelulární matrix, která je tvořena především hyaluronovou kyselinou (HA). Kumulární expanze je nezbytná pro úplné meiotické zrání i dosažení plné vývojové kompetence zrajících oocytů. Proto je kumulární expanze důležitým ukazatelem kvality dozrálého oocytu. Dosud využívané metody vizuálního hodnocení kumulární expanze jsou méně přesné. Pro objektivní hodnocení kumulární expanze je možné využít hojně zastoupenou HA v expandovaném kumulo-oocytárním komplexu (COC).

Cílem práce bylo použít a optimalizovat dostupné analytické metody měření HA pro hodnocení kumulární expanze prasečích COCs po 24 hod. a 48 hod. zrání v podmínkách *in vitro*. Z expandovaných kumulů byla po ukončení kultivace izolována HA. Pro stanovení HA uvolněné během kultivace COCs do okolního prostředí bylo zpracováno také kultivační médium. Vzorky z expandovaných kumulů a kultivačního média byly následně podrobeny enzymatickému štěpení. Ke stanovení HA byla použita imunologická metoda ELISA a analytická metoda spektrofotometrie. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako HA v COCs a celková HA (HA v COCs a kultivačním médiu). Výsledky experimentů prokázaly, že metody analytického a imunologického stanovení HA lze využít pro její objektivní měření v expandovaném COC prasete během meiotického zrání *in vitro*. Jako citlivější se ukázala metoda enzymatického štěpení HA expandovaných COCs a ultracentrifugace kultivačního média, a následného spektrofotometrického měření štěpných produktů HA. Obsah HA v expandovaných COCs a celkové HA koreloval s délkou kultivace COCs.

Bylo prokázáno, že metodu enzymatické digesce HA a spektrofotometrického stanovení štěpných produktů lze využít pro objektivní měření kumulární expanze prasečích COCs kultivovaných v podmínkách *in vitro*.

Klíčová slova:

Oocyt, meiotické zrání, kumulární expanze, hyaluronová kyselina, spektrofotometrie.

Summary

The development of reproductive biotechnologies depends on the availability of a sufficient amount of high-quality oocytes matured *in vitro*. During meiotic maturation of meiotic competent oocytes, there are processes leading to achievement of second meiotic metaphase. Oocyte maturation is part of complete changes of cumulus-oocyte complexes (COCs) involving cumulus expansion. The cumulus expansion is based on extracellular matrix production, consisted especially in hyaluronic acid (HA) synthesis. Therefore, the HA amount could be an important indicator of both of the quality of cumulus expansion and the matured oocyte. Previously, visual evaluation of cumulus expansion is less accurate. For the objective evaluation of the cumulus expansion of mammals COCs, analytical measurement of HA content is possible way for cumulus expansion evaluation.

The aim of the work was to use and optimize the available analytical methods for HA measurement for the cumulus expansion evaluation of porcine COCs matured *in vitro*. The HA from expanded cumulus was isolated after 24 hr or 48 hr cultivation. In addition to that, the culture medium was analyzed for determination of HA spontaneously released by COCs into surrounding. The samples were enzymatically digested. For the measurement of HA content the ELISA and spectrophotometry methods were used and compared. The measured values were expressed as HA in COCs and total HA (HA in the COCs and in the culture medium). The results of the experiments have shown that the methods of analytical and imunological determination of the HA can be used for its objective measurement in the expanded porcine COCs during meiotic maturation *in vitro*. The enzymatic cleavage of HA from expanded COCs and ultracentrifugation of the culture medium followed by spectrophotometric measurement of cleaved products of HA has recognized as the optimal procedure. The HA in COCs and total HA correlated with the length of cultivation.

The method of enzymatic HA digestion and its spectrophotometric measurement can be used for the objective evaluation for the cumulus expansion of COCs cultured *in vitro*.

Keywords:

Oocyte, meiotic maturation, cumulus expansion, hyaluronic acid, spectrophotometry.

Obsah

1	Úvod	1
2	Literární rešerše	2
2.1	Oogeneze savců.....	2
2.1.1	Vývoj embryonálních vaječníků a fáze množení zárodečných buněk.....	2
2.1.2	Fáze růstu oocytů a folikulogeneze.....	4
2.1.3	Fáze zrání oocytů.....	8
2.1.4	Regulační faktory meiotického zrání oocytů.....	9
2.2	Kumulární expanze.....	17
2.2.1	Hyaluronová kyselina.....	18
2.2.2	Regulace kumulární expanze.....	19
2.2.3	Hodnocení kumulární expanze.....	21
3	Hypotéza a cíle práce	23
4	Materiál a metodika	24
4.1	Získávání a kultivace kumulo-oocytárních komplexů.....	24
4.2	Příprava vzorků z kumulo-oocytárních komplexů pro měření hyaluronové kyseliny.....	24
4.3	Příprava vzorků z kultivačního média pro měření hyaluronové kyseliny.....	25
4.4	Stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny metodou ELISA.....	26
4.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny.....	27
4.6	Statistická analýza.....	28
5	Výsledky	29
5.1	Analytické stanovení hyaluronové kyseliny.....	29
5.1.1	Stanovení optimální kombinace enzym – médium.....	29
5.1.2	Stanovení optimální vlnové délky.....	32
5.1.3	Korekce metody pro manipulaci s kumulo-oocytárními komplexy.....	34
5.2	Hodnocení kumulární expanze podle obsahu hyaluronové kyseliny.....	35
5.2.1	ELISA.....	35
5.2.2	Spektrofotometrická analýza obsahu hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech a kultivačním médiu.....	37
6	Diskuze	39
7	Závěr	42
8	Seznam použité literatury	43
9	Seznam použitých zkratk	55
10	Samostatné přílohy	57

1 Úvod

V odvětví vývojové biologie je rozvoj reprodukčních biotechnologií stále aktuálním tématem. Studium reprodukce hospodářských zvířat poskytuje důležité informace, které umožňují rozvoj reprodukčních biotechnologií a jejich uplatnění v praxi. V současné době se v chovech hospodářských zvířat využívá především inseminace, *in vitro* oplození a embryotransfer, méně pak klonování a tvorba transgenních jedinců.

Limitujícím faktorem studia reprodukce a vývoje biotechnologických postupů je dostatečný počet kvalitních oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách. Řešení může přinést další výzkum v oblasti meiotického zrání včetně kumulární expanze. Vhodným nástrojem pro studium těchto procesů je prasečí kumulo-oocytární komplex (COC). Jelikož prasečí oocyt nabízí řadu podobností s lidským, lze získané poznatky využít také v humánní medicíně. Simultánně s meiotickým zráním probíhá kumulární expanze, která se významným způsobem podílí na jeho regulaci. V průběhu kumulární expanze produkují kumulární buňky velké množství extracelulární matrix bohaté na hyaluronovou kyselinu (HA). Výsledkem kumulární expanze je přerušení komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami, čímž je oocyt izolován od regulačních faktorů pocházejících z kumulárních buněk. Jelikož má kumulární expanze úzký vztah k meiotickému zrání, lze ji využít jako marker průběhu meiotického zrání *in vitro*.

K hodnocení kumulární expanze se stále využívají tradiční metody založené na vizuálním hodnocení expandovaného kumulu, z čehož plyne jejich nepřesnost. Exaktnější metody jako imunologická metoda ELISA nebo radioaktivní označení prekurzorů syntézy HA jsou založeny na měření obsahu HA v COC. V současné době je užitečné zaměřit se na vývoj a optimalizaci metod, které by podávaly objektivní informace o intenzitě kumulární expanze na základě obsahu HA bez nutnosti použití radioizotopů a protilátek. Přesné stanovení kumulární expanze poskytne cenné informace o kvalitě oocytů dozrálých *in vitro* a používaných k dalším biotechnologickým postupům.

2 Literární řešení

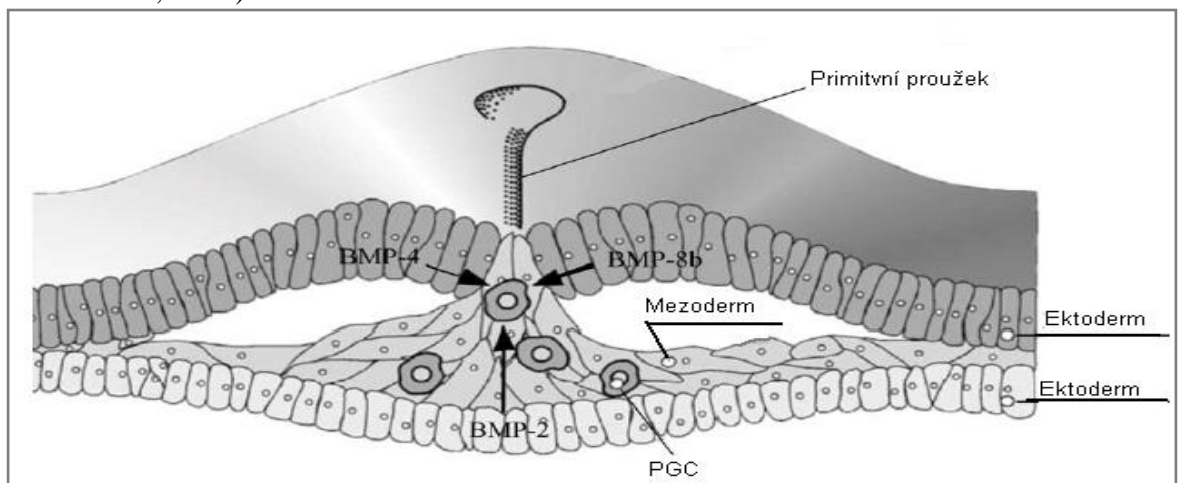
2.1 Oogeneze savců

2.1.1 Vývoj embryonálních vaječníků a fáze množení zárodečných buněk

Gonády samců i samic vznikají během embryonálního vývoje ze stejného základu, kterým je genitální lišta. Genitální lišta se zakládá jako podélný párový útvar na ventrální straně zárodka. Povrch genitální lišty je tvořen somatopleurou, pod kterou se nachází mezenchym. Somatopleura představuje povrchový epitel, který během vývoje gonády prolifерuje a jeho buňky prostupují do mezenchymu. Současně v tomto období dochází k osídlení základu gonády primordiálními zárodečnými buňkami, které dávají později vzniknout gametám (Sadler, 2011).

Primordiální zárodečné buňky (PGC – primordial germ cell) vznikají v časně embryogenezi, v období formování primitivního proužku, ze žloutkového váčku a kaudální části prvostřeva. Primitivní gonádu osidlují na základě chemotaktických signálů (Wassarman *et al.*, 1994). Energií potřebnou k migraci poskytují glykogenové partikule a lipidové kapénky, které jsou uloženy v cytoplasmě (Motta *et al.*, 1997). Primordiální zárodečné buňky spolu s epitelem somatopleury tvoří zárodečný epitel, který vrůstá do mezenchymu a tvoří medulární provazce propojené s povrchovým epitelem (viz obr. 1).

Obr. 1. Formování primitivní gonády a její osídlení zárodečnými buňkami (upraveno dle Hurk *et al.*, 2005)



Popisované stádium vývoje nazýváme jako indiferentní, kdy morfologicky zatím nelze určit pohlaví jedince. V tomto stádiu jsou také u zárodku přítomny dva typy vývodů, Müllerův a Wolffův (Sadler, 2011).

U savců vzniká samičí gonáda v případě absence pohlavně determinujícího faktoru chromozomu Y (SRY - sex-determining region on the Y chromosome) (Sinclair *et al.*, 1990; Koopman, 1992) a současně přítomnosti samičích specifických genů, například FOXL2 (forkhead box L2), WNT4 (wingless-type MMTV integration site family member 4) a FST (follistatin). Uvedené geny se účastní procesu přeměny indiferentní gonády ve vaječník a primordiálních zárodečných buněk v oogonie (Eicher *et Washburn*, 1986).

Během formování vaječníku dochází ke změnám, které zahrnují další větvení medulárních provazců a následnou proliferaci druhé generace, kdy dochází k rozvoji kortikálních pruhů (Sadler, 2011). Současně s tímto procesem vstupují primordiální zárodečné buňky do mitotického dělení a dávají vzniknout oogoniím (Eicher *et Washburn*, 1986). Oogonie jsou během mitotického dělení obalovány okolními somatickými buňkami, z nichž později vzniknou folikulární buňky. Na úrovni kortikálních pruhů jsou již oogonie spolu s folikulárními buňkami rozeznatelné. Další vnitřní pohlavní orgány samice – vejcovody, děloha a pochva vznikají z Müllerových vývodů, přičemž Wolffovy vývody zanikají (Sadler, 2011).

Během vývoje gamet rozeznáváme tři fáze: fázi množení, fázi růstu a fázi zrání. Fáze množení zahrnuje mitotické dělení primordiálních zárodečných buněk ve velké množství oogonií (Wassarman *et Albertini*, 1994). U prasat je pozorováno mitotické dělení přibližně od 13. dne embryonálního vývoje až do 7. dne po narození. Počet zárodečných buněk přitom nejvýrazněji stoupá mezi 20. a 50. dnem, kdy se počet oogonií zvyšuje z 5 000 až na 1 100 000. Po ukončení mitotické aktivity podléhá značná část oogonií atrézii (Hunter, 2000).

Dříve všeobecně přijímané dogma, které předpokládá možnost vzniku oogonií pouze během embryogeneze mitózou z primordiálních zárodečných buněk, bylo vyvráceno studií publikovanou Johnsonem *et al.* (2004). Ve své práci popisují objev zárodečných kmenových buněk ve vaječnicích dospělých myší, které mohou v období dospělosti samice proliferovat a vytvářet tak nové oocyty a folikuly. Naopak Zhang *et al.* (2012) popisují látku zamezující dalšímu mitotickému dělení oogonií v dospělosti.

Již v prenatálním období vstupují oogonie do meiotického dělení. Meióza představuje buněčné dělení, při kterém se jedna buňka diploidní rozdělí na čtyři buňky haploidní, tj. s pouze polovičním množstvím původního počtu chromozomů. Tato redukce je

nezbytná, protože splynutím dvou gamet při oplození dojde k obnovení diploidního počtu chromozomů v buňkách embrya (Alberts *et al.*, 1998). Pro meiotické dělení oocyty je charakteristické asymetrické dělení cytoplazmy, což má za následek vznik pouze jedné funkční gamety a dvou, případně tzv. tří pólových tělísek, které se na vzniku zygoty nepodílejí.

Meiotické dělení sestává ze dvou fází – meióza I (redukční) a meióza II (ekvační). Při meióze I dochází k rozchodu homologních chromozomů do dvou dceřiných buněk, a tedy ke snížení počtu chromozomů na polovinu. Profáze prvního meiotického dělení zahrnuje pět částí – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. V průběhu pachytene probíhá proces zvaný crossing-over, při kterém se vyměňují fragmenty mezi homologními chromatidami sesterských chromozomů. Tímto procesem je zajištěna téměř nekonečná variabilita potomstva.

Ještě před zahájením fáze růstu oocyty v diplotenním stádiu profáze I dochází k zastavení meiotického dělení, k tzv. prvnímu meiotickému bloku, za vzniku oocyty prvního řádu. K znovuoobnovení meiózy dochází postnatálně v období puberty (Wassarman *et al.*, 1994; Lodish *et al.*, 2004).

2.1.2 Fáze růstu oocytů a folikulogeneze

Před zahájením fáze růstu je oocyt prvního řádu obklopen jednou vrstvou pre-granulózních buněk a intaktní bazální laminou. Celý komplex je označován jako primordiální folikul. Teprve po dosažení pohlavní dospělosti probíhají vlivem hormonálních stimulů na úrovni primordiálního folikulu růstové změny, které zahrnují především intenzivní mitotické dělení a diferenciaci pre-granulózních buněk v buňky granulózní, označované také jako folikulární. Vzniká tak primární folikul, který podléhá dalšímu vývoji (Wassarman *et al.*, 1994).

Folikulární buňky primárního folikulu podstupují další mitotická dělení. Vzniká tak folikul sekundární neboli preantrální zahrnující dvě a více vrstev folikulárních buněk obklopujících oocyt prvního řádu (Wassarman *et al.*, 1994; Eppig, 2001).

Simultánně s vývojem folikulu probíhá také fáze růstu oocyty. V tomto období dochází k intenzivním růstovým změnám oocyty, které zahrnují cytoplazmatické změny na úrovni organel a proteinů. Během růstu se zvyšuje počet mitochondrií a současně se mění

i jejich morfologie z prodlouženého tvaru na oválný až kulatý. Ultrastrukturální modifikace postihují také Golgiho komplex a ribozomy. Jádro spolu s jadérkem se zvětšují a získávají kompaktnější podobu, zejména u jadérka můžeme pozorovat výraznou změnu, kdy se z difuzní síťovité struktury stává jednotný útvar z výhradně vláknitého materiálu (Wassarman *et al.*, 1994).

Všechny tyto změny souvisejí se zvýšenou proteosyntézou v oocytu. Vzniklé proteiny slouží k regulaci následného meiotického zrání i pro časný embryonální vývoj po oplození oocytu. K dalším důležitým strukturám vznikajícím během fáze růstu patří zejména *zona pellucida* a kortikální granula (Wassarman *et al.*, 1994; Fulka *et al.*, 1998).

Zona pellucida je povrchový obal oocytu složený ze tří typů glykoproteinů: ZP1, ZP2, ZP3, které vytvářejí síťovitou strukturu. *Zona pellucida* se významně podílí na průběhu růstu a zrání oocytu, kdy zprostředkovává komunikaci mezi oocytem a okolními kumulárními buňkami prostřednictvím mezibuněčného spoje typu gap junction. Proteinové jednotky gap junction, neboli konexony, se v membráně buňky seskupují do hexagonálního uspořádání a spojují dvě sousední buňky. Vzniká tak spojení umožňující volný pohyb látek mezi jednotlivými buňkami, aniž by musely látky procházet přes extracelulární matrix. Kanálek má průměr přibližně 2 nm, což dovoluje volně procházet iontům, sacharidům, aminokyselinám a jiným rozpuštěným látkám s molekulovou hmotností dosahující max. 1 kDa (Ganong, 2005). Díky tomuto spojení jsou do oocytu přímo transportovány substance z kumulárních buněk, čímž je regulován růst oocytu, 1. meiotický blok (Tanghe *et al.*, 2002) a znovuzahájení meiózy oocytu (Moor *et al.*, 1990). Dále se *zona pellucida* uplatňuje při oplození, kdy spermie rozeznávají receptory na jejím povrchu a spouští tak akrosomovou reakci, po oplození se pak podílí na kortikální reakci oocytu (Wassarman *et al.*, 1994; Hurk *et al.*, 2005).

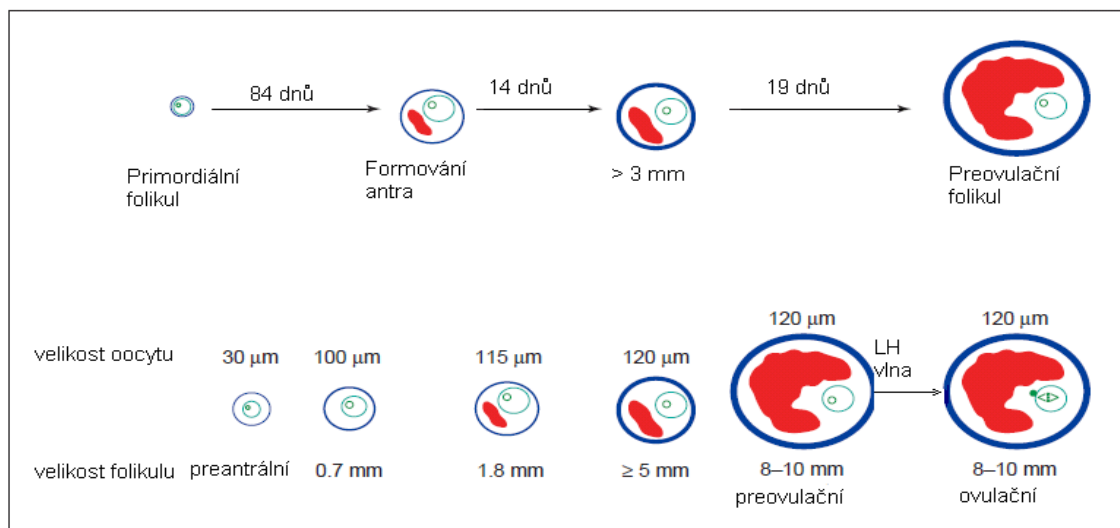
Kortikální granula jsou malé sférické útvary, které se nacházejí v dosud neoplozených oocytech (Wassarman *et al.*, 1994). Po oplození dochází ke kortikální reakci, tj. uvolnění kortikálních granul obsahujících proteolytické enzymy a glykoproteiny, jež mění strukturu *zona pellucida*, do perivitelinního prostoru mezi oocytem a *zonou pellucidou*. V důsledku kortikální granula zabraňují penetraci dalších spermií do oocytu a tím vzniku polyspermie (Wang *et al.*, 1997).

Výsledkem fáze růstu oocytu je plně dorostlý oocyt ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle), který dosáhl plné meiotické kompetence, tj. schopnosti znovu

zahájit a dokončit následující meiotické zrání. Z pohledu folikulogeneze je tento oocyt součástí sekundárního folikulu (Wassarman *et* Albertini, 1994).

Sekundární folikul se v průběhu procesu folikulogeneze dále vyvíjí. Dochází k dalšímu množení folikulárních buněk, okolo kterých se z okolního stromatu vytváří obal (Wassarman *et* Albertini, 1994; Eppig, 2001). V průběhu dalšího vývoje vzniká ve folikulu dutina vyplněná folikulární tekutinou, tzv. *antrum*, které se nadále zvětšuje v důsledku přibývající folikulární tekutiny. Tak vzniká konečné stádium folikulogeneze – terciální folikul s dutinou, preovulační antrální folikul, označovaný též jako Graafův folikul (Eppig, 2001). Folikulární vývoj prasečích oocytů je znázorněn na obr. 2.

Obr. 2. Růst prasečích oocytů a folikulů (upraveno dle Hunter, 2000)

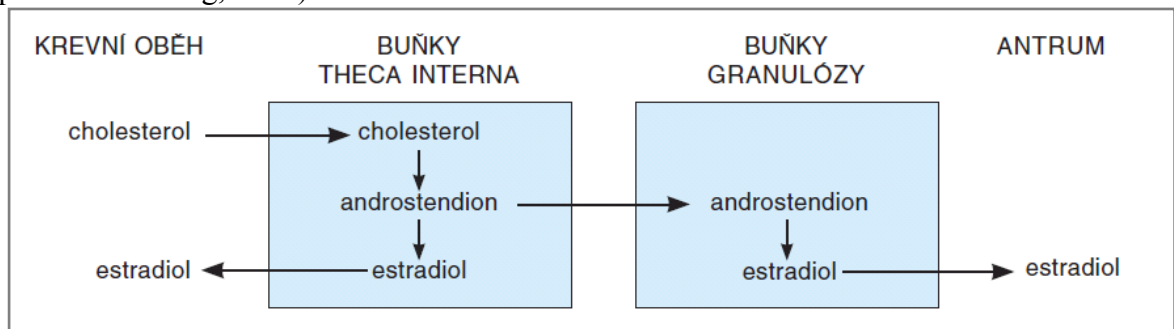


Období vývoje antrálního folikulu je na rozdíl od předchozích stádií (Hirshfield, 1991) plně závislé na hormonální regulaci, která sestává z gonadotropinů, folikulo stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Zmíněné gonadotropiny jsou uvolňovány z adenohipofýzy pod regulací gonadotropin releasing hormonu (GnRH) (Ganong, 2005; Edson *et al.*, 2009).

GnRH vzniká v hypothalamu, odkud je prostřednictvím hypothalamo-hipofyzárního portálního systému transportován do adenohipofýzy, kde spouští sekreci LH a FSH. Počáteční sekrece LH je poměrně nízká, ale je dostačující pro aktivaci enzymů v buňkách *theca folliculi interna*, kde stimulují sekreci androgenů z cholesterolu. Vzniklé androgeny následně putují do granulózních buněk (Zachow *et* Magoffin, 1995; Ganong, 2005). FSH stimuluje enzym aromatázu v granulózních buňkách, který podmiňuje tvorbu estrogenů z androgenů testosteronu a androstendionu (viz obr. 3). FSH stimuluje také tvorbu receptorů

pro LH na granulózních buňkách (Kumar *et al.*, 1997; Ganong, 2005; Edson *et al.*, 2009). Granulózní buňky vytvářejí tekutinu bohatou na estrogény, která postupně granulózní buňky odděluje a vytváří *antrum*. Při vývoji antrálního folikulu se také uplatňují apokrinní a parakrinní dráhy, včetně účinku steroidů a peptidů (Bonnet *et al.*, 2008). Estrogény zvyšují sekreci LH, čímž spouštějí předovulační LH vlnu, která stimuluje zrání oocytu (viz kap. 2.1.3) (Ganong, 2005).

Obr. 3. Interakce mezi thekálními a granulózními buňkami při syntéze a sekreci estradiolu (převzato Ganong, 2005)



Během růstu folikulu dochází k diferenciaci folikulárních buněk, kdy se z vrstvy granulózních buněk obklopujících oocyt dále diferencují kumulární buňky tvořící vejconosný hrbolek (*cumulus oophorus*) a vrstva kumulárních buněk, která je v přímém kontaktu s oocytem, tzv. *corona radiata*. Vrstva *corona radiata* je spojena s oocytem prostřednictvím dlouhých buněčných výběžků prostupujících *zonu pellucidu* a spojů gap junction (Wassarman *et al.*, 1994). V případě kumulo-oocytárních komplexů spojení gap junction sestává z konexinu 37 (Li *et al.*, 2007), které propojuje oocyt s vrstvou kumulárních buněk *corona radiata*. Spojení a komunikace kumulárních buněk a oocytu je nezbytné pro správný průběh meiotického zrání oocytu, ke kterému *in vivo* podmínkách dochází v dorostlém preovulačním folikulu (Wassarman *et al.*, 1994; Eppig, 2001).

2.1.3 Fáze zrání oocytů

Fáze zrání oocytů začíná uvolněním prvního meiotického bloku v oocyту prvního řádu. K tomuto procesu dochází poprvé postnatálně v období puberty vlivem hormonálních stimulů samičího organismu. Znovuzahájení meiózy iniciuje preovulační LH vlna, na kterou reaguje pouze plně dorostlý meioticky kompetentní oocyt z preovulačního Graafova folikulu. Jen u těchto folikulů spouští LH vlna signální kaskádu, která zapříčiní uvolnění prvního meiotického bloku a rozpad zárodečného váčku (GVBD – germinal vesicle breakdown), což je rozpad jaderné membrány způsobený rozložením jaderné laminy (Alberts *et al.*, 1998; Hurk *et Zhao*, 2005). Oocyt je tak schopen pokračovat v meiotickém dělení.

Po iniciaci meiotického dělení oocytů a rozpadu zárodečného váčku vstupuje oocyt do metafáze I, kdy se páry homologních chromozomů seřadí do ekvatoriální roviny dělicího vřeténka. V průběhu anafáze I a telofáze I se rozchází celé homologní chromozomy (Lodish *et al.*, 2004). Meiotické dělení oocytů je přerušeno druhým meiotickým blokem v metafázi II - seřazením chromozomů do ekvatoriální roviny za vydělení prvního pólového tělíska (Wassarman *et Albertini*, 1994). Meiotické dělení oocytů započaté GVBD a přerušené v metafázi II je označováno jako meiotické zrání nebo také zrání oocytů. K úplnému dokončení meiózy oocytů dochází po aktivaci oocytů spermií. Následně probíhá anafáze II a telofáze II, kdy se současně vydělí druhé pólové tělísko (Wassarman *et Albertini*, 1994).

Důležitou úlohu ve zrání oocytů hrají kumulární buňky *corona radiata*, které se podílejí spolu s buněčnými spoji typu gap junction na jaderném a cytoplazmatickém zrání oocytů (Sun *et Nagai*, 2003; Karja, 2008). Jak již bylo zmíněno, přes buněčná spojení gap junction mohou procházet pouze molekuly, které svou velikostí nepřesahují 1 kDa (Ganong, 2005). Z hlediska funkce se jedná především o molekuly s inhibičními účinky na meiotické zrání, z nichž nejdůležitější jsou molekuly cAMP a cGMP (Sun *et al.*, 2009).

2.1.4 Regulační faktory meiotického zrání oocytů

Cyklický adenosin monofosfát

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP) patří mezi významné druhé posly buněčných kaskád. Z adenosintrifosfátu (ATP) ho vytváří enzym adenylátcykláza (AC) (Ganong, 2005).

Dynamika cAMP je regulována dvěma mechanismy. První z nich reguluje vznik cAMP prostřednictvím aktivace AC, druhý mechanismus vzniklé cAMP degraduje prostřednictvím enzymu cAMP-fosfodiesterázy.

První mechanismus regulující změnu intracelulární koncentrace cAMP závisí na aktivaci/inhibici AC prostřednictvím heterotrimerních G-proteinů. Při vazbě ligandu na stimulační receptor se aktivuje stimulační G-protein a následně AC. Naopak při vazbě ligandu na inhibiční receptor se aktivuje inhibiční G-protein a aktivita adenylátcyklázy je utlumena. Degradace cAMP probíhá prostřednictvím enzymu cAMP-fosfodiesterázy, který mění cAMP na fyziologicky neaktivní 5'-AMP (Ganong, 2005).

cAMP se významným způsobem podílí na zrání oocytu. cAMP aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA), která následně katalyzuje fosforylaci dalších proteinů. cAMP a aktivní PKA udržuje první meiotický blok v diktyotene profáze I (Kishimoto, 2003).

Po hormonálním stimulu LH dochází v důsledku morfologických změn obalu kumulárních buněk k přerušení spojů gap junction mezi oocytem a kumulárními buňkami. Tím je znemožněn vstup cAMP z kumulárních buněk do oocytu a jeho hladina v oocytu klesá (Hurk *et Zhao*, 2005; Liang *et al.*, 2007). Další cesta snížení koncentrace cAMP v oocytu je aktivace cAMP-fosfodiesteráz (Mehlmann, 2005; Liang *et al.*, 2005). Nízká koncentrace cAMP zapříčiňuje pokles PKA a následně rozpad zárodečného váčku (Kishimoto, 2003).

Nízká koncentrace cAMP setrvává po celý průběh meiotického zrání až do období druhého bloku meiózy v metafázi II (Dekel *et Beers*, 1980).

Cyklický guanosin monofosfát

Cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP) patří stejně jako cAMP mezi druhé buněčné posly. cGMP vzniká z guanosintrifosfátu (GTP) účinkem guanylátcyklázy (Ganong, 2005).

Syntéza cGMP probíhá v kumulárních buňkách, odkud je cGMP transportován prostřednictvím gap junction do oocyty (Törnell *et al.*, 1991). V oocyty se cGMP následně podílí na inhibici meiotického zrání a udržení meiotického bloku. Degradaci cGMP zprostředkovává enzym cGMP-fosfodiesteráza (Sasseville *et al.*, 2008). U prasečích kumulo-oocytárních komplexů byl pozorován nárůst degradačního enzymu cGMP v kumulárních buňkách po působení LH (Sasseville *et al.*, 2008).

Podstatou inhibičního efektu cGMP při meiotickém zrání oocyty je inhibice cAMP-fosfodiesterázy, a tím inhibice degradace cAMP v oocyty (Wang *et al.*, 2008; Norris *et al.*, 2009). cGMP signalizace tak udržuje koncentraci cAMP na vysoké úrovni a spolupracuje na udržování meiotického bloku. Koncentrace zmíněných cyklických nukleotidů klesá před GVBD (Sun *et al.*, 2009).

M-fázi podporující faktor

M-fázi podporující faktor (MPF) je klíčový pro regulaci zahájení mitózy i meiózy ve všech eukaryotických buňkách (Lodish *et al.*, 2004). Jedná se o heterodimer složený z katalytické a regulační podjednotky. Katalytickou podjednotkou MPF v oocyty je cyklin-dependentní proteinkináza 2 (cdk2), regulační podjednotkou molekula cyklinu B1 (Mehlmann, 2005; Liang *et al.*, 2007).

Obecně se komplexy cdk a cyklinu uplatňují v regulaci buněčného cyklu. Cyklin-dependentní proteinkinázy jsou v dělící se buňce přítomny v průběhu celého cyklu. Jsou ale aktivovány pouze přechodně a poté jsou opět rychle deaktivovány. Za aktivaci těchto kináz jsou zodpovědné regulační proteiny bez katalytické aktivity – cykliny (Alberts *et al.*, 1998). Syntéza cyklinů začíná ihned po rozdělení buňky a pokračuje po celý průběh interfáze. Cyklin se akumuluje, a tak jeho koncentrace stále stoupá a pomáhá tak načasovat začátek dalšího buněčného dělení. Prudký pokles cyklinu je způsoben degradací pomocí ubiquitin-proteasomálního komplexu (UPS) (Glotzer *et al.*, 1991).

MPF se v nezralém oocytu kumuluje v neaktivní formě, tzv. pre-MPF. Omezení aktivity spočívá ve fosforylaci cdk2 na Thr14 a Tyr15 kinázami Wee1 a Myt1. Z pre-MPF vzniká aktivní forma MPF vlivem aktivační defosforylace těchto fosfátů pomocí cdc25 (Jones, 2004; Liang *et al.*, 2007) a současné fosforylace kinázou aktivující cdc (Cdc-activating kinase) na Thr161 (Whitaker, 1996). Aktivace cdc25 a spuštění této reakce je závislé na poklesu koncentrace cAMP a aktivity PKA (Kishimoto, 2003).

Podmínkou aktivace MPF je asociace cyklinu B s cdk2, která je již fosforylována na Thr161. Většina molekul cdk2 je v nezrajícím oocytu v monomerní formě, pouze 10 % je v asociaci s cyklinem B v komplexu pre-MPF. Aktivace MPF může být tedy způsobena přímou asociací s cdk2, kontrolou rovnováhy mezi Wee1/Myt1 a cdc25, nebo oběma uvedenými procesy současně (Liang *et al.*, 2007).

Aktivované MPF disponuje kinázovou aktivitou. Fosforylací příslušných proteinů způsobuje kondenzaci chromozomů, rozpad zárodečného váčku a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě dělicího vřeténka. Rozpad zárodečného váčku je zapříčiněn aktivitou MPF-kinázy, která fosforyluje proteiny laminy, čímž dochází k rozložení submembránové vrstvy laminových filamentů a tím k rozpadu jaderné membrány. Obdobně kináza fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly, které pak mění vlastnosti mikrotubulů tak, že mohou vytvořit dělicí vřeténko (Alberts *et al.*, 1998; Hurk *et Zhao*, 2005).

Vzrůst aktivity MPF je nezbytný pro znovuzahájení meiotického dělení oocytů. Maximální aktivity dosahuje MPF v metafázi I, s přechodem do druhého meiotického dělení aktivita klesá (Lee *et al.*, 2000). Aktivita MPF opět rychle vzroste, když vstoupí do meiózy II, a zůstává vysoká v oocytu zastaveném v metafázi II. Po následné fertilizaci MPF klesá, dokud zygota nevstoupí do prvního mitotického dělení, kdy MPF opět vzrůstá (viz obr. 4) (Lodish *et al.*, 2004).

Deaktivace MPF během přechodu z meiózy I do meiózy II se děje prostřednictvím proteolytické degradace cyklinu B1. Proces je regulován proteinovým komplexem Anaphase promoting complex/Cyclosome (APC/C), který ubiquitínuje cyklin B1. Ubiquitiny označený cyklin B1 je následně degradován pomocí UPS. APC/C současně degraduje také inhibitor anafáze protein securin, čímž dochází k oddělení sesterských chromatid a tím k průběhu anafáze I (Jones, 2005).

Mitogenem aktivovaná proteinkináza

Mitogenem aktivovaná proteinkináza (MAPK), známá také jako kináza regulovaná extracelulárním signálem (ERK - extracellular signal-regulated kinase), se řadí mezi serin/treoninové kinázy (Marshall, 1995; Whitaker, 1996; Inoue *et al.*, 1998). Na regulaci meiózy se uplatňují zejména izoformy ERK1 a ERK2 (Inoue *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2007).

Regulace aktivity MAPK je zprostředkována kaskádou fosforylačních reakcí. Přímý vliv na aktivaci MAPK má kináza MAPKK, označovaná také jako MEK. MAPKK aktivuje MAPK prostřednictvím fosforylace na serinových a treoninových zbytcích. MAPKK je regulována kinázou MAPKKK (Liang *et al.*, 2007).

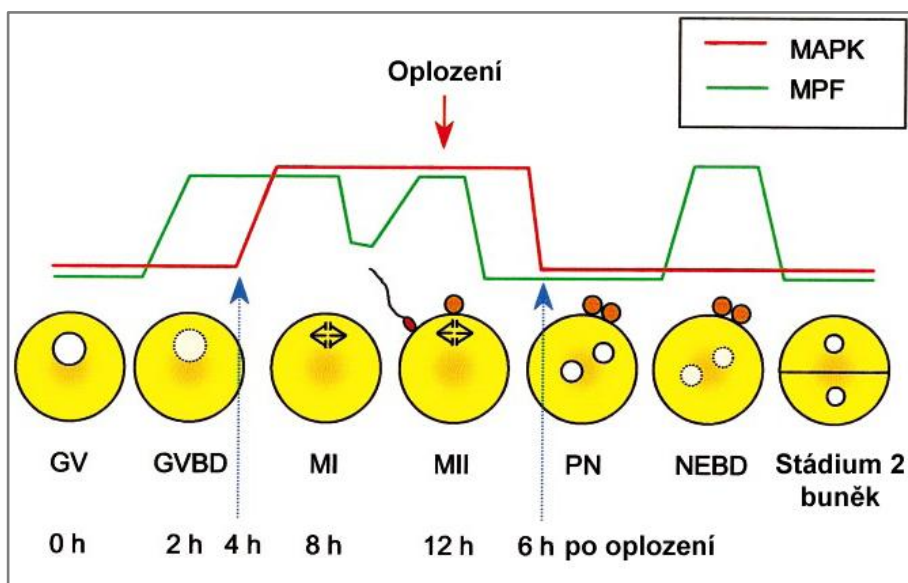
K aktivaci MAP-kinázové kaskády je nutná vazba extracelulárního signálu na receptor v plazmatické membráně buňky. Jako extracelulární signál fungují růstové faktory, hormony nebo cytokiny. Aktivátorem tzv. stresových MAP kináz však mohou být také jiné - patologické procesy, kam řadíme např. buněčný stres, tepelný šok, osmotickou disbalanci nebo DNA poškození (Garrington *et Johnson*, 1999).

Receptor má jednoduchou doménu procházející buněčnou membránou s intracelulárně orientovanou tyrozinkinázovou oblastí. Po navázání ligandu dochází k fosforylaci tyrozinkinázových oblastí a spuštění kaskády dalších fosforylačních reakcí. Prvním aktivovaným proteinem je Ras protein, který patří mezi malé G-proteiny (Ganong, 2005). Ras protein dále aktivuje Mos protein (MAPKKK). Mos spouští kinázu MAPK (MAPKK), která fosforyluje MAPK na serinových a treoninových zbytcích (Liang *et al.*, 2007; Ganong, 2005).

Vnitrobuněčná distribuce MAPK se během meiotického zrání oocyty dynamicky mění (viz obr. 4). V nezralých prasečích oocytech byla pozorována neaktivní forma MAPK již ve fázi růstu oocyty, lokalizována výlučně v cytoplazmě. V průběhu znovuzahájení meiotického dělení se část molekul MAPK přesouvá těsně před procesem GVBD do zárodečného váčku (Inoue *et al.*, 1998).

Moment aktivace MAPK je druhově specifický. U savčích oocytů je MAPK aktivována ve stejné chvíli, kdy probíhá proces GVBD, nebo krátce po ní. Zdá se, že u savčích oocytů není MAPK nezbytná pro aktivaci MPF a GVBD. Oproti tomu u jiných obratlovců, např. žab *Xenopus laevis*, probíhá GVBD až po aktivaci MAPK a MAPK je v tomto případě nutná k znovuzahájení meiotického zrání (Ye *et al.*, 2003; Hurk *et Zhao*, 2005).

Obr. 4. Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání oocyty (upraveno dle Fan *et al.*, 2004)



V savčích oocytech se MAPK uplatňuje v procesu meiotického zrání (Liang *et al.*, 2007). Mezi funkce MAPK patří spoluúčast na aktivaci MPF prostřednictvím pozitivní zpětné vazby na translaci cyklinu B, zabránění inhibiční fosforylace cdk2 a tak udržení její počáteční aktivity, MAPK se rovněž podílí na tvorbě a organizaci dělicího vřeténka (Fan *et al.*, 2002).

Mezi úrovní aktivity MAPK a translací cyklinu B existuje silná korelace. Ke zvýšení míry translace cyklinu B během znovuzahájení meiotického dělení dochází po uvolnění prvního meiotického bloku. MAPK je pro translaci cyklinu B nezbytná, jelikož prostřednictvím pozitivní zpětné vazby podporuje translaci mRNA cyklinu B. Mechanismus tohoto děje byl popsán u myši a u žab rodu *Xenopus* (Howard *et al.*, 1999).

MAPK se účastní také procesu inhibiční fosforylace cdk2. Inhibiční fosforylace cdk2 je připisována molekule Myt1. MAPK fosforyluje molekulu označovanou jako p90, která je následně schopna vázat C-terminální doménu molekuly Myt1. Touto inaktivací Myt1 pak může docházet k aktivaci komplexu cdk2/cyklin B (Palmer *et al.*, 1998).

Další funkce MAPK spočívá v regulaci tvorby dělicího vřeténka. Organizace dělicího vřeténka je jedním z kontrolních bodů buněčného cyklu a MAPK v tomto procesu fosforyluje struktury mikrotubuly organizujícího centra (MTOC). V případě nesprávně utvořeného dělicího vřeténka MAPK inhibuje pokles MPF, který je nutný pro přechod do anafáze. Komponenty MAPK-signální kaskády jsou také součástí cytotatického faktoru (CSF), který zapříčiňuje druhý meiotický blok v MII. CSF je komplex složený především z proteinových kináz, mezi jehož základní komponenty patří Mos, který se následně uplatňuje

v aktivaci signální kaskády MEK-MAPK-p90. Po oplození a dokončení meiózy přetrvává vysoká koncentrace MAPK až do momentu formování prvojádra, tj. až do S-fáze prvního cyklu mitotického dělení embrya (Fan *et al.*, 2002).

Důležitou roli v MAP-kinázové signální kaskádě sehraávají kumulární buňky. Během zrání oocytů byly molekuly regulátoru MAP-kinázové dráhy, tj. MAPKK, detekovány jak v oocytech, tak v kumulárních buňkách (Villa-Diaz *et Miyano*, 2004). Molekuly MAPKK pocházející z kumulárních buněk mají přímý vliv na oocyt a významným způsobem se podílejí na zrání oocytu (Meinecke *et Kirschek*, 2003; Villa-Diaz *et Miyano*, 2004).

Stejně jako MAPK1/2, také MAPKK se stávají aktivními okolo procesu rozpadu zárodečného váčku a udržují svoji aktivitu a činnost do metafáze II. Bylo zjištěno, že fosforylovaná MAPKK je akumulovaná v jádře před GVBD a lokalizovaná v cytoplazmě a okolo chromozomů během metafáze I až do dosažení metafáze II (Villa-Diaz *et Miyano*, 2004).

MAPKK v oocytech je tak nezbytná pro přechod meiózy I a II. MAPKK z kumulárních buněk je pak pravděpodobně zapojena v procesu FSH-indukovaného zahájení meiózy oocytů (Villa-Diaz *et Miyano*, 2004).

Vápenaté ionty

Vápenaté ionty (Ca^{2+}) patří mezi signální molekuly a druhé posly signálních kaskád. Regulace intracelulárního Ca^{2+} má velký biologický význam. Koncentrace Ca^{2+} v intersticiální tekutině je asi 12 000krát vyšší, než je koncentrace cytoplazmatická, takže je přítomen značný koncentrační i elektrický gradient směřující dovnitř buněk. Intracelulárními zásobárnami Ca^{2+} jsou především endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie, ze kterých může být Ca^{2+} mobilizováno kanály řízenými ligandem, a tím se koncentrace volného Ca^{2+} v cytoplazmě zvýší (Ganong, 2005).

Jednou z nejlépe prozkoumaných cest uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásobáren, je jeho uvolnění z ER. Tento proces je řízen buněčnou kaskádou, na jejímž počátku stojí extracelulární signální molekula, která se váže na receptor spojený s G-proteinem. G-protein aktivuje membránový enzym fosfolipázu C, která štěpí membránový inositolový fosfolipid na dvě mediátorové molekuly: inositol-1,4,5-trisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). IP_3 z plazmatické membrány difunduje do cytosolu, kde vazbou na ER otevírá Ca^{2+} kanály. DAG

zůstává připojený k plazmatické membráně, kde spolu s Ca^{2+} aktivují proteinkinázu C (Alberts *et al.*, 1998).

Zvýšená koncentrace cytoplazmatického Ca^{2+} se váže a aktivuje specifické proteiny vázající kalcium – kalmodulin, troponin nebo kalbindin (Ganong, 2005). Nejhojnější a nejběžnější z nich je kalmodulin (CaM). CaM při vazbě s Ca^{2+} mění svou konformaci a společně tvoří komplex, který se váže k cílovým proteinům a ovlivňuje jejich aktivitu. Hlavní cílovou skupinou pro kalmodulin jsou Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaM-kinázy) (Alberts *et al.*, 1998).

Ca^{2+} plní důležité funkce při regulaci meiotického zrání prostřednictvím měnící se koncentrace iontů v kumulárních buňkách a v oocytu. Po působení stimulačního faktoru - předovulační LH vlny - dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v kumulárních buňkách. Z kumulárních buněk je signál rychle přenášen do oocytu prostřednictvím gap junction a dochází ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v oocytu. Tento přenos signálu je zprostředkován pravděpodobně přímým přestupem Ca^{2+} přes gap junction či přestupem IP_3 a následným uvolněním Ca^{2+} (Mattioli *et al.*, 1998). Z buněk je Ca^{2+} čerpáno výměnou za dva H^+ Ca^{2+} - H^+ ATPázou nebo může být transportováno antiportem řízeným Na^+ gradientem, který přesune tři Na^+ za každé Ca^{2+} (Ganong, 2005). Z extracelulárního prostředí se Ca^{2+} do buňky transportuje prostřednictvím kanálů, které mohou být řízené ligandem či změnou elektrického napětí na membráně.

Zvýšená koncentrace Ca^{2+} v oocytu spouští další buněčné kaskády, které ve svém důsledku způsobí znovuzahájení meiotického zrání. Tyto kaskády jsou zacíleny na regulátory meiotického zrání – AC a MPF. (Fan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2013). AC i MPF jsou regulovány prostřednictvím působení Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaMKII) (Horner *et al.*, 2003; DiLuigi *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2013). Aktivní CaMKII způsobuje inaktivaci AC (Horner *et al.*, 2003; DiLuigi *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013) a je současně nutná ke správné funkci MPF. Prasečí oocyty, které měli CaMKII inaktivovanou nedokázali akumulovat regulační podjednotku – cyklin B a nemohly tak znovuzahájit meiózu (Fan *et al.*, 2003).

Také v kumulárních buňkách má zvýšená koncentrace Ca^{2+} svou funkci. Ca^{2+} aktivuje MAPK dráhu, která se účastní sekrece estrogenu a progesteronu, a také expresi parakrinních faktorů, které ovlivňují zrání oocytů (Yu *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2007; Ebeling *et al.*, 2011).

Ionty Ca^{2+} se také účastní procesů spojených s oplozením – exocytózy kortikálních granul zabraňujících polyspermii, a vydělení druhého pólového tělíska (Fan *et al.*, 2003).

Zinek

Nedávno bylo prokázáno, že také zinek (Zn) plní v buňkách funkci intracelulárního druhého posla (Yamasaki *et al.*, 2007; Bernhardt *et al.*, 2011).

Mechanismus kaskády, která vede k uvolnění zinku, byl poprvé popsán u žírných buněk imunitního systému. Vazba extracelulárního signálu na receptor v buněčné membráně indukuje uvolnění volného zinku z perinukleární oblasti, včetně ER, a dochází ke zvýšení jeho intracelulární koncentrace. Tento jev je označován jako zinková vlna (zinc wave). Zdá se, že proces uvolnění zinku je závislý na přílivu vápníku a úzce souvisí s MAP-kinázovou signální kaskádou (Yamasaki *et al.*, 2007).

Spojitosť mezi Zn a Ca^{2+} byla nalezena také při studiu oocytů (Kim *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). V původních experimentech měly oocyty kultivované v podmínkách omezené dostupnosti Zn porušenou oscilaci Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2010). V novější studii bylo zjištěno, že za fyziologických podmínek vlna uvolněného Ca^{2+} předchází zinkové vlně (Kim *et al.*, 2011).

Dle aktuálních poznatků se Zn významně podílí na regulaci meiotického zrání. Zvýšení intracelulární koncentrace Zn v oocytu v období prvního meiotického bloku zabraňuje předčasnému rozpadu GVBD (Kong *et al.*, 2012). Zn je současně nutný pro dokončení meiotického zrání (Kim *et al.*, 2010; Bernhardt *et al.*, 2011), pro dosažení a udržení druhého meiotického bloku (Kim *et al.*, 2011), kdy se Zn podílí na regulaci aktivity CSF (Bernhardt *et al.*, 2012).

Hladina Zn v oocytu během období zrání je regulována prostřednictvím interakcí mezi oocytem a kumulárními buňkami ve folikulu. Bylo zjištěno, že kumulární buňky snižují hladinu volného Zn v oocytu před ovulací (Lisle *et al.*, 2013).

2.2 Kumulární expanze

Oocyt je ve folikulu obklopen kompaktním obalem kumulárních buněk vejconosného hrbolku, které společně s oocytem vytvářejí kumulo-oocytární komplex (COC). Tento komplex podléhá během meiotického zrání oocyty výrazným biochemickým a strukturálním změnám. Prostřednictvím kumulárních buněk jsou v preovulačním Graafově folikulu syntetizovány strukturální složky extracelulární matrix (ECM) kumulárních buněk, čímž dochází k nabývání ECM a tím ke zvětšování celého COC. Tento proces je označován jako kumulární expanze (Dekel *et al.*, 1979).

ECM je tvořena glykosaminoglykany (GAG) - především hyaluronovou kyselinou (Nakayama *et al.*, 1996; Mlynářčiková *et al.*, 2009). Oproti jiným tkáním je výrazně méně zastoupen GAG chondroitin sulfát, popř. keratin sulfát a další (Nakayama *et al.*, 1996). Významnou složkou ECM jsou proteiny, které se podílejí na utváření a stabilizaci ECM (Mlynářčiková *et al.*, 2009).

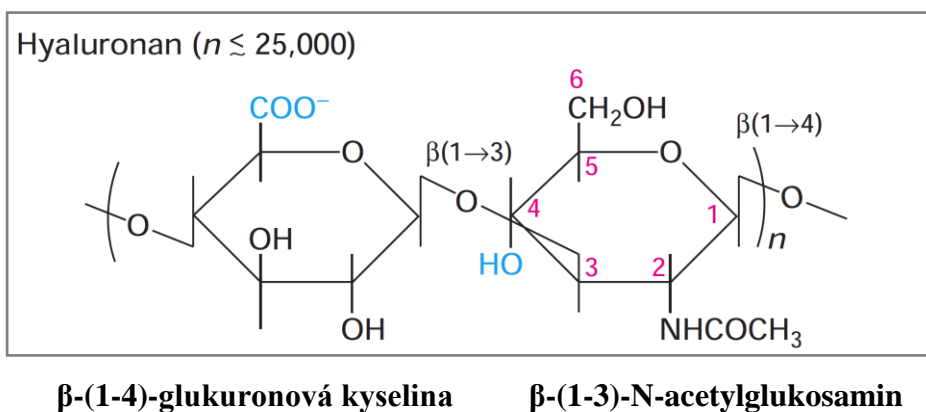
Kumulární expanze reguluje zrání oocyty v *in vitro* podmínkách. Bylo zjištěno, že intenzita kumulární expanze pozitivně koreluje s *in vitro* zráním oocyty (Qian *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu je pro úspěšné zrání oocyty *in vitro* vhodné vybírat oocyty s dostatečným a neporušeným obalem kumulárních buněk (Karja, 2008). Kvalita obalu kumulárních buněk obklopujících oocyt je rozhodující pro úspěšnost meiotického zrání oocytů (Eppig, 1982; Sun *et al.*, 2003). Kumulární buňky se rovněž podílejí na ochraně oocyty před oxidativním stresem prostřednictvím regulace glutathionu (Tatemoto *et al.*, 2000).

V průběhu kumulární expanze dochází k zániku buněčných propojení mezi oocytem a kumulárními buňkami. V důsledku toho je oocyt izolován od inhibičních látek, jako jsou cAMP a cGMP, pocházejících z kumulárních buněk (Chen *et al.*, 1990). Omezení toku inhibičních látek do oocyty je nezbytné pro znovuzahájení meiotického zrání a GVBD (Šutovský *et al.*, 1994). Přerušení spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami se děje mechanickou cestou, kdy vlivem nabývání složek ECM dochází k postupnému oddalování kumulárních buněk. Možné je také aktivní uzavření gap junction prostřednictvím fosforylace, kterou katalyzují interakce CD44-HA (Yokoo *et al.*, 2010).

2.2.1 Hyaluronová kyselina

Hyaluronová kyselina (HA) patří mezi bezsulfátové GAG složené z disacharidových podjednotek β -(1-4)-glukuronové kyseliny a β -(1-3)-N-acetylglukosaminu (viz obr. 5). Disacharidové podjednotky tvoří polymery HA, jejichž délka může nabývat od několika disacharidových opakování až do 25 000. Velikost molekuly se liší podle tkáně, ve které se vyskytuje. Polymer HA má zpravidla okolo 10 000 opakování a celkovou hmotnost 4×10^6 Da (Lodish *et al.*, 2004).

Obr. 5. Struktura disacharidové podjednotky kyseliny hyaluronové (upraveno dle Lodish *et al.*, 2004)



HA je biologicky významný polymer, který je široce distribuován v ECM pojivové tkáně těla, a účastní se např. procesů hojení ran (Banerjee *et Toole*, 1992), přeskupování buněk ve tkáních (Ellis *et al.*, 1997) nebo tvorbě metastáz (Zhang *et al.*, 1995). V samičím reprodukčním systému se uplatňuje při regulaci meiotického zrání oocyty (Yokoo *et al.*, 2010), kumulární expanze (Chen *et al.*, 1993) a ovulace oocytů (Hess *et al.*, 1999).

Syntézu HA katalyzuje membránově vázaný enzym hyaluronan-syntáza (Weigel *et al.*, 1997). V savčích kumulo-oocytárních komplexech byly dosud identifikovány tři izoformy tohoto enzymu: hyaluronan-syntáza 1 (has1), hyaluronan-syntáza 2 (has2) a hyaluronan-syntáza 3 (has3) (Spicer *et al.*, 1996; Spicer *et al.*, 1997; Itano *et al.*, 1999). V prasečích kumulo-oocytárních komplexech byly detekovány izoformy hyaluronan-syntázy has2 a has3. Has2 se uplatňuje při procesu syntézy HA během kumulární expanze a je produkován v kumulárních buňkách. Has3 je produkován v oocytech (Kimura *et al.*, 2002).

Pro udržení funkčnosti HA je nezbytné zachovat její vysoce strukturovaný polymer. Oproti jiným GAG není HA spojena s ostatními proteiny ECM ani s jinými složkami na bázi

sulfátu. Z tohoto důvodu HA potřebuje hyaluronovou kyselinu vázající proteiny (HABP – hyaluronic acid-binding protein) (Yokoo *et al.*, 2002).

V prasečích kumulo-oocytárních komplexech byla prokázána exprese mRNA pro molekulu CD44. CD44 je membránový receptor pro HA a patří mezi HABP, které se v prasečích oocytech uplatňují během meiotického zrání (Kimura *et al.*, 2002). Interakce mezi HA a CD44 během kumulární expanze jsou důležité pro zrání oocyty (Kimura *et al.*, 2002; Yokoo *et al.*, 2002; Yokoo *et al.*, 2007). Úloha CD44-HA v regulaci CE není dosud plně objasněna.

Dalším HABP uplatňujícím se v kumulární expanzi je protein asociovaný s HA (SHAP – serum-derived hyaluronan-associated protein) (Zhuo *et al.*, 2001; Yokoo *et al.*, 2007). SHAP vytváří s HA kovalentní vazby, které hrají klíčovou roli ve formování a stabilitě hyaluronové matrix během kumulární expanze (Zhuo *et al.*, 2001). SHAP byl detekován také v prasečím séru a folikulární tekutině (Nagyová *et al.*, 2004).

HA je degradována extracelulárními enzymy – hyaluronidázami, které fyziologicky snižují množství HA v ECM různých tkání (Lodish *et al.*, 2004). Existují tři hlavní skupiny hyaluronidáz, které se navzájem odlišují mechanismem štěpení HA. Dvě z těchto skupin jsou endo- β -N-acetyl-hexominidázy. První skupina zahrnuje enzymy obratlovců, které zpracovávají substrát hydrolýzou, možné jsou u nich také transglykosylační reakce. Druhá skupina je převážně bakteriální. Zahrnuje eliminázy, které fungují pomocí β -eliminace glykosidické vazby za tvorby nenasycené dvojné vazby. Tyto enzymy jsou také označovány jako lyázy. Třetí skupinou jsou endo- β -glukuronidázy, které se nacházejí např. u pijavic nebo některých korýšů. Enzymy této skupiny štěpí substrát podobně jako hyaluronidázy obratlovců hydrolýzou (Stern et Jedrzejak, 2006).

2.2.2 Regulace kumulární expanze

Hormonální regulace kumulární expanze v podmínkách *in vivo* je řízena gonadotropními hormony FSH a LH (Eppig, 1980). FSH a LH působí na kumulární buňky prostřednictvím buněk granulózy, které jsou těmito hormony přímo ovlivňovány (Motlík *et al.*, 1998).

Předovulační vlna LH aktivuje proteázy v granulózních buňkách, které jsou schopné svou činností aktivovat růstový diferenciacní faktor 9 (GDF-9 – growth differentiation factor-

9). GDF-9 působí na kumulární buňky, kde aktivuje enzym *has2*, a tím spouští sekreci HA. Zároveň GDF-9 aktivuje enzym cyklooxygenázu-2, která je zodpovědná za syntézu prostaglandinu E2. Po vazbě prostaglandinu E2 na příslušné receptory se popsaná kaskáda rovněž účastní kumulární expanze (Richards *et al.*, 2002).

FSH spouští kaskádu buněčných reakcí, které se podílejí na indukci enzymu *has2* a tím na kumulární expanzi (Salustri, 2000). FSH stimuluje také produkci plazminogenového aktivátoru urokinázového typu (uPA) v granulózních buňkách (Strickland *et Beers*, 1976; Reich *et al.*, 1985; Salustri, 2000). uPA štěpí plazminogen na aktivní proteázu plazmin, který se podílí na uvolnění oocyty od stěny folikulu během ovulace (Strickland *et Beers*, 1976). uPA tímto způsobem přeměňuje preovulační folikuly na ovulační (Salustri, 2000).

Lze předpokládat, že obě tyto reakce, stimulace *has2* i uPA, jsou indukovány totožnou buněčnou kaskádou. Po FSH stimulu dochází k tvorbě cAMP a k aktivaci PKA, která aktivuje transkripční faktory (Salustri, 2000). O tom, zda transkripční faktory spustí transkripci mRNA *has2* nebo mRNA uPA, rozhoduje faktor pocházející z oocyty (Canipari *et al.*, 1995; Salustri, 2000). Tímto faktorem je pravděpodobně GDF-9, který stimuluje transkripci mRNA *has2* a naopak inhibuje transkripci mRNA uPA (Elvin *et al.*, 1999; Dragovic *et al.*, 2005).

Ačkoliv se oocyt přímo nepodílí na kumulární expanzi sekrecí HA, účastní se regulace kumulární expanze (Salustri, 2000). Regulace se účastní faktory označované jako kumulární expanzi aktivující faktory (CEEF – cumulus expansion-enabling factor) (Procházka *et al.*, 1998). Tyto faktory jsou schopné tvořit pouze plně dorostlé oocyty (Vanderhyden *et al.*, 1990; Buccione *et al.*, 1990; Eppig *et al.*, 1993). CEEF zahrnuje několik dílčích faktorů a je nezbytný pro kumulární expanzi myších oocytů (Buccione *et al.*, 1990), zatímco u prasečích oocytů není přímo vyžadován a kumulární expanze probíhá i bez tohoto faktoru (Vanderhyden, 1993; Procházka *et al.*, 1998). Pokud je však z prasečího kumulo-oocytárního komplexu odstraněn oocyt, nastává významné potlačení kumulární expanze vlivem snížené syntézy HA (Nakayama *et al.*, 1996). U prasat probíhá produkce CEEF také prostřednictvím kumulárních a granulózních buněk, a dochází tak ke společné stimulaci kumulární expanze oocytem a kumulárními buňkami současně (Nagyová *et al.*, 1999).

Parakrinní regulace kumulární expanze je zprostředkována především folikulární tekutinou, která významně reguluje zrání oocytů a kumulární expanzi v podmínkách *in vivo* (Yoshida *et al.*, 1992). Do syntézy hormonů folikulární tekutiny je zapojen FSH, jehož intrafolikulární koncentrace pozitivně koreluje s koncentrací estradiolu a progesteronu ve folikulu (Rosen *et al.*, 2009). Mezi složky folikulární tekutiny, které mají pozitivní vliv

na kumulární expanzi, patří CEEF (Nagyová *et al.*, 1999), epidermální růstový faktor (EGF – epidermal growth factor) (Ježová *et al.*, 2001) a inzulinu podobný růstový faktor (IGF – insuline-like growth factor) (Němcová *et al.*, 2007). Do parakrinních regulátorů je možné zařadit i látky krevního séra s vysokou molekulovou hmotností (nad 10 kDa) (Eppig, 1980), které stabilizují HA v expandovaném kumulo-oocytárním komplexu (Camaioni *et al.*, 1993).

Další regulační molekulou uplatňující se při procesu kumulární expanze je oxid dusnatý. U kumulo-oocytárních komplexů ovcí byl popsán efekt, kdy byla fyziologická produkce oxidu dusnatého nezbytná pro kumulární expanzi (Amale *et al.*, 2011).

2.2.3 Hodnocení kumulární expanze

Protože je kumulární expanze významným ukazatelem zrání oocyty, je snaha ji hodnotit. Kumulární expanzi lze hodnotit vizuálně na základě zařazení kumulo-oocytárního komplexu do jedné ze tříd dle intenzity kumulární expanze podle Tao *et al.* (2005). Skupiny pro orientační zařazení kumulo-oocytárního komplexu jsou definovány následovně:

1. třída: kumulo-oocytární komplexy s kompletní expanzí ve všech vrstvách kumulárních buněk
2. třída: kumulo-oocytární komplexy s částečnou expanzí (zejména vnějších vrstev kumulárních buněk)
3. třída: kumulo-oocytární komplexy bez kumulární expanze.

Více sofistikované je stanovení plochy expandovaného kumulu metodou výpočtu dle Dean *et al.* (1994). Při této metodě se předem zhotovené snímky kumulo-oocytárních komplexů podrobí výpočtu plochy dle vzorce:

$$\text{Plocha [mm}^2\text{]} = \text{délka} \times \text{šířka} \times 0,7854.$$

Za délku dosazujeme vzdálenost mezi dvěma nejvzdálenějšími body kumulu v mm, za šířku pak vzdálenost mezi dvěma nejbližšími body kumulu v mm (Dean *et al.*, 1994). V současné době je rovněž možné pro výpočet plochy kumulo-oocytárního komplexu využít softwarové analýzy obrazu.

Výhodou obou výše zmíněných metod je neinvazivní analýza vzorků během *in vitro* kultivace. Obě tyto metody ale nepostihují prostorové struktury kumulo-oocytárních komplexů a jsou rovněž zatíženy rizikem chyby vlivem subjektivního hodnocení.

Exaktnější údaje o kumulární expanzi poskytují metody měření obsahu glykosaminoglykanů. Metody měření obsahu glykosaminoglykanů vycházejí z fyziologického

poznatku, že během kumulární expanze dochází k přibývání obsahu glykosaminoglykanů v kumulo-oocytárním komplexu. Nejvhodnějším GAG pro stanovení kumulární expanze je HA. Měřením obsahu HA je možné postihnout trojrozměrnou strukturu expandovaného kumulu a tím precizněji změřit skutečnou produkci HA.

Stanovení obsahu HA je možné radioaktivním označením prekurzorů syntézy HA (Eppig, 1980). Jako prekurzor HA může být použit [³H]glukosamin. Množství HA je určováno prostřednictvím radioaktivního signálu, který je emitován prekurzory HA (Solursh, 1976).

Mezi další postupy stanovení množství HA, patří spektrofotometrické měření koncentrace štěpných produktů HA (Chen *et al.*, 2005), imunologické metody stanovení koncentrace HA metodou ELISA (Kongtawelert *et Ghosh*, 1990) nebo kapalinová chromatografie (Volpi, 2000). Dosud není obvyklé analytické stanovení produktů β -eliminace pomocí spektrofotometrie.

Analytické metody stanovení HA jsou spolehlivé a přesné, ale u oocytů narážejí na nutnost izolace HA z matrice ECM, jelikož polymery HA jsou vázány na membrány buněk (Yokoo *et al.*, 2002).

3 Hypotéza a cíle práce

Byla stanovena hypotéza, že pro hodnocení kumulární expanze je možné využít měření obsahu hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech prasete pomocí imunologických a analytických metod a že obsah hyaluronové kyseliny je markerem průběhu meiotického zrání.

Cílem práce bylo:

- a) optimalizovat dostupné analytické metody měření hyaluronové kyseliny pro přesné hodnocení kumulární expanze u prasečích oocytů;
- b) ověřit závislost obsahu HA v kumulo-oocytárních komplexech prasete na fázi meiotického zrání.

4 Materiál a metodika

4.1 Získávání a kultivace kumulo-oocytárních komplexů

Kumulo-oocytární komplexy byly získávány aspirací z vaječníků prepubertálních prasniček poražených na nedalekých jatkách. Z jatek byly vaječnky dopraveny do laboratoře ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) při teplotě 39 °C. Izolovány byly folikuly o průměru 2 – 5 mm injekční stříkačkou a jehlou 20G. Ze získané folikulární tekutiny byly pod stereomikroskopem vybrány kumulo-oocytární komplexy s kompaktní vrstvou kumulárních buněk a oocyty s nepoškozenou cytoplazmou.

Vybrané kumulo-oocytární komplexy byly opláchnuty v kultivačním médiu a následně kultivovány v modifikovaném médiu M199 (Sigma-Aldrich, USA) ve sterilních 4 – důlkových miskách (Nunc, Denmark), v termoboxu s řízenou atmosférou při 39 °C a 5% CO₂, po dobu 12 hod. – 48 hod. Kultivační médium bylo modifikováno přidávkem NaHCO₃ (32,5 mM), laktátu vápenatého (2,75 mM), HEPES (6,3 mM), gentamycinu (0,025 mg/ml), 5% (v/v) fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, USA) a gonadotropních hormonů eCG a hCG v poměru 13,5 I.U. : 6,6 I.U./ml (P.G.600; Intervet, Holland).

4.2 Příprava vzorků z kumulo-oocytárních komplexů pro měření hyaluronové kyseliny

Po ukončení kultivace byly kumulo-oocytární komplexy 4x opláchnuty ve 450 μl PBS-PVA ve sterilních 4 – důlkových miskách (Nunc, Denmark) pomocí 50 μl automatické pipety. Po zbavení oocytů kumulárních buněk a expandovaného kumulu opakovaným nasáváním a vysáváním tenkostěnnou kapilárou byly oocyty ze vzorku odstraněny. 500 μl PBS-PVA s kumuly bylo kvantitativně přeneseno do 1,5ml mikrozkušavky Eppendorf a skladováno při -20 °C do digesce.

Po rozmrazení byl vzorek vystaven digesci lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus* (20 μl/ml; Sigma-Aldrich, USA) po dobu 2 hod. při 39 °C. Skladování probíhalo při -20 °C do proměření.

Před proměřením byly vzorky centrifugovány 5 min. 10 000 rpm, při 4 °C. Proměření probíhalo na spektrofotometru Helios Epsilon (Verkon, Czech Republic) při 216 nm proti slepému vzorku PBS-PVA s lyázou ze *Streptomyces hyalurolyticus*.

4.3 Příprava vzorků z kultivačního média pro měření hyaluronové kyseliny

Pro kontrolu uvolňování HA během kultivace kumulo-oocytárních komplexů bylo analyzováno kultivační médium odebrané po ukončení kultivace.

Kultivační médium bylo po odstranění expandovaných kumulo-oocytárních komplexů vystaveno přímo ve 4 – důlku digesci proteázou (1 µl/ml) při 39 °C v 5% CO₂ přes noc. Následně bylo médium přefiltrováno pomocí ultrafiltrů Microcon Ultracel-30 (Millipore, USA) 30 min. 14 000 rpm, při 4 °C.

Vysokomolekulární HA zachycená na ultrafiltru byla štěpena lyázou (20 µl/ml; Sigma-Aldrich, USA) ve 250 µl PBS. Inkubace probíhala při 39 °C a 5% CO₂ po dobu 2 hod. Ultrafiltr byl následně centrifugován 30 min. 14 000 rpm, při 4 °C a opláchnut 250 µl PBS a centrifugací 30 min. při 14 000 rpm, při 4 °C. Vzorek byl skladován při -20 °C do proměření.

Vzorek byl spektrofotometricky proměřen při 216 nm proti slepému vzorku (500 µl PBS).

4.4 Stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny metodou ELISA

Měření koncentrace hyaluronové kyseliny (HA) bylo použito k vyjádření kumulární expanze kumulo-oocytárních komplexů. Ke stanovení koncentrace HA metodou ELISA byl použit komerčně dostupný kit QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay (Biotech Trading Partners, USA). Protokol je přiložen v příloze.

Po ukončení kultivace byly oocyty zbaveny expandovaných kumulů. Pro uvolnění HA z extracelulární hmoty expandovaných kumulů bylo použito proteolytického štěpení transmembránových proteinů stabilizujících HA v cytoplazmatické membráně kumulárních buněk. Expandované kumuly byly nejprve vystaveny účinku 30 μ l proteázy z *Aspergillus oryzae* (1:100; Novozymes, Denmark) a inkubovány 2 hod. při 45 °C. Následně byly expandované kumuly inkubovány s 30 μ l proteázy z *Bacillus licheniformis* (1:100; Novozymes, Denmark) další 3 hod. při 45 °C. Po ukončení kultivace byl vzorek centrifugován 15 min. při 10 000 rpm. Supernatant byl odebrán a dále zpracován. Současně byl připraven vzorek kultivačního média pro kontrolu uvolňování HA do média během kultivace kumulo-oocytárních komplexů.

Koncentrace HA byla zjišťována v získaném supernatantu a v kultivačním médiu. Nejprve byly připraveny standardy HA, které byly spolu se vzorky a kontrolami 10x naředěny Reaction pufrem. Do jamek ELISA destičky bylo napipetováno po 100 μ l naředěných standardů HA, vzorků a kontrol. Inkubace probíhala 60 min. při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace a vylití nenavázaného obsahu jamek, byly jamky 4x promyty PBS. Do jamek bylo přidáno 100 μ l roztoku HRP+HABP (Horseradish Peroxidase + Hyaluronate binding protein). Následovala inkubace 30 min. při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 4x promyty PBS a do jamek bylo napipetováno 100 μ l Substrate roztoku. Inkubace probíhala 30 min. při laboratorní teplotě. Na závěr bylo přidáno 100 μ l Stopping roztoku.

Koncentrace HA byla stanovována spektrofotometricky při 450 nm proti slepému vzorku. Pro odečet koncentrace byla použita kvadratická kalibrační křivka. Hodnoty koncentrace HA byly vyjádřeny relativně k celkovému obsahu HA v kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace.

4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny

Koncentraci hyaluronové kyseliny (HA) je možno stanovit na základě spektrofotometrického měření koncentrace štěpných produktů β -eliminace glykosidické vazby za tvorby nenasycené vazby absorbující světlo v UV spektru.

Pro optimalizaci metody spektrofotometrického stanovení koncentrace HA bylo použito zásobního 1% roztoku vysokomolekulární HA v PBS (Contipro Group, Czech Republic). Standardní roztoky 0,1 – 0,0015% HA byly připraveny rozředěním zásobního roztoku v PBS (0,1M fosfátový pufr), PBS-PVA (0,1% polyvinylalkohol v PBS), kultivačním médiu M199 s fenolovou červení (Sigma-Aldrich) a kultivačním médiu Dulbecco M199 bez fenolové červeně (Life Technologies, USA). Standardní roztoky HA byly podrobeny štěpení pomocí lyázy z *Pseudomonas acnes* (22,5 I.U./ml; Contipro Group, Czech Republic), lyázy *Streptomyces hyalurolyticus* (300 I.U./ml; Sigma-Aldrich, USA) a bovinní testikulární hyaluronidázy (400-1000 I.U./ml; Sigma-Aldrich, USA). Inkubace s enzymem v poměru 1:100 probíhala v podmínkách řízené atmosféry 39 °C, 5% CO₂ po dobu 2 hod.

Po inkubaci byly vzorky skladovány při -20 °C do proměření. Spektrofotometrické měření probíhalo při vlnové délce 190 nm – 280 nm pomocí spektrofotometru Helios Epsilon (Verkon, Czech Republic). Pro odečet koncentrace byla použita kalibrační křivka. Hodnoty koncentrace HA byly vyjádřeny relativně k celkovému obsahu HA v kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace.

4.6 Statistická analýza

Všechny experimenty byly zopakovány minimálně 3x. Pro každý případ byl vypočten celkový obsah HA (HA – celková) jako součet obsahu HA z COCs (HA – COCs) a obsahu HA z kultivačního média. Celkový obsah HA po 48 hod. kultivace představuje 100 %. Pro výsledné srovnání byly hodnoty koncentrace HA vyjádřeny relativně k celkovému obsahu HA v kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace.

Získané výsledky byly podrobeny statistické analýze v programu SAS 9.1 za užití analýzy rozptylu (ANOVA, t-test). Rozdíly s P-hodnotou menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

5 Výsledky

5.1 Analytické stanovení hyaluronové kyseliny

Spektrofotometrická metoda stanovení hyaluronové kyseliny (HA) v expandovaném kumulo-oocytárním komplexu (COC) nepatří mezi standardně zavedené metody měření kumulární expanze. Z tohoto důvodu bylo nutné metodu optimalizovat a přizpůsobit specifickým požadavkům tkáně expandovaného kumulu.

5.1.1 Stanovení optimální kombinace enzym - médium

Pro optimalizaci metody pro analytické stanovení HA v kumulo-oocytárních komplexech byly testovány vhodné kombinace enzymů schopné digesce vysokomolekulární HA a média vhodného pro manipulaci s kumulo-oocytárnými komplexy (viz tabulka 1). V experimentu tak byly testovány enzymy běžně používané pro štěpení HA: lyáza z *Pseudomonas acnes*, lyáza ze *Streptomyces hyalurolyticus* a bovinní testikulární hyaluronidáza.

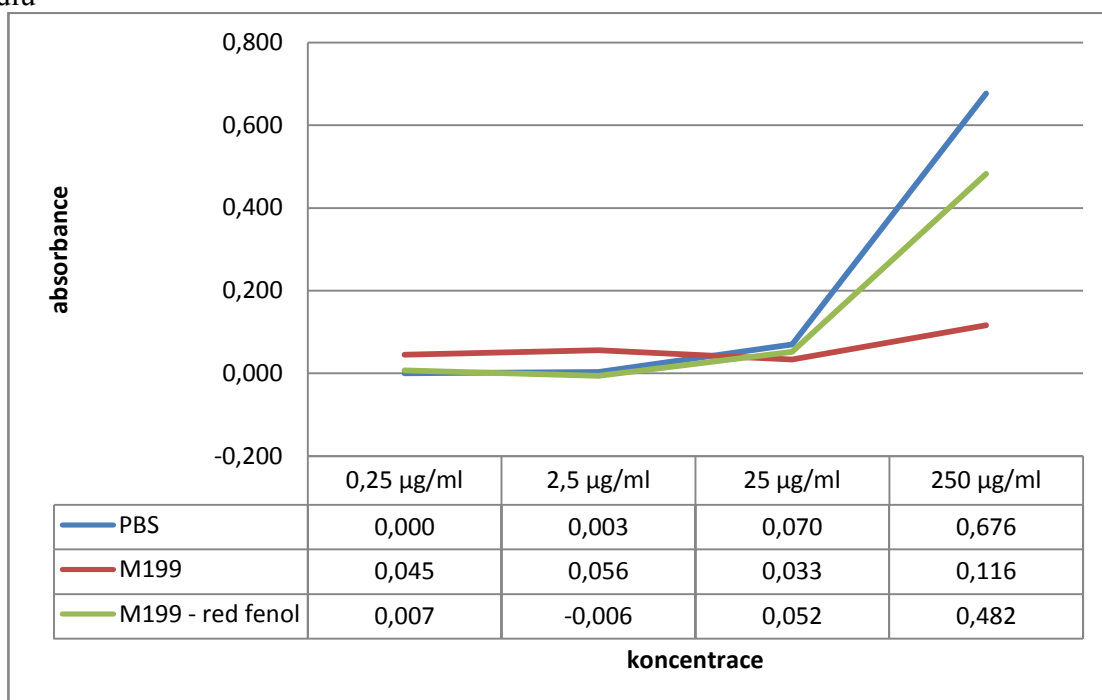
Tabulka 1. Přehled testovaných enzymů a médií

Enzym:	Médium:
Lyáza z <i>Pseudomonas acnes</i>	PBS
Lyáza ze <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Médium M199
Bovinní testikulární hyaluronidáza	Médium M199 bez fenolové červeně

Kalibrační řady HA připravené v kultivačních médiích a čistém fosfátovém pufru byly spektrofotometricky proměřeny v UV oblasti při vlnové délce 232 nm, stanovené na základě předchozích konzultací (P. Klein, pers. comm.).

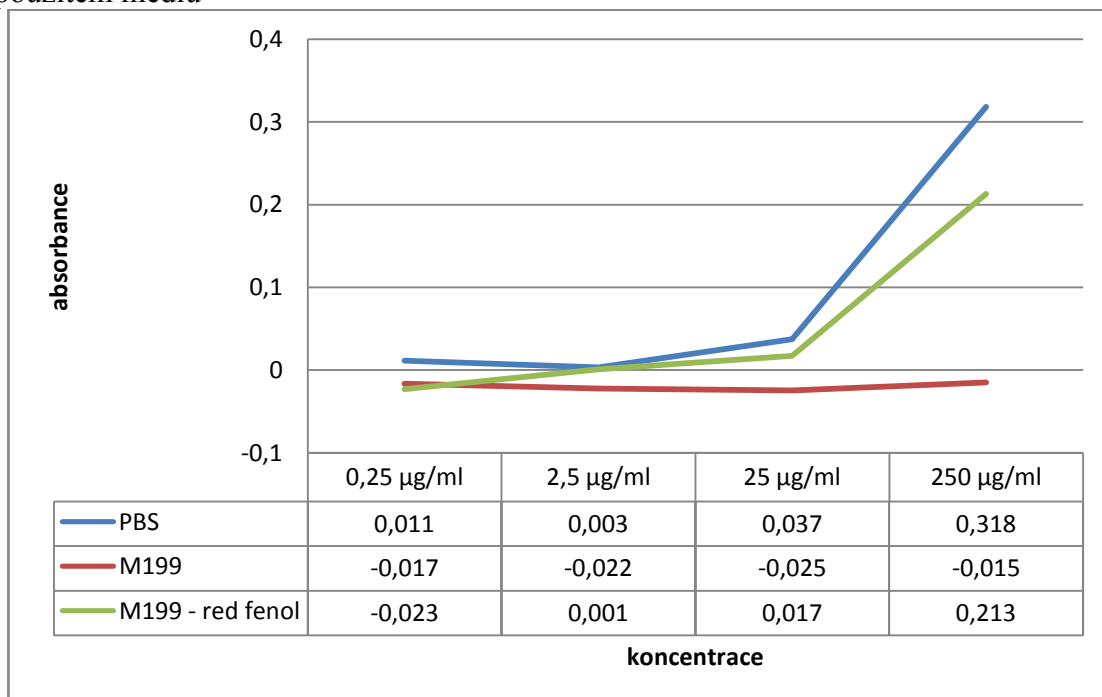
Nejvyšší koncentrace produktů β -eliminace byly naměřeny po digesci standardního roztoku 250 $\mu\text{g/ml}$ HA lyázou *P. acnes* ve fosfátovém pufru (graf 1). V ostatních médiích byla schopnost spektrofotometrického proměření nižší (graf 1-3). Enzymem s nejvyšší účinností v PBS byla lyáza *P. acnes* (graf 4).

Graf 1. Účinek enzymu lyázy z *Pseudomonas acnes* při štěpení HA v závislosti na použitém médiu



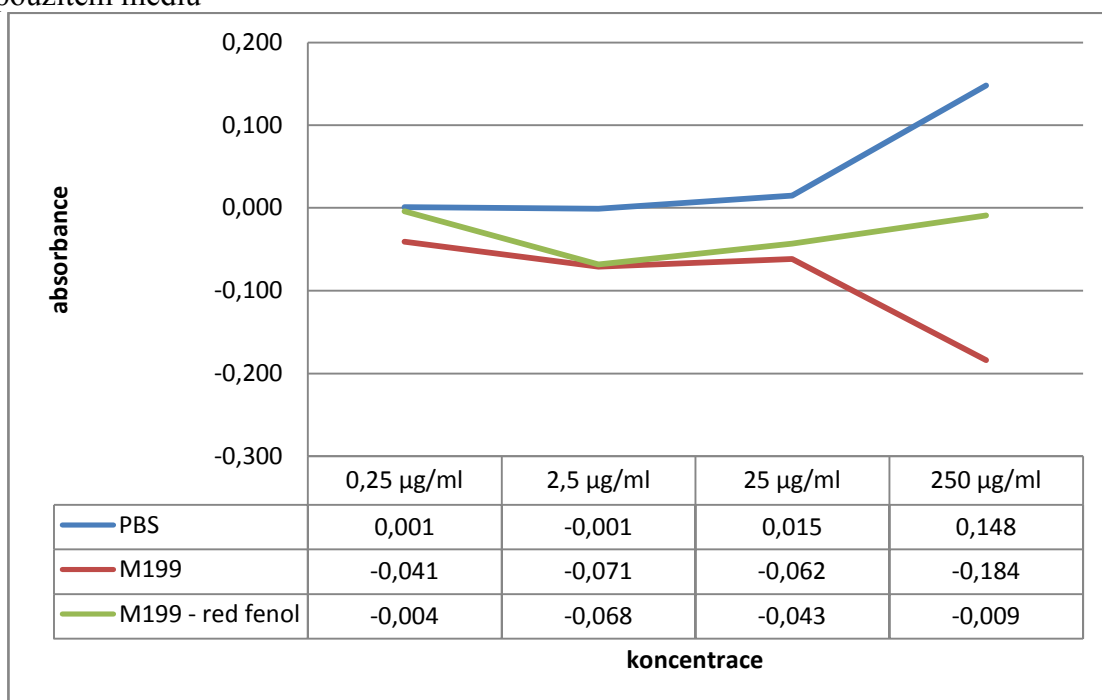
Účinek enzymu lyáza z *Pseudomonas acnes* je vyjádřen absorbcí štěpných produktů enzymu v médiích PBS, M199 a M199 bez fenolové červeně.

Graf 2. Účinek enzymu lyázy ze *Streptomyces hyalurolyticus* při štěpení HA v závislosti na použitém médiu



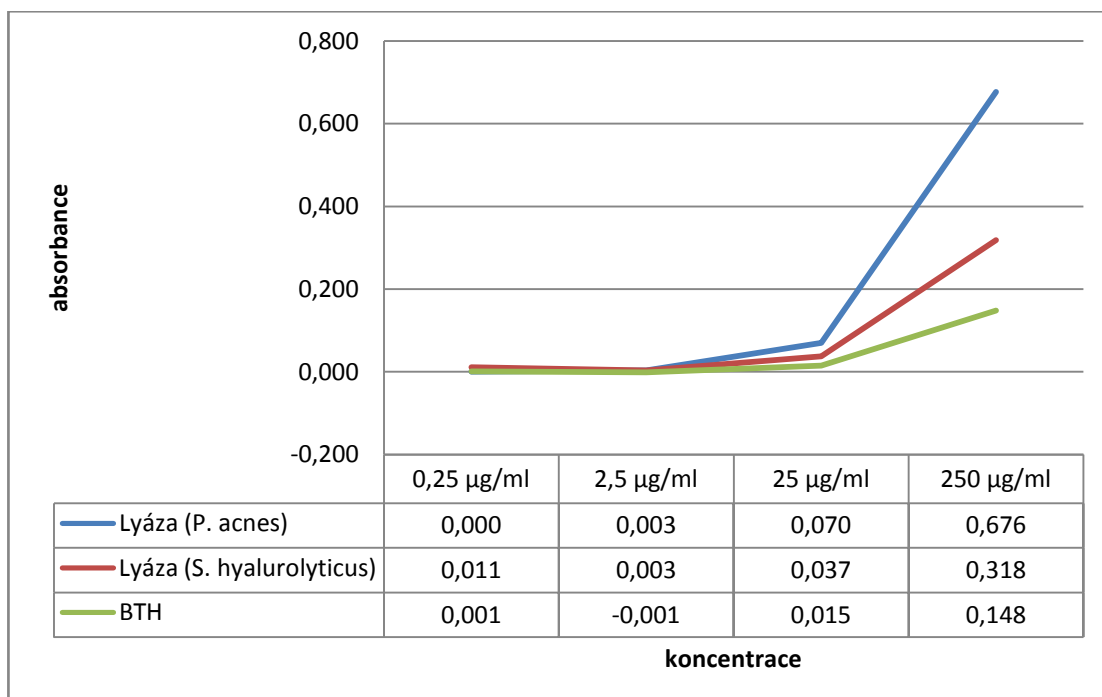
Účinek enzymu lyáza ze *Streptomyces hyalurolyticus* je vyjádřen absorbcí štěpných produktů enzymu v médiích PBS, M199 a M199 bez fenolové červeně.

Graf 3. Účinek enzymu bovinní testikulární hyaluronidázy při štěpení HA v závislosti na použitém médiu



Účinek enzymu bovinní testikulární hyaluronidázy je vyjádřen absorbcí štěpných produktů enzymu v médiích PBS, M199 a M199 bez fenolové červeně.

Graf 4. Porovnání účinku enzymů v médiu PBS při štěpení HA



Účinek enzymů lyázy z *P. acnes*, lyázy ze *S. hyalurolyticus* a bovinní testikulární hyaluronidázy je vyjádřen absorbcí štěpných produktů příslušného enzymu v médiu PBS.

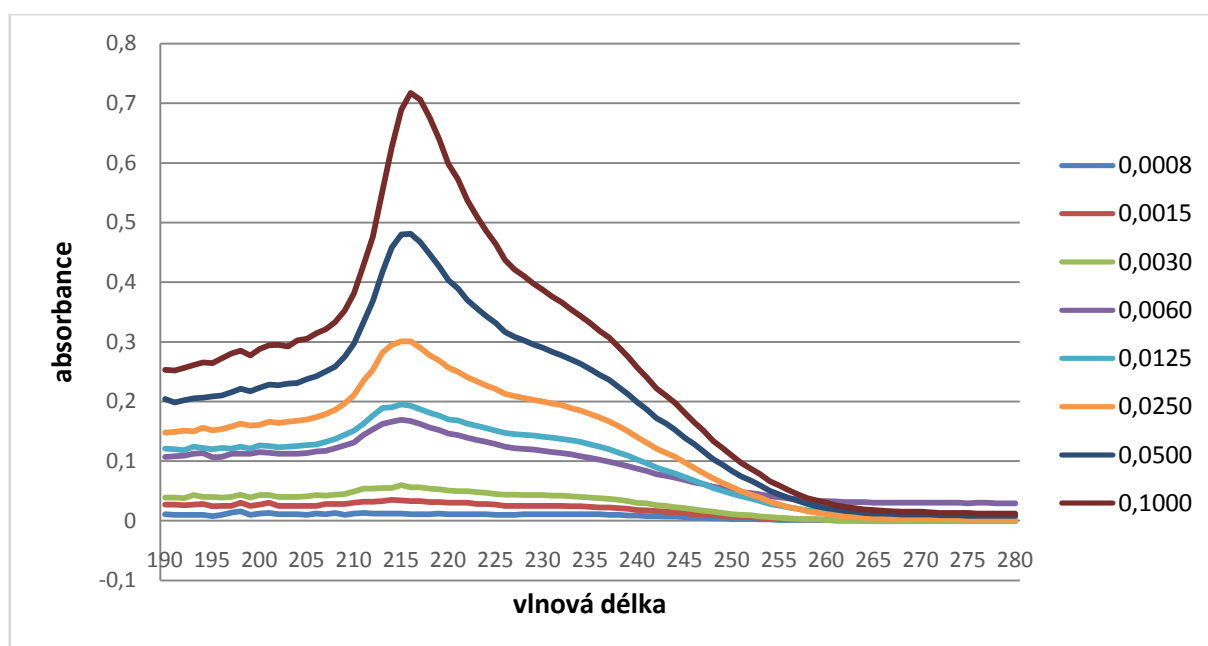
Experimenty ukázaly, že jako nejvhodnější enzym pro digesci vysokomolekulární HA je lyáza z *P. acnes* a *S. hyalurolyticus*. Z důvodu komerční dostupnosti byla v dalších experimentech použita lyáza ze *S. hyalurolyticus*.

5.1.2 Stanovení optimální vlnové délky

V dalším experimentu byla stanovena optimální vlnová délka proměřením kalibrační řady HA standardu v UV-spektru od 180 nm do 270 nm (viz graf 5).

Na základě tohoto měření byla jako optimální vlnová délka stanovena 216 nm, při které dosahuje hodnota absorbance maxima.

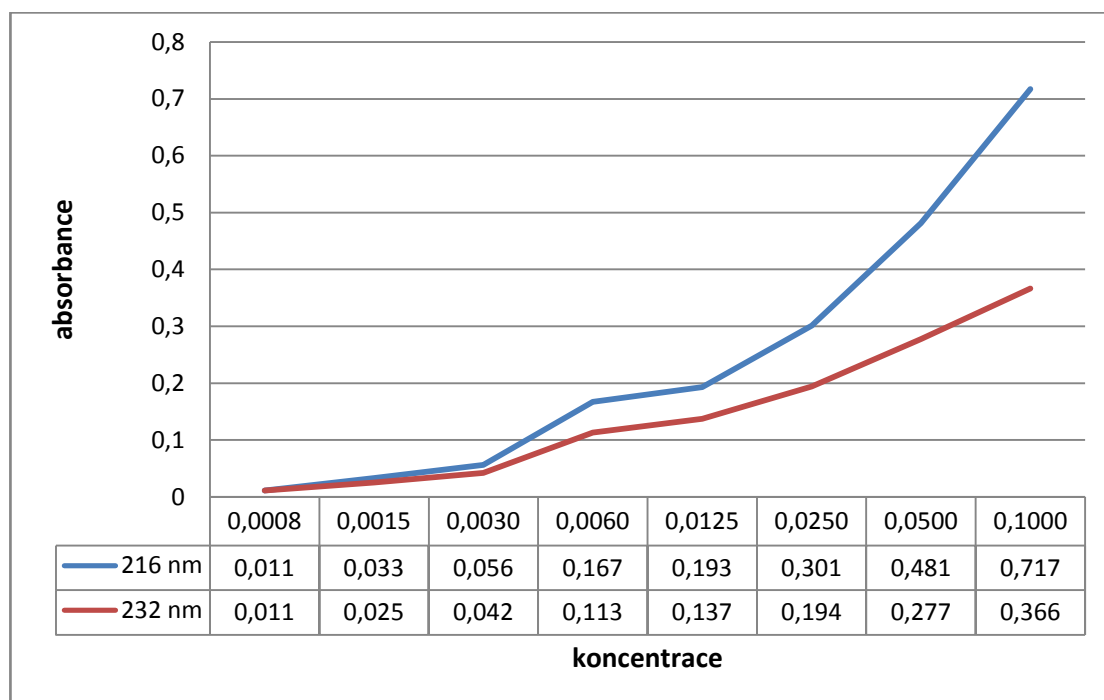
Graf 5. Vliv vlnové délky v oblasti UV-spektra na detekci HA



Vliv vlnové délky na optimální detekci hyaluronové kyseliny je vyjádřen hodnotou absorbance při známé koncentraci HA standardu.

Cílem dílčího experimentu bylo porovnat vlnovou délku 232 nm použitou v předchozích experimentech a optimální vlnovou délku 216 nm. Pro digesci HA standardních roztoků byla použita lyáza ze *Streptomyces hyalurolyticus*. Jak zobrazuje graf 6, obě vlnové délky mají totožný trend a průběh. V dalších experimentech byla pro měření HA použita vlnová délka 216 nm.

Graf 6. Porovnání vlnových délek 216 nm a 232 nm

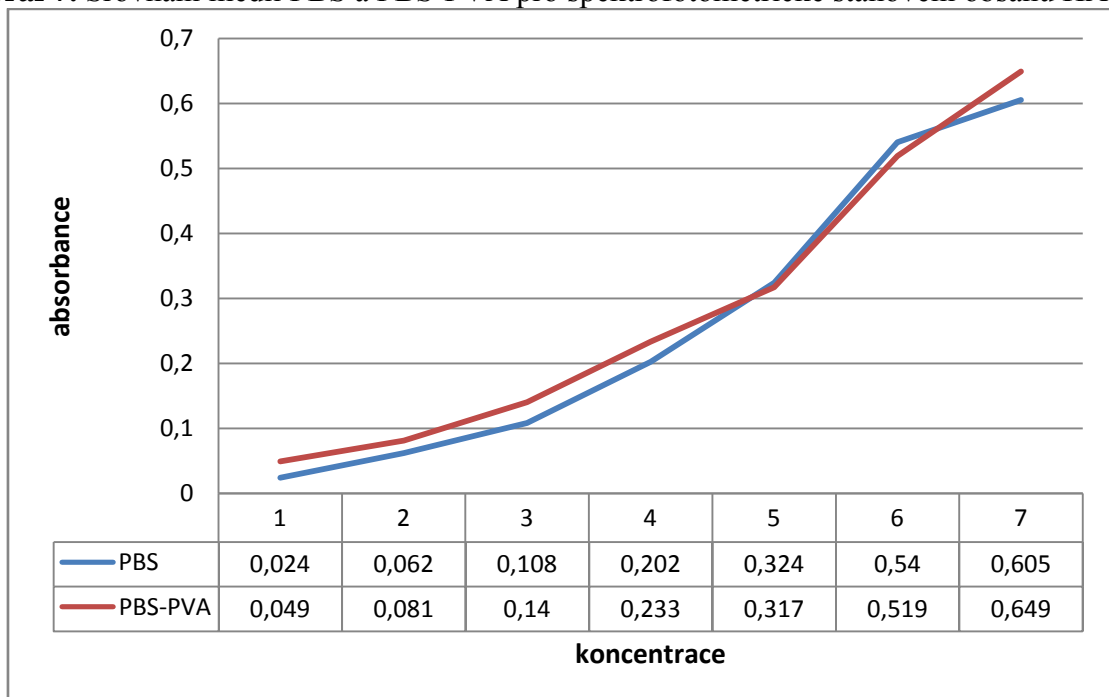


Vlnové délky 216 nm a 232 nm jsou porovnávány na základě hodnot absorbance při známé koncentraci HA standardu.

5.1.3 Korekce metody pro manipulaci s kumulo-oocytárními komplexy

V předchozích experimentech bylo optimálním médiem zvoleno PBS. Pro manipulaci s kumulo-oocytárními komplexy je zapotřebí přidavku 0,01% polyvinylalkoholu (PVA) v PBS. Cílem experimentu bylo prokázat nezávadnost PVA v PBS. Z výsledků je patrné, že přidání 0,01% PVA do PBS nesnižuje efektivitu stanovení produktů β -eliminace spektrofotometrickou metodou při vlnové délce 216 nm (graf 7).

Graf 7. Srovnání médií PBS a PBS-PVA pro spektrofotometrické stanovení obsahu HA



Média PBS a PBS s polyvinyl-alkoholem jsou srovnána na základě průběhu absorbance při zvyšující se koncentraci hyaluronové kyseliny v kalibrační řadě.

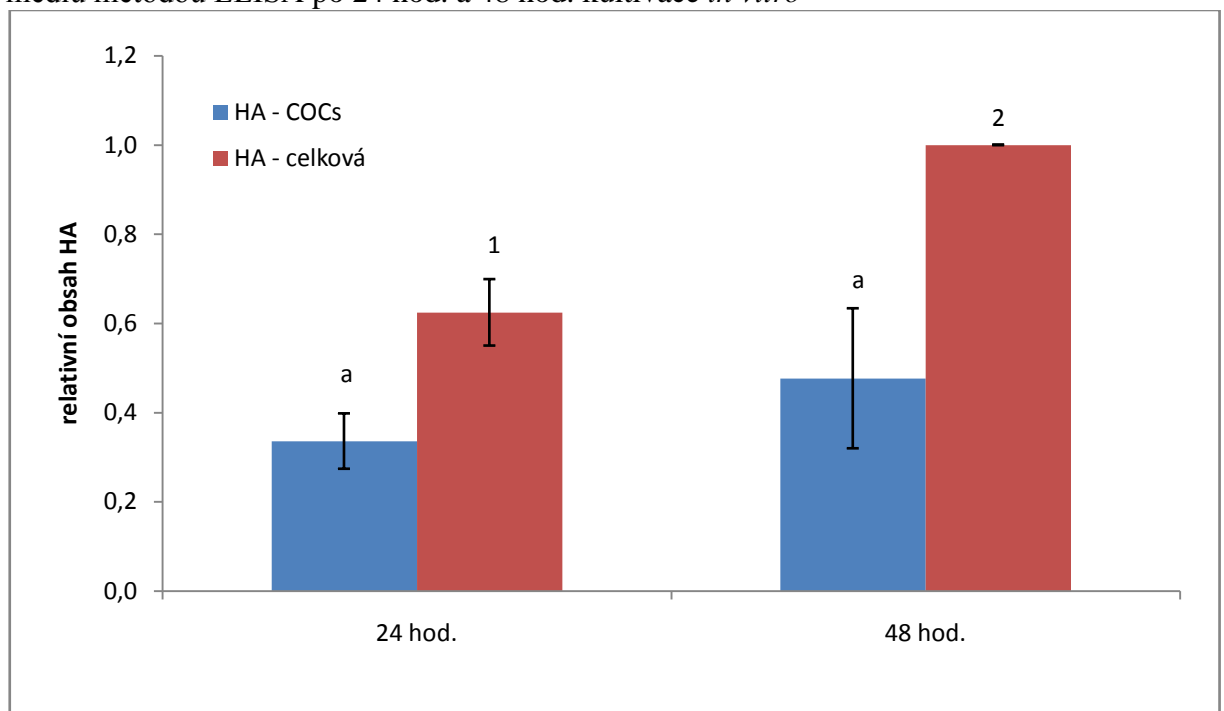
5.2 Hodnocení kumulární expanze podle obsahu hyaluronové kyseliny

5.2.1 ELISA

Hodnocení kumulární expanze bylo provedeno na kumulo-oocytárních komplexech kultivovaných 24 hod. a 48 hod. Metodou ELISA bylo stanoveno množství hyaluronové kyseliny v buněčném lyzátu expandovaného kumulu a v kultivačním médiu. Celkový obsah HA (HA – celková) byl vypočten jako součet obsahu HA z buněčného lyzátu (HA – COCs) a obsahu HA z kultivačního média. Oocyty byly podrobeny kontrole meiotického zrání.

Touto metodou jsme zjistili statisticky významné rozdíly v obsahu HA v závislosti na době kultivace. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu HA (HA – celková). Pokud byla HA hodnocena pouze v buněčném lyzátu expandovaného kumulu (HA – COCs), nebyl statisticky významný rozdíl prokázán (viz graf 8). Výsledky kontroly meiotického zrání jsou uvedeny v tabulce 2.

Graf 8. Stanovení množství hyaluronové kyseliny v expandovaných kumulech a kultivačním médiu metodou ELISA po 24 hod. a 48 hod. kultivace *in vitro*



Obsah hyaluronové kyseliny (HA) v kumulo-oocytárních komplexech (COCs) je vyjádřen jako relativní podíl vztážený k celkovému množství hyaluronové kyseliny po 48 hod. kultivace *in vitro*.

^{a,b}Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v obsahu hyaluronové kyseliny z kumulo-oocytárních komplexů ($p < 0,05$) jsou vyznačeny rozdílnými písmeny

^{1,2}Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v obsahu celkové hyaluronové kyseliny ($p < 0,05$) jsou vyznačeny rozdílnými číslicemi

Tabulka 2. Kontrola zrání oocytů po 24 hod. a 48 hod. kultivace *in vitro*

t	Fáze meiotického zrání (% ± SD)					n
	GV	LD	MI	AI/TI	MII	
24 hod.			3,3±3,8	96,7±3,8		120
48 hod.					100±0,0	120

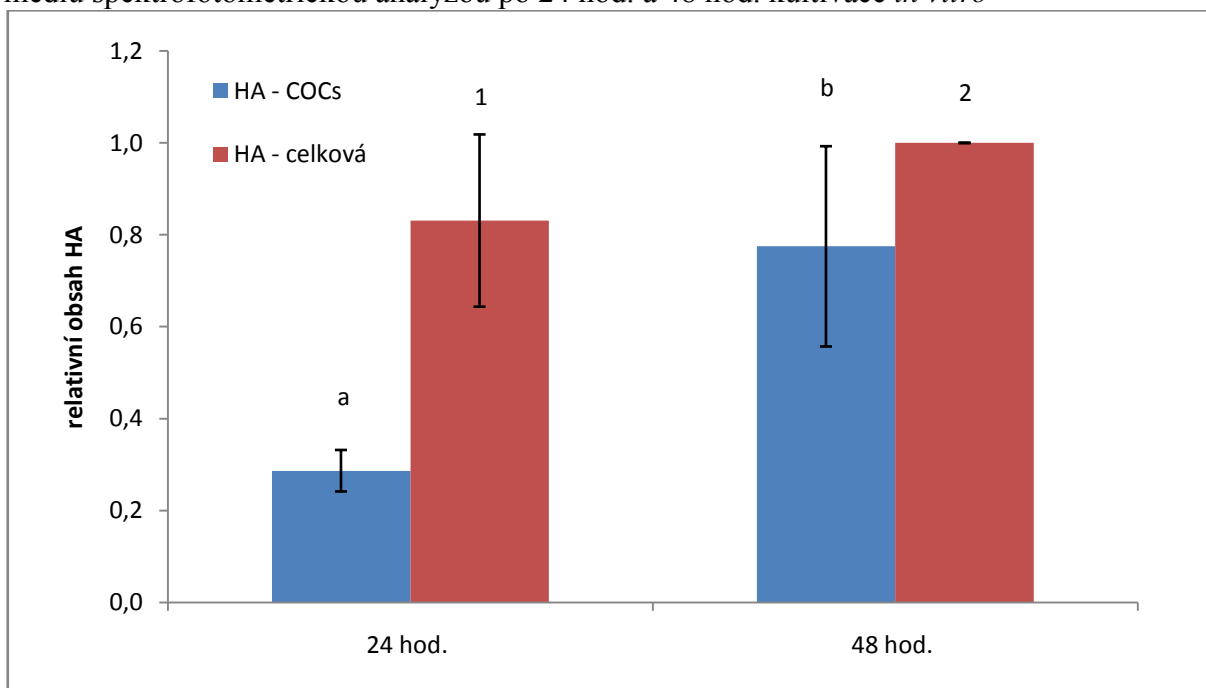
GV – % oocytů ve stádiu zárodečného váčku; LD – % oocytů ve stádiu pozdní diakineze; MI – % oocytů ve stádiu metafáze 1. meiotického dělení; AI/TI – % oocytů ve stádiu anafáze a telofáze 1. meiotického dělení; MII – metafáze 2. meiotického dělení

5.2.2 Spektrofotometrická analýza obsahu hyaluronové kyseliny v kumulo-oocytárních komplexech a kultivačním médiu

Kumulární expanze byla hodnocena po 24 a 48 hodinách kultivace. Spektrofotometrické stanovení koncentrace HA bylo provedeno na vzorcích z kumulo-oocytárních komplexů (COCs) a z kultivačního média po enzymatickém rozštěpení vysokomolekulární HA lyázou ze *S. hyalurolyticus* a následného proměření produktů β -eliminace při vlnové délce 216 nm. Celkový obsah HA (HA – celková) byl vypočten jako součet obsahu HA z COCs (HA – COCs) a obsahu HA z kultivačního média.

I touto metodou byly zjištěny rozdíly v obsahu HA mezi skupinami kultivovanými 24 hod. a 48 hod. Statisticky významné rozdíly byly prokázány v celkovém obsahu HA (HA – celková) i na úrovni COCs (HA – COCs) (viz graf 9). Výsledky kontroly jaderného zrání jsou uvedeny v tabulce 3.

Graf 9. Stanovení množství hyaluronové kyseliny v expandovaných kumulech a kultivačním médiu spektrofotometrickou analýzou po 24 hod. a 48 hod. kultivace *in vitro*



Obsah hyaluronové kyseliny (HA) v kumulo-oocytárních komplexech (COCs) je vyjádřen jako relativní podíl vztažený k celkovému množství hyaluronové kyseliny po 48 hod. kultivace *in vitro*.

^{a,b}Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v obsahu hyaluronové kyseliny z kumulo-oocytárních komplexů ($p < 0,05$) jsou vyznačeny rozdílnými písmeny

^{1,2}Statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami v obsahu celkové hyaluronové kyseliny ($p < 0,05$) jsou vyznačeny rozdílnými číslicemi

Tabulka 3. Kontrola zrání oocytů po 24 hod. a 48 hod. kultivace *in vitro*

t	Fáze meiotického zrání (% ± SD)					n
	GV	LD	MI	AI/TI	MII	
24 hod.	5±0,08		91±0,08		5±0,08	60
48 hod.	7±0,03		14±0,07		79±0,04	60

GV – % oocytů ve stádiu zárodečného váčku; LD – % oocytů ve stádiu pozdní diakineze; MI – % oocytů ve stádiu metafáze 1. meiotického dělení; AI/TI – % oocytů ve stádiu anafáze a telofáze 1. meiotického dělení; MII – metafáze 2. meiotického dělení

6 Diskuze

V *in vivo* podmínkách je kumulární expanze indukována gonadotropními hormony, které prostřednictvím buněk granulózy regulují sekreci parakrinních faktorů z kumulárních buněk (Motlík *et al.*, 1998). Kumulární expanzi regulují také faktory původem z folikulární tekutiny (Yoshida *et al.*, 1992) i z oocyty (CEEF – cumulus expansion-enabling factor) (Procházka *et al.*, 1998). Výsledkem působení těchto faktorů je indukce syntézy hyaluronové kyseliny (HA) (Salustri, 2000) a její stabilizace v expandovaném kumulo-oocytárním komplexu (COCs) (Camaioni *et al.*, 1993).

V průběhu kumulární expanze zanikají mezibuněčné spoje mezi oocytem a kumulárními buňkami, čímž je oocyt izolován od látek inhibujících meiotické zrání (Chen *et al.*, 1990). Na přerušení spojů gap junction se HA podílí dvěma způsoby. Prvním z nich je mechanické oddělení kumulárních buněk a oocyty vlivem nabývání složek ECM. Druhý způsob spočívá v interakci s membránovým receptorem CD44, kdy CD44-HA interakce katalyzuje aktivní cestu uzavření gap junction (Yokoo *et al.*, 2010).

Podle Dekel *et al.* (1979) je proces kumulární expanze, kdy kumulární buňky syntetizují strukturální složky extracelulární hmoty (ECM) bohaté na glykosaminoglykany, významným ukazatelem průběhu a úspěšnosti meiotického zrání. Naše hypotéza předpokládá, že jako marker meiotického zrání může být použit obsah HA a že je možno využít měření obsahu HA pro hodnocení kumulární expanze.

Jak uvádějí Tao *et al.* (2005), lze kumulární expanzi hodnotit vizuálně na základě zařazení příslušného COC do jedné ze tříd dle její intenzity. Tato metoda je ale zatížena rizikem chyby vlivem subjektivního hodnocení. Stejný problém se vyskytuje i u metody výpočtu plochy expandovaného kumulu podle Dean *et al.* (1994) a softwarové analýzy obrazu. Ani jedna z těchto metod není schopna postihnout prostorovou strukturu COCs a tudíž ani objektivně zhodnotit rozsah kumulární expanze.

Exaktnější údaje o kumulární expanzi poskytují metody měření obsahu glykosaminoglykanů v COCs. Nejvhodnějším glykosaminoglykanem pro analýzu je HA, jejíž obsah je ve srovnání s ostatními komponentami expandovaného kumulu nejvyšší (Nakayama *et al.*, 1996; Mlynářčiková *et al.*, 2009).

Ke stanovení obsahu HA může být použita metoda radioaktivního označení prekurzorů syntézy HA (Eppig, 1980). Nevýhody této metody spočívají především v práci

s radioizotopy, která s sebou nese řadu omezení. Z tohoto důvodu je vhodnější použít imunologické a analytické metody. Imunologická metoda ELISA není oproti metodě radioaktivního stanovení HA spojena s výraznějším omezením a patří mezi standardně zavedené metody používané k hodnocení kumulární expanze (Kongtawelert *et Ghosh*, 1990). Nevýhoda této metody může spočívat v potřebě finančně nákladných protilátek.

Naproti tomu dosud není obvyklé hodnocení kumulární expanze pomocí analytických metod. Z nich lze využít spektrofotometrické měření koncentrace štěpných produktů β -eliminace HA (Alkrad *et al.*, 2003) nebo kapalinovou chromatografií HPLC (Volpi, 2000). Jedním z cílů diplomové práce bylo optimalizovat dostupné analytické metody měření HA pro přesné hodnocení kumulární expanze u prasečích oocytů. I když jsou obě zmíněné metody vysoce přesné (Goebel *et Rolim*, 2007; Vieira *et Salgado*, 2011), je metoda HPLC nákladnější. Proto byla pro prasečí oocyty vybrána metoda spektrofotometrického měření koncentrace štěpných produktů β -eliminace HA.

Z experimentů pro optimalizaci metody spektrofotometrického měření koncentrace štěpných produktů β -eliminace HA bylo jako optimální médium použito 0,01% PVA v PBS (PBS-PVA). Nevhodné se naopak ukázalo médium M199, které obsahuje jako indikátor změny pH fenolovou červen. Tím se v souladu s dřívějšími publikacemi potvrdilo, že jsou fenolové skupiny detekovány v UV spektru (Berden *et al.*, 1996) a mohou tak ovlivňovat spektrofotometrické stanovení produktů β -eliminace. Dle našich předpokladů se z testovaných enzymů osvědčily lyázy z *Pseudomonas acnes* a *Streptomyces hyalurolyticus*, které k enzymatickému štěpení využívají chemické reakce β -eliminace za vzniku dvojných vazeb nutných pro detekci dimerů UV spektrofotometrií. Bovinní testikulární hyaluronidáza (BTH), použitá jako negativní kontrola, nemohla být pro tuto metodu vzhledem k mechanismu štěpení funkční. BTH využívá k enzymatickému štěpení transglykosylační reakce (Saitoh *et al.*, 1995), při kterých nevznikají dvojně vazby nutné pro detekci dimerů UV spektrofotometrií, ale dochází k hydrolýze za využití molekuly vody. Optimální vlnová délka pro stanovení HA dimerů byla v našich laboratorních podmínkách stanovena na 216 nm. V odborné literatuře se uvádí vlnová délka v intervalu 226 nm – 257 nm (Reháková *et al.*, 1994; Alkrad *et al.*, 2003). Z uvedených informací vyplývá, že hodnotu vlnové délky je nutné vždy optimalizovat pro konkrétní použité médium a příslušné laboratorní podmínky proměřením kalibrační řady HA standardu v UV spektru.

Pro co nejpřesnější zhodnocení kumulární expanze pomocí obsahu HA je důležité stanovit celkový obsah HA. Nagyová (2012) uvádí, že se polymery HA během kultivace COCs nacházejí zadržené v expandovaném kumulu, stejně jako jsou uvolňovány

do kultivačního média. Z tohoto důvodu je pro stanovení celkového obsahu HA nezbytné podrobit analýze nejen vlastní expandovaný kumulus, ale také kultivační médium, ve kterém probíhalo *in vitro* zrání COCs. Celkový obsah HA (HA – celková) byl vypočten jako součet obsahu HA z buněčného lyzátu (HA – COCs) a obsahu HA z kultivačního média. Pro výsledné srovnání byly hodnoty koncentrace HA vyjádřeny relativně k celkovému obsahu HA v kumulo-oocytárních komplexech po 48 hod. kultivace.

Hodnocení kumulární expanze podle obsahu HA metodou ELISA prokázalo rozdíly na úrovni celkového obsahu HA (HA – celková) mezi skupinami COCs kultivovaných 24 hod. a 48 hod. Analytické stanovení produktů β -eliminace pomocí spektrofotometrie rovněž prokázalo rozdíly v celkovém obsahu HA (HA – celková) mezi skupinami COCs kultivovaných 24 hod. a 48 hod. Oproti metodě ELISA byly touto metodou statisticky významné rozdíly prokázány nejen v celkovém obsahu HA (HA – celková), ale také na úrovni COCs (HA – COCs). Nelineární průběh nárůstu obsahu HA mezi HA – COCs a HA – celkové během *in vitro* kultivace může být vysvětlen určitou variabilitou uvolňování HA do média. V odborné literatuře Nagyová (2012) uvádí poměrně široký rozptyl obsahu HA uvolněné do média v intervalu od méně než 40 % až do více než 70 %.

Z výsledků námi provedených experimentů vyplývá, že obsah HA stoupá v závislosti na fázi meiotického zrání. Obě testované metody prokázaly statisticky významný rozdíl v celkovém obsahu HA (HA – celková) mezi skupinami COCs kultivovanými 24 hod. a 48 hod. Zvyšující se míru kumulární expanze během *in vitro* kultivace uvádějí také Kimura *et al.* (2002) a Nagyová (2012). Potvrdilo se, že kumulární expanze je vhodný marker meiotického zrání, jehož přesné stanovení lze využít pro hodnocení průběhu meiotického zrání.

Ve srovnání metody ELISA a spektrofotometrie je metoda spektrofotometrického stanovení produktů β -eliminace výhodná a jeví se jako citlivější pro stanovení HA z COCs (HA – COCs). Současně je tato metoda také ekonomicky výhodnější.

Naše experimenty ukázaly, že pro prasečí oocyty je lepší metodou hodnocení kumulární expanze spektrofotometrické stanovení produktů β -eliminace. V souladu s cílem diplomové práce jsme ověřili závislost obsahu HA v COCs prasete na fázi meiotického zrání a optimalizovali jsme protokol spektrofotometrického stanovení produktů β -eliminace HA. Naše zkušenosti ukázaly, že pro praktické použití metody je nutnou podmínkou optimalizace metod, jak pro konkrétní druh, tak pro konkrétní laboratorní podmínky. Pro stanovení celkového obsahu HA a odvození kumulární expanze je nutné, aby byly analýze podrobeny jak COCs, tak kultivační médium, ve kterém probíhalo *in vitro* zrání COCs.

7 Závěr

Současně s meiotickým zráním probíhá kumulární expanze, během které kumulární buňky produkují složky extracelulární matrix, zejména hyaluronovou kyselinu (HA). Kumulární expanze se podílí na regulaci meiotického zrání a rovněž slouží jako marker zrání oocytů *in vitro*.

Výsledky experimentů ověřily vhodnost použití popsané metody přípravy vzorků a následného spektrofotometrického stanovení HA pro hodnocení kumulární expanze prasečích kumulo-oocytárních komplexů (COCs). Experimenty byla ověřena závislost obsahu HA v COCs na fázi meiotického zrání. Výhodou této metody je přesná analýza obsahu HA a odvození intenzity kumulární expanze bez nutnosti použití radioizotopů. Možnou perspektivu stanovení štěpných produktů HA v nižších koncentracích nabízí vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vyšší citlivost metody by bylo možné využít zejména pro přesnější stanovení HA uvolněné během kultivace COCs do kultivačního média.

Naše experimenty ukázaly, že spektrofotometrická metoda je citlivou a velmi vhodnou metodou pro hodnocení kumulární expanze, ale nutnou podmínkou jejího využití je optimalizace. Pro praktické využití je za dodržení podmínky optimalizace vhodnou metodou.

8 Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero Publishing s.r.o. Ústí nad Labem. p. 630. ISBN: 8090290620.
- Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S., Neubert, R. 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR and UV-vis spectroscopies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 31 (3). 545-550.
- Amale, M. H., Shahne, Z., Abavisani, A., Nasrollahi, S. 2011. Effects of inhibiting nitric oxide synthase on cumulus expansion and nuclear maturation of sheep oocytes. *Czech Journal of Animal Science*. 56 (6). 284–29.
- Banerjee, S. D., Toole, B. P. 1992. Hyaluronan-binding protein in endothelial cell morphogenesis. *The journal of cell biology*. 119 (3). 643-52.
- Berden, G., Meerts, W. L., Schmitt, M., Kleinermanns, K. 1996. High resolution UV spectroscopy of phenol and the hydrogen bonded phenol water cluster. *The Journal of chemical physics*. 104 (3). 972-982.
- Bernhardt, M. L., Kim, A. L., O'Halloran, T. V., Woodruff, T. K. 2011. Zinc requirement during meiosis I – meiosis II transitiv in mouse oocytes is dependent of the MOS-MAPK pathway. *Biology of Reproduction*. 84 (3). 526-36.
- Bernhardt, ML., Kong, BY., Kim, AM., O'Halloran, TV., Woodruff, TK. 2012. A zinc-dependent mechanism regulates mestic progression in mammalian oocytes. *Biology of reproduction*. 86 (4). 114-18.
- Bonnet, A., Le Cao, K. A., SanCristobal, M., Benne, F., Robert-Granie, C., Law-So, G., Fabre, S., Besse, P., De Billy, E., Quesnel, H., Hatey, F., Tosser-Klopp, G. 2008. *In vivo* gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development. *Reproduction*. 136 (2). 211-24.

- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43 (4). 543- 7.
- Camaioni, A., Hascall, VC., Yanagishita, M., Salustri, A. 1993. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. *The journal of biological chemistry*. 268 (27). 20473-81.
- Canipari, R., Epifano, O., Stracusa, G., Salustri, A. 1995. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Developmental biology*. 167 (1). 371-8.
- Dean, F. P., Sato, E., Naito, K., Toyoda, Y. 1994. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction. and Fertility*. 101 (3). 667-73.
- Dekel, N., Beers, W. H. 1980. Development of the rat oocyte *in vitro*: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the *cumulus oophorus*. *Developmental Biology*. 75 (2). 247-54.
- Dekel, N., Hillensjo, Y., Kraicer PF. 1979. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biology of Reproduction*. 20 (2). 191-97.
- DiLuigi, A., Weitzman, V. N., Pace, M. C., Siano, L. J., Maier, D., Mehlmann, L. M. 2008. Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biology of Reproduction*. 78 (4). 667-72.
- Dragovic, R. A., Ritter, L. J., Schulz, S. J., Amato, F., Armstrong, D. T., Gilchrist, R. B. 2005. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. *Endocrinology*. 146 (6). 2798-806.
- Ebeling, S., Topfer, D., Meinecke, B. 2011. Steroidogenesis and the influence of MAPK activity during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3). 513-19.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6). 624-712.
- Eicher, E. M., Washburn, L. L. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual review of genetics*. 20 (1). 327-360.
- Ellis, I., Banyard, J., Schor, SL. 1997. Differential response of fetal and adult fibroblast to cytokines: cell migration and hyaluronan synthesis. *Development*. 124 (8). 1593-600.

- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., Matzuk, M. M. 1999. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9 - deficient ovary. *Molecular Endocrinology*. 13 (6). 1018-34.
- Eppig, J. J. 1980. Role of FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocytecumulus cell complexes in vitro. *Biology of Reproduction*. 22 (3). 629-33.
- Eppig, J. J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Developmental biology*. 89 (1). 268-72.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproductions*. 122 (6). 829-38.
- Eppig, J. J., Peters, A. H., Telfer, E. E., Wigglesworth, K. 1993. Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor. *Molecular Reproduction and Development*. 34 (4). 450-56.
- Fan H. Y., Sun Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535-47.
- Fan, H. Y., Huo, L. J., Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in oocyte maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1552-64.
- Fan, H., Tong, CH., Chen, D., Sun, Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47 (14). 1157-1162.
- Fulka, J. Jr., First, N. L., Moor, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41-9.
- Ganong, W. F. 2005. *Přehled lékařské fyziologie, dvacáté vydání*. Galén. p. 890. ISBN: 8072623117.
- Garrington, T. P., Johnson, G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 11 (2). 211-18.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349 (6305). 132-138.

- Goebel, K., Rolim, C. M. B. 2007. Validation of UV spectrophotometric and HPLC methods for quantitative determination of atenolol in pharmaceutical preparations. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (5). 765-70.
- Hess, K. A., Chen, L., Larsen, W. J. 1999. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biology of reproduction.* 61 (2). 436-43.
- Hirshfield, A. N. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction.* 44 (6). 1157-162.
- Horner, K., Litera, G., Hinckley, M., Trknu, K., Storm, D., Conti, M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology.* 258 (2). 385-96.
- Howard, E. L., Charlesworth, A., Welk, J., MacNicol, A. M. 1999. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Molecular and cellular Biology.* 19 (3). 1990-9.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction.* 5 (2). 122-30.
- Chen, H., Kui, C., Chan, H. C. 2013. Ca²⁺ mobilization in cumulus cells: role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium.* 53 (1). 68-75.
- Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development.* 34 (1). 87-93.
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., Larsen, W. J. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular reproduction and development.* 26 (3). 236-47.
- Chen, Q., Li, X. L., Liu, Q., Jiano, Q. C., Cao, W. G., Wan, H. 2005. Investigation the binding interaction of azur A with hyaluronic acid via spectrophotometry and its analytical application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 382 (7). 1513-519.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of reproduction.* 58 (1). 130-36.

- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamauchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., Kimata, K. 1999. Tree isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *The journal of biological chemistry*. 274 (35). 25085-92.
- Ježová, M., Scsuková, S., Nagyová, E., Vranová, J., Procházka, R., Kolena, J. 2001. Effect of intraovarian factors on porcine follicular cells: cumulus expansion, granulosa and cumulus cell progesterone production. *Animal reproduction science*. 65 (1-2). 115-26.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145-150.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 10 (1). 1-5.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130 (6). 813-23.
- Karja, N. W. K. 2008. Nuclear Maturation of Porcine Oocytes in vitro: Effect of the Cumulus-Oocyte Complexes Quality. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 13 (2). 1078-84.
- Kim, A. M., Bernhardt, M. L., Kong, B. Y., Ahn, R. W., Vogt, S., Woodruff, T. K., O'Halloran, T. V. 2011. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chemical Biology*. 6 (7). 716-23.
- Kim, A. M., Vogt, S., O'Halloran, T. V., Woodruff, T. K. 2010. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nature Chemical Biology*. 6 (9). 674-81.
- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, K., Matsumoto, H., Sato, E. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of reproduction*. 66 (3). 707-17.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6). 654-63.
- Kong, B. Y., Bernhardt, M. L., Kim, A. M., O'Halloran, T. V., Woodruff, T. K. 2012. Zinc Maintains Prophase I Arrest in Mouse Oocytes Through Regulation of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction*. 87 (1). 1-12.

- Kongtawelert, P., Ghosh, P. 1990. A method for the quantification of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Analytical Biochemistry*. 185 (2). 313-18.
- Koopman, P. 1992. Mammalian sex-determining genes. *Current opinion in biotechnology*. 3 (6). 603-6.
- Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M. M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics*. 15 (2). 201-4.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8 (2). 119 – 25.
- Li, TY., Colley, D., Barr, K. J., Yee, S. P., Kidder, G. M. 2007. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *Journal of cell science*. 120 (23). 4117-4125.
- Liang, C. G., Huo, L. J., Zhong, Z. S., Chen, D. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2005. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulusenclosed oocytes. *Endocrinology*. 146 (10). 4437-44.
- Liang, C. H., Su, Y., Fan, H., Schatten, H., Sun, Q. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resupmtion: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endokrinology*. 21 (9). 2037-55.
- Lisle, R. S., Anthony, K., Randall, M. A., Diaz, F. J. 2013. Oocyte-cumulus cell interactions regulate free intracellular zinc in mouse oocytes. *Reproduction*. 145 (4). 381-90.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology* 5th. edition. Palgrave Macmillan, W. H. Freeman. p. 967. ISBN: 9780716743668.
- Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80 (2). 179-85.
- Mattioli, M., Gioia, L., Barboni, B. 1998. Calcium elevation in Wheel cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Molecular Reproduction and Development*. 50 (3). 361-69.

- Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocyte: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (6). 791-99.
- Meinecke, B., Krischek, C. 2003. MAPK/ERK kinase (MEK) signalling is required for resumption of meiosis in cultured cumulus-enclosed pig oocytes. *Zygote*. 11 (1). 7-16.
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Inagaki, K., Otani, H., Takeda, M., Suzuki, J., Goto, J., Ogura, T., Makino, H. 2007. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production. *Endocrinology*. 148 (1). 337-45.
- Mlynarčíková, A., Nagyová, E., Ficková, M., Scsuková, S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicology In Vitro*. 23 (3). 371-77.
- Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 40. 197-210.
- Motlík, J., Procházka, R., Nagyová, E., Schellander, K., Brem, G. 1998. Paracrine and autocrine regulation of cumulus expansion in porcine follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, 33 (3-4). 181-185.
- Motlík, J., Procházka, R., Nagyová, E., Schellander, K., Brem, G. 1998. Paracrine and autocrine regulation of cumulus expansion in porcine follicles. *Reproduction in Domestic Animals*. 33 (3-4). 181-185.
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S. 1997. Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 75 (1). 5-10.
- Nagyová, E., Camaioni, A., Procházka, R., Salustri, A. 2004. Covalent transfer of heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan *in vivo* and *in vitro* expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biology of reproduction*. 71 (6). 1838-43.

- Nagyová, E., Procházka, R., Vanderhyden, B. C. 1999. Oocyctectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium. *Biology of Reproduction*. 61 (3). 569-574.
- Nakayama, T., Inoue, M., Sato, E. 1996. Effect of oocyctectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*. 55 (6). 1299-1304.
- Němcová, L., Nagyová, E., Petlach, M., Tománek, M., Procházka, R. 2007. Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes. *Biology of reproduction*. 76 (6). 1016-24.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Fredzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136 (11). 1869-78.
- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17 (17). 5037-47.
- Procházka, R., Nagyová, E., Brem, G., Schellander, K., Motlík, J. 1998. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. *Molecular reproduction and development*. 49 (2). 141-49.
- Qian, Y., Shi, W. Q., Ding; J. T., Sha, J. H., Fan, B. Q. 2003. Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (2). 167-74.
- Reháková, M., Bakoš, D., Soldán, M., Vizárová, K. 1994. Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *International journal of biological macromolecules*. 16 (3). 121-124.
- Reich, R., Miskin, R., Tsafiriri, A. 1985. Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology*. 116 (2). 516-21.
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., Hsieh, M., Doyle, K. H., Falender, A. E., Lo, Y. K., Sharma, S. C. 2002. Novel signalling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormon Research*. 57. 195-220.

- Rosen, M. P., Zamah, A. M., Shen, S., Dobson, A. T., McCulloch, C. E., Rinaudo, P. F., Lamb, J. D., Cedars, M. I. 2009. The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reproductive biology and endocrinology*. 7 (1). 35.
- Sadler, T. W. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada Publishing, a. s. p. 414. ISBN: 8024726408.
- Saitoh, H., Takagaki, K., Majima, M., Nakamura, T., Matsuki, A., Kasai, M., Narita, H., Endo, M. 1995. Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase. *Journal of Biological chemistry* 270 (8). 3741-3747.
- Salustri, A. 2000. Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *International Journal of Developmental Biology*. 44 (6). 591-97.
- Sasseville, M., Côté, N., Gagnon, M. C., Richard, F. J. 2008. Upregulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine cumulus-oocyte complex affects steroidogenesis during in vitro maturation. *Endocrinology*. 149 (11). 5568-76.
- Sinclair, A. H., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346 (6281). 240-4.
- Solursh, M. 1976. Glycosaminoglycan synthesis in the chick gastrula. *Developmental Biology*. 50 (2). 525-30.
- Spicer, A. P., Augustine, M. L., McDonald, J. A. 1996. Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase. *The journal of biological chemistry*. 271 (38). 23400-6.
- Spicer, A. P., Olson, J. S., McDonald, J. A. 1997. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *The journal of biological chemistry*. 272 (14). 8957-61.
- Stern, R., Jedrzejewski, M. J. 2006. Hyaluronidases: their genomics, structures and mechanisms of action. *Chemical Reviews*. 106 (3). 818-39
- Strickland, S., Beers, W. H. 1976. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. *In vitro* response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *The journal of biological chemistry*. 251 (18). 5694-702.

- Sun, Q. Y., Miao, Y. L., Schatten, H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell cycle*. 8 (17). 2741-7.
- Sun, Q., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journals of Reproduction and Development*. 49 (5). 347-59.
- Šutovský, P., Fléchon, J. E., Pavlok, A. 1994. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reproduction Nutrition Development*. 34 (5). 415-25.
- Tanghe, S., van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., de Kruif, A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular reproduction and development*. 61 (3). 414-24.
- Tao, Y., Xie, H., Hong, H., Chen, X., Jang, J., Xia, G. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13 (1). 1-9.
- Tatemoto, H., Sakurai, N., Muto, N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biology of reproduction*. 63 (3). 805-10.
- Törnell, J., Billig, H., Hillensjö, T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human reproduction*. 6 (3). 411-22.
- van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717-1751.
- Vanderhyden, B. C. 1993. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *Journal of reproduction and fertility*. 98 (1). 219-27.
- Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., Buccione, R., Eppig, J. J. 1990. Developmental pattern of the secretion of cumulus-expansion enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Developmental biology*. 140 (2). 307-17.
- Vieira, D. C. M., Salgado, H. R. N. 2011. Comparison of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical products. *Journal of chromatographic science*. 49 (7). 508-511.
- Villa-Diaz, L. G., Miyano, T. 2004. Activation of p38 during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 71 (2). 691-96.

- Volpi, N. 2000. Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by High-Performance Liquid Chromatography and fluorometric detection with dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*. 277 (1). 19-24.
- Wang, S., Ning, G., Chen, X., Ouyang, H., Zhang, H., Tai, P., Mu, X., Zhou, B., Zhang, M. 2008. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 13. 7087-95.
- Wang, W., Sun, Q., Hosoe, M., Shioya, Y., Day, B. N. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56 (6). 1376-82.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. *The Mammalian Ovum, Second Edition. The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 79-122.
- Weigel, P. H., Hascall, V. C., Tammi, M. 1997. Hyaluronan synthases. *The journal of biological chemistry*. 272 (22). 13997-14000.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Journals of Reproduction and Fertility: Reviews of Reproduction*. 1 (2). 127-35.
- Yamasaki, S., Sakata-Sogawa, K., Hasegawa, A., Suzuki, T., Kabu, K., Sato, E., Kurosaki, T., Yamashita, S., Tokunaga, M., Nishida, K., Hirano, T. 2007. Zinc is a novel intracellular second messenger. *The Journal of Cell Biology*. 177 (4). 637-45.
- Ye, J., Flint, A. P. F., Luck, M. R., Campbell, K. H. S. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125 (5). 645-56.
- Yokoo, M., Kimura, N., Sato, E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journals of Reproduction and Development*. 56 (1). 15-19.
- Yokoo, M., Miyahayashi, Y., Naganuma, T., Kimura, N., Sasada, H., Sato, E. 2002. Identification of hyaluronic acid-binding proteins and their expressions in porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biology of reproduction*. 67 (4). 1165-71.
- Yokoo, M., Shimizu, T., Kimura, N., Tunjung, W., Matsumoto, H., Abe, H., Sasada, H., Rodriguez-Martinez, H., Sato, E. 2007. Role of the hyaluronan CD44 during porcine oocyte maturation. *Journals of Reproduction and Development*. 53 (2). 263-70.

- Yoshida, M., Ishizaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K., Kojima, Y. 1992. Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes *in vitro* and on their subsequent fertilizing and developmental capacity *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. 95 (2). 481-488.
- Yu, F. Q., Han, C. S., Yang, W., Jin, X., Hu, Z. Y., Liu, Y. X. 2005. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *Journal of Endocrinology*. 186 (1). 85-96.
- Zachow, R. J., Magoffin, D. A. 1995. Granulosa cell modulation of luteinizing hormone-dependent androgen production by ovarian theca-interstitial cells: a temporal switch from suppression to augmentation stimulated by follicle stimulating. *Biology of Reproduction*. 53 (4). 758-765.
- Zhang, H., Zheng, W., Shen, Y., Adhikari, D., Ueno, H., Liu, K. 2012. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (31). 12580-12585.
- Zhang, L., Underhill, C. B., Chen, L. 1995. Hyaluronan on the surface of tumor cell is correlated with metastatic behavior. *Cancer research*. 55 (2). 428-433.
- Zhuo, L., Yoneda, M., Zhao, M., Yingsung, W., Yoshida, N., Kitagawa, Y., Kawamura, K., Suzuki, T., Kimata, K. 2001. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *The journal of biological chemistry*. 276 (11). 7693-7696.

9 Seznam použitých zkratek

AC	Adenylate cyclase	Adenylátcykláza
AI/TI	Anaphase I / Telophase I	Anafáze I / Telofáze I
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome	Anafázi podporující komplex/cyklosom
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
Ca²⁺	Calcium ions	Vápenaté ionty
CaM	Calmodulin	Kalmodulin
CaMKII	Calmodulin dependent kinase II	Kalmodulin-dependentní proteinkináza II
CaM-kináza	Calmodulin dependent kinase	Kalmodulin-dependentní proteinkináza
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosin monofosfát
Cdk2	Cyclin dependent kinase 2	Cyklin dependentní proteinkináza 2
CEEF	Cumulus expansion-enabling factors	Kumulární expanzi aktivující faktory
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Cyklický guanosin monofosfát
COC	Cumulus oocyte complex	Kumulo-oocytární komplex
CSF	Cytostatic factor	Cytostatický faktor
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
ECM	Extracellular matrix	Extracelulární matrix
EGF	Epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Kináza regulovaná extracelulárním signálem
FSH	Follicle-stimulating hormone	Folikulostimulační hormon
FST	Follistatin	Follistatin
GAG	Glycosaminoglycans	Glykosaminoglykany
GDF-9	Growth differentiation factor-9	Růstový diferenciační faktor 9
GnRH	Gonadotropin releasing hormone	Gonadotropiny uvolňující hormon
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosintrifosfát
GV	Germinal vesicle	Zárodečný váček
GVBD	Terminal vesicle breakdown	Rozpad zárodečného váčku
HA	Hyaluronic acid	Hyaluronová kyselina

HABP	Hyaluronic acid-binding proteins	Hyaluronovou kyselinu vázající proteiny
Has1	Hyaluronan synthase 1	Hyaluronan-syntáza 1
Has2	Hyaluronan synthase 2	Hyaluronan-syntáza 2
Has3	Hyaluronan synthase 3	Hyaluronan-syntáza 3
IGF	Insuline-like growth factor	Inzulínu podobný růstový faktor
IP₃	Inositol 1,4,5-triphosphate	Inositol-1,4,5-trifosfát
LD	Late diakinesis	Pozdní diakineze
LH	Luteinizing hormone	Luteinizační hormon
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	Mitogeny aktivovaná proteinkináza
MAPKK/ MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase	Kináza mitogeny aktivované proteinkinázy
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	Kináza kinázy mitogeny aktivované proteinkinázy
MI	Metaphase I	První meiotická metafáze
MII	Metaphase II	Druhá meiotická metafáze
MPF	Metaphase promoting factor	Metafázi podporující faktor
MTOC	Mikrotubule-organizing center	Mikrotubuly organizující centrum
PGC	Primordial germ cells	Primordiální zárodečné buňky
PKA	Protein kinase A	Proteinkináza A
SHAP	Serum-derived hyaluronan-associated protein	Od séra odvozený protein asociovaný s HA
SRY	Sex-determining region on the Y chromosome	Pohlavně determinující faktor chromozomu Y
uPA	Urokinase-type plasminogen activator	Plazminogenný aktivátor urokinázového typu
UPS	Ubiquitin proteasome system	Ubiquitin-proteasomální komplex
Zn	Zincum	zinek

10 Samostatné přílohy

Na následujících stránkách je přiložen protokol ke kitu QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay (Biotech Trading Partners, USA), který byl využit ke stanovení koncentrace hyaluronové kyseliny metodou ELISA (viz kap. 4.4).