

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

**Vybrané faktory regulující růstovou periodu oocyty**

**Bakalářská práce**

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

**Autor práce:** Martina Ratajová

**2012**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vybrané faktory regulující růstovou periodu oocytu vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: .....

Podpis autora:.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat všem, kteří jakkoliv přispěli při zpracování mé práce. Mé největší poděkování patří doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph. D., vedoucí bakalářské práce, za její trpělivost a cenné rady.

## **Souhrn**

V poslední době dochází k intenzivnímu rozvoji reprodukčních biotechnologií, a proto narůstá snaha o správné pochopení mechanismů a vlivů působících na reprodukční cyklus. Naše znalosti týkající se reprodukčního cyklu jsou nedostatečné, obzvláště ty, které se týkají třech významných fází oogeneze, množení zárodečných buněk, růstu a meiotického zrání. Oogeneze začíná již během fetálního vývoje samice a jejím výsledkem je oplození schopný oocyt.

Pro reprodukční biotechnologie jsou nezbytné především oocyty s ukončeným růstem, které jsou schopné dokončit meiotické zrání dosažením druhé meiotické metafáze. Takovýchto oocytů je ve vaječnicích samic omezené množství. Pokud bychom byli schopni ovlivnit dokončení růstové periody *in-vitro*, měli bychom neomezený zdroj oocytů vhodných pro další využití pro biotechnologie. Limituje nás především naše nedostatečná znalost mechanismů a faktorů, které řídí růstovou periodu oogeneze.

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících růstovou periodu oocytu. Mezi nejvýznamnější patří maturation promoting factor (MPF), cyklické nukleotidy, vápník, protein kináza C (PKC), Src kináza (SRC), mitogeny aktivovaná kináza (MAPK), kalcineurin, oxid dusnatý (NO) a sirovodík (H<sub>2</sub>S).

**Klíčová slova:** samičí pohlavní soustava, oogeneze, oocyt, meiotické zrání, růst oocytu

## **Summary**

The effort regarding the right understanding of reproduction mechanisms and factors affecting the reproduction system has recently been increasing. Our understanding of the reproductive cycle are insufficient, especially those that relate to three major stages of oogenesis, proliferation of stem cells, the growth and meiotic maturation. Oogenesis begins during fetal development and result in the female is capable of fertilization oocyte.

For the reproductive biotechnology are primarily needed oocytes with completed growth. These oocytes have to be able to complete meiotic maturation, when they reached the second meiotic metaphase. Such these oocytes in the ovaries of females are limited. If we were able to delay the completion of the growth period in-vitro, we would have an unlimited source of the oocytes, which could be suitable for further use in biotechnology. But we are limited by our inadequate knowledges of the mechanisms and the factors, which are regulating the oocyte growth.

There are also a lot of factors influencing the growth cycle of oocyte. Maturation promoting factor (MPF), cyclic nucleotides, calcium, protein kinase C (PKC), src kinase (SRC), mitogen activated protein kinase (MAPK), calcineurin, nitric oxide (NO) and hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) belong to the most important ones.

**Key words:** female sexual system, oogenesis, meiotic maturation, growing of oocyte

# Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární rešerše .....	9
3.1	Samičí pohlavní soustava ( <i>organa genitalia feminina</i> ).....	9
3.1.1	Vaječník ( <i>ovarium</i> ).....	9
3.1.2	Vejcovod ( <i>tuba uterina</i> ).....	13
3.2	Oogeneze .....	14
3.2.1	Fáze množení .....	15
3.2.2	Fáze růstu .....	16
3.2.3	Fáze zrání .....	19
3.2.4	Buněčný cyklus.....	20
3.3	Vybrané faktory ovlivňující růst oocytů.....	26
3.3.1	MPF .....	26
3.3.2	Cyklické nukleotidy .....	28
3.3.3	OMI.....	30
3.3.4	Vápník.....	31
3.3.5	PKC.....	33
3.3.6	Src kináza.....	34
3.3.7	MAPK.....	34
3.3.8	Kalcineurin.....	36
3.3.9	Oxid dusnatý .....	37
3.3.10	Sirovodík.....	39
4	Závěr .....	41
5	Použitá literatura .....	42

# 1 Úvod

Rozmnožování je jedním z charakteristických znaků organismů, patří k biochemicky i fyziologicky nejsložitějším procesům v těle. Zvláště pohlavní rozmnožování je velmi komplikované a dosud ne zcela prostudované. Největší neznámé se objevují zejména při studiu procesů probíhajících v samičí pohlavní soustavě, ke kterým se řadí vznik samičích pohlavních buněk, tvorba hormonů a zabezpečení prostředí pro vývoj nového jedince.

Vytváření oocytů, jejich množení, růst a zrání, se v posledních letech dostávají do popředí zájmu vědců, kteří se snaží zcela objasnit všechny souvislosti. V poslední době také dochází k prudkému nárůstu zájmu o reprodukční biotechnologie, které se rozvíjejí jak u hospodářských zvířat, kde je použití velice široké, tak u lidí, kde jsou tyto metody velice žádané kvůli stále se zhoršující plodnosti lidstva. Proto je velice důležité získání oocytů s dokončenou růstovou periodou, jejíž správný průběh je nezbytný pro úspěšné dokončení meiotického zrání. Pro výzkum v této oblasti je tedy velice důležité pochopení všech regulačních mechanismů, které řídí růstovou fázi oocytu.

## **2 Cíl práce**

Cílem této bakalářské práce je podat ucelený literární přehled o poznatcích, které se týkají růstové periody oocyty a vybraných faktorů, které se na regulaci růstové fáze podílejí.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Samičí pohlavní soustava (*organa genitalia feminina*)

Samičí pohlavní orgány mají vedle funkcí shodných s pohlavními orgány u samců, tj. tvorby pohlavních buněk a hormonů a zajištění páření, ještě další speciální funkci. U savců slouží jako prostředí poskytující ochranu a výživu pro vyvíjející se zárodek a plod od oplození vajíčka do porodu (Marvan a kol., 2003). Samice tak plní svojí základní roli, porodit ve správném čase živé mládě a laktací zajišťovat jeho výživu. K tomu je nutná koordinace komplexních vztahů mezi hormony a tkáňovými změnami v těle samice. To vše slouží pro zachování druhu (Reece et al., 1998).

Samičí pohlavní orgány zahrnují: vnitřní a zevní pohlavní orgány. K vnitřním patří vaječníky (*ovaria*) – párové orgány, vejcovody (*tubae uterinae*) – párové orgány, děloha (*uterus*) – nepárová, pochva (*vagina*) – nepárová (Čihák, 2004).

Zevní pohlavní orgány zahrnují poševní předsíň, vulvu a poštěvácěk (Marvan a kol., 2003).

#### 3.1.1 Vaječník (*ovarium*)

Vaječník je párová samičí pohlavní žláza, v níž se tvoří samičí pohlavní buňky vajíčka a pohlavní hormony estrogeny a progesteron. Je to kompaktní orgán šedorůžové barvy a tuhoelastické konzistence, uložený v kaudální části břišní dutiny, při vstupu do dutiny pánevní. Ve své poloze je upevněn na stropě dutiny břišní pomocí poměrně dlouhého vaječnickového okruží, které je kraniálním pokračováním širokého děložního vazů. Kromě toho je kratším vlastním vaječnickovým vazem připojen k děložnímu rohu (Marvan a kol., 2003). Reece et al. (1998) dodává, že vaječníky jsou zavěšeny na vlastním okruží (*mesovarium*) v dutině břišní, za pravou a levou ledvinou. Volnější zavěšení vaječnicků umožňuje snadnou manipulaci při rektální palpaci u krav a klisen.

Velikost vaječníku, jeho celkový tvar a vzhled povrchu a hmotnost se druhově liší (Marvan a kol., 2003). U většiny zvířat je vaječník mandlovitého tvaru, u klisen má tvar fazolovitý nebo ledvinovitý (Reece et al., 1998). U ovce a kozy je vaječník spíše kulovitý, tvaru lískového ořechu o průměru 1,5 – 1,8 cm (Marvan a kol., 2003). Vaječníky prasnic mají tvar hroznovitý, což je způsobeno početnými vyčnívajícími folikuly (Reece et al., 1998). Marvan a kol. (2003) dodávají, že jeho velikost se u pohlavně dospělých samic mění i v průběhu pohlavního cyklu.

Ovulace (uvolnění zralého vajíčka) probíhá u většiny druhů na celém povrchu vaječnicků, u klisen je omezena na malou ovulační plochu, nazývanou ovulační jamka. Ta dává vaječnickům klisny fazolovitý tvar (Reece et al., 1998).

Vaječnický mají na povrchu epitelovou vrstvu (Reece et al., 1998), tzv. zárodečný epitel, je to původní coelomový epitel, jednovrstevný kubický, který se na ovariu nepřeměnil v plochý dlaždicový epitel jako jinde na povrchu peritonea. Epitel peritoneální dutiny kryje ovarium proto, že se zakládalo retroperitoneálně a bylo tedy od začátku svého vývoje peritoneálním epitelem kryto (Čihák, 2004). Pod epitelovou vrstvou nalezneme bělavý obal - *tunica albuginea* (Reece et al., 1998), který jako vazivové pouzdro obaluje vlastní tkáň vaječnicku (Marvan a kol., 2003). *Tunica albuginea* je vazivová vrstva pod epitelem, zhuštěná na povrchu ovaria. *Stroma ovarii* představuje vazivo vyplňující celé ovarium. Rozlišuje se v něm *cortex ovarii* (kůra) která obsahuje hustší, na fibroblasty bohaté vazivové stroma. Je to povrchová vrstva, kde se nacházejí ovariaální folikuly, obsahující ženské pohlavní buňky v různých stupních vyzrání. *Medulla ovarii* (dřeň) obsahuje řidší vnitřní oblast vaziva s četnými cévami, krevními i mízními, s nervy a se snopci hladké svaloviny, původem s mesovaria, zasahujícími od hilu ovaria do dřeně (Čihák, 2004). Dřeň je umístěná centrálně a obsahuje řídké kolagenní vazivo, krevní a lymfatické nervy (Reece et al., 1998). Ve vazivovém stromatu kůry jsou rozmístěny hlavní strukturální části vaječnicku – folikuly a jejich deriváty (Marvan a kol., 2003).

Folikuly uvnitř kůry jsou klasifikovány jako primordiální (někdy nazývané primární), preantrální, antrální a Graafovy. (Reece et al., 1998). Primordiální folikuly jsou uloženy jednotlivě nebo ve skupinách v nejzevnější vrstvě vaječnickové kůry, přímo pod bělavým obalem. Jsou to kulovité útvary o velikosti 30-50  $\mu\text{m}$  (Marvan a kol., 2003), obsahují jeden oocyt, který je obklopen jednou vrstvou granulóznic buněk (Reece et al., 1998). Čihák (2002), dodává, že se jedná o nízké drobné buňky, které obklopují v jedné vrstvě oocyt, pro který představují ochranu a zprostředkování metabolismu. Oocyty pochází z malého množství primordiálních kmenových buněk (PGC) extragonadálního původu. Na počátku oogeneze v embryonálním období v průběhu utváření primitivního proužku se tyto primordiální zárodečné buňky formují a migrují až do místa budoucích gonád.

Primární oocyty vstupují ještě ve fetálním období do profáze prvního zracího dělení a v tomto stadiu přecházejí do vlastního zrání folikulu, které nastupuje až v období puberty (Čihák, 2002). Marvan a kol. (2003) dodává, že se tyto folikuly zakládají ještě v embryonálním období a v jednom vaječnicku jich má samice při narození 50-200 tisíc. Převážná většina těchto folikulů se však dále nevyvíjí a podléhá zániku - atrezii.

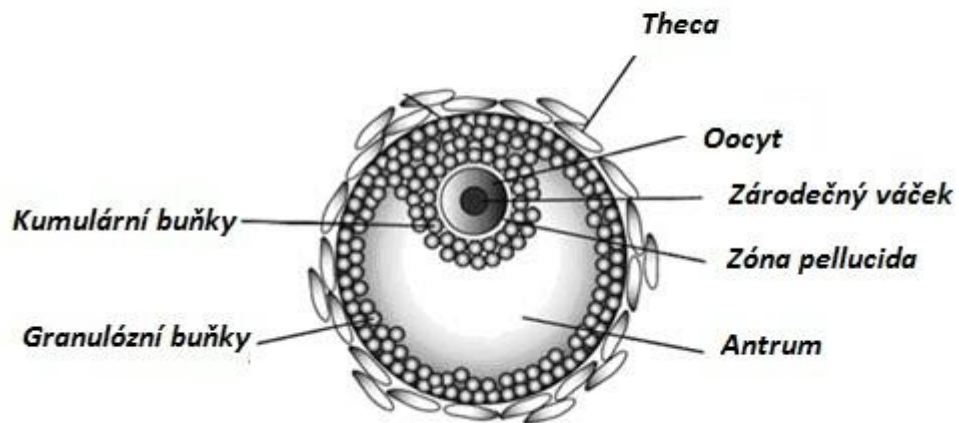
Rostoucí folikuly jsou ty, které začaly růst z klidového stadia primordiálních folikulů, ale ještě neutvořily vrstvy obalu folikulu a antrum (dutinu naplněnou tekutinou) (Reece et al., 1998). Objevují se v období pohlavní dospělosti. Jednotlivé folikuly postupně dozrávají. Ve vaječníku. Zde se současně nacházejí rostoucí folikuly v různém stupni vývoje, od malých, které právě růst zahajují, až po velké, téměř zralé folikuly (Čihák, 2002). Oocyt obklopují dvě nebo více vrstev granulózních buněk. S pokračováním růstu vznikají další vrstvy (Reece et al., 1998). Folikulární buňky, původně ploché, se mění v kubické (Čihák, 2002). Rostoucí folikul se zanořuje do hlubších vrstev kůry ovaria a vajíčko se ve folikulu dostává blíž ke stěně hlouběji uložené. Pak se mezi vrstvami folikulárních buněk objeví drobné dutinky vyplněné tekutinou, ty záhy splynou v jedinou dutinu a rostoucí folikul se mění ve foliku dozrávající, s charakteristickou dutinou (Čihák, 2002).

Graafovy folikuly již mají dobře viditelnou dutinu (*antrum folliculi*). Je u nich vyvinut vnější a vnitřní obal folikulu (*theca folliculi externa a theca folliculi interna*) (Reece et al., 1998). Folikul v tomto stádiu dosahuje velikosti 15 – 20 mm a polokulovitě prominuje nad povrch vaječníku (Marvan a kol., 2003). Vystylají ho folikulární buňky, které vytvářejí vrstvu zvanou *membrana granulosa*, složenou ze 4-5 vrstev buněk. *Membrana granulosa* je vyvýšená na místě, které nese oocyt – tvoří *cumulus oophorus*, vajíčko je na tomto vejconosném hrbolku uloženo a je obklopeno vrstvou *zona pellucida* a *codona radiata* (Marvan a kol., 2003). Při dozrání má oocyt velký průměr, patří k největším buňkám savčího těla (Čihák, 2002).

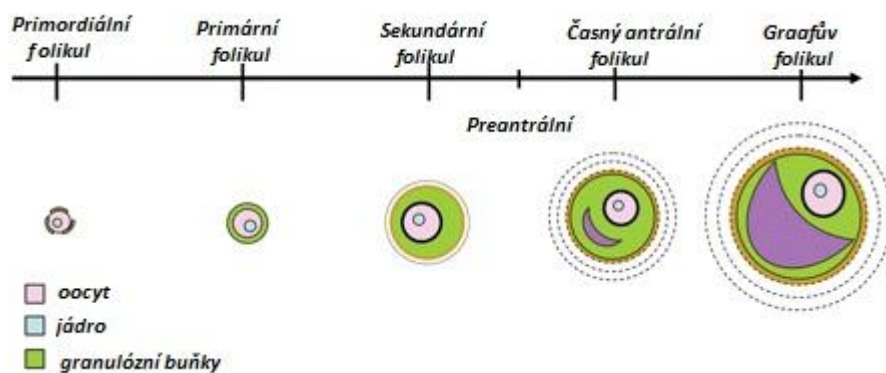
Zahájení růstu folikulů před pubertou není řízeno hormonálně, ale je pravděpodobně kontrolováno neznámým intraovariálním faktorem. Utváření Graafova folikulu je závislé na působení hormonů a začíná v pubertě, kdy tonická hladina LH a FSH začíná při každém estrálním cyklu kolísat. Mnoho folikulů, u kterých byl v každém cyklu zahájen růst a dozrávání, nikdy neovuluje. Proto počet primordiálních folikulů, které dosáhnou stadia Graafova folikulu a ovulují, tvoří velmi malou část z celkového počtu primordiálních folikulů při narození (Reece et al., 1998).

Proces, při kterém vnikají oocyty, se označuje jako oogeneze. Oocyty primordiálních folikulů se nazývají primární oocyty a jsou v klidovém stadiu meiózy. Čihák (2002) dodává, že v té době je růst oocytů přerušen ve stadiu profáze prvního zracího dělení a pokračuje až po pubertě, kdy se v cytoplazmě vytvářejí rezervní látky. Z jednoho primárního oocytu vznikne po redukčním dělení (meióza) poze jedno vajíčko. Vytváří se pólové tělísko, které však nemá dostatek cytoplazmatického materiálu pro udržení životaschopnosti (Reece et al., 1998). U většiny savců je oocyt uvolněn ovulací z vaječníku v metafázi druhého zracího dělení. Nedojde-li ke vniknutí spermie do vajíčka, zůstává uvolněné vajíčko ve stadiu sekundárního

oocytu a po 24 hodinách degeneruje a zaniká (Čihák, 2002). Další pólóvé tělísko se vytváří, pokud došlo k proniknutí spermie do vajíčka (Reece et al., 1998).



Obr. 1: Savčí folikul (Voronina and Wessel, 2003)



Obr. 2: Folikulogeneze

(<http://amh-test.com/>) [18.3.2012]

### 3.1.2 Vejcovod (*tuba uterina*)

Je to párová zvlněná hladkosvalová trubice vystlaná sliznicí, která přivádí vajíčka od vaječníku do příslušného rohu dělohy. Marvan a kol., (2003) dodávají, že je tloušťky stébla, délky u krávy 20 – 30 cm, u ovce a kozy 15cm a u prasnice 15 – 30 cm. Vejcovod slouží u domácích druhů zvířat k zachycení vaječné buňky (Marvan a kol., 2003), a jako místo pro oplození (*fertilizaci*) vajíček spermii (Reece et al., 1998). Čihák (2002) dodává, že pohyb řasinek epitelu tuby vytváří proud tekutiny směrem k děloze. Tato tekutina je zčásti nasátá peritoneální tekutina, zčásti produkt sekrečních buněk epitelu tuby a představuje prostředí vhodné pro transportované vajíčko. Svalovina tuby působí jednak pravidelný peristaltický pohyb od ostium abdominale k děloze, jednak (na podkladě podráždění) „antiperistaltický pohyb“ opačným směrem, který urychluje pohyb spermií směrem do ampuly. Těsně před ovulací se objevují aktivní pohyby svaloviny v oblasti infundibula a fimbrií a také svaloviny obsažené v závěsech a ligamentech ovaria, to vyvolá vzájemný aktivní pohyb ovaria a infundibula, při němž se fimbrie přiloží na povrch ovaria a obemknou vyvýšené místo vyklenutého dozrálého folikulu. Uvolnění vajíčka se pak děje téměř přímo do infundibula. Průchod vajíčka vejcovodem do dělohy u většiny druhů savců trvá 4-5 dní. K oplození dochází zpravidla v ampulární části vejcovodu. Změny sliznice (např. po zánětu) mohou zneprůchodnit vejcovod pro vajíčko a oplozené vajíčko se pak na místo v děloze usadí v tubě, zevně od neprůchodného místa, v případě oplození pak může dojít k mimoděložnímu těhotenství (březosti).

Vejcovod začíná v těsné blízkosti vaječníku širokou nálevkou, na jejímž dně se nachází 2 mm široký otvor břišního ústí. Silně ztenčená stěna nálevky vejcovodu vybíhá v cípaté trásně, z nichž některé jsou připojeny k vaječníku (Marvan a kol., 2003), a které při ovulaci pomáhají nasměrovat vajíčko do vejcovodu (Reece et al., 1998). Druhý konec vejcovodu se děložním ústím otevírá do děložního rohu (Marvan a kol., 2003).

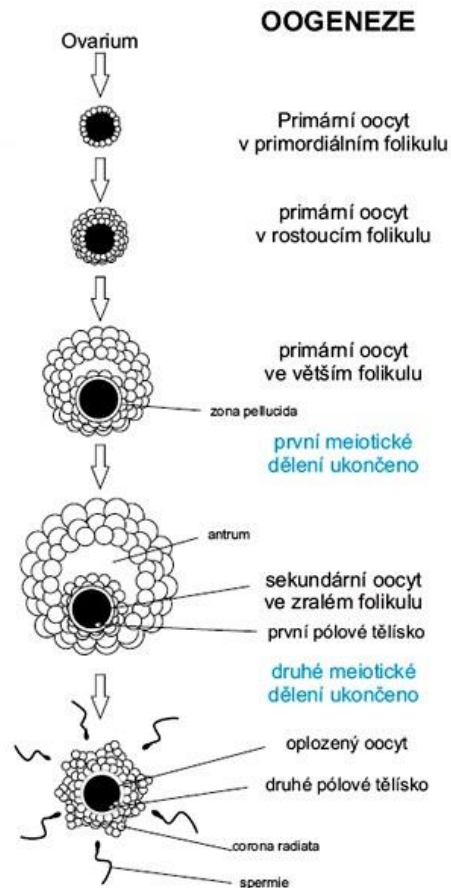
Vejcovod má silně zvlněný a klikatý průběh (Marvan a kol., 2003). Vnitřek vejcovodu je vystlán sekrečními a řasinkovými buňkami. Tyto buňky vytvářejí vhodné prostředí pro vajíčka a pro transport spermií. Ve stěně vejcovodu je jak podélná, tak kruhová hladká svalovina, která svými kontrakcemi pomáhá při transportu vajíček a spermií. Serózní povrchová vrstva vejcovodu je známá jako mesosalpinx – okružní vejcovodu, jedná se o pokračování okružní vaječníku a tvoří součást širokého vazů. Ten tvoří seriózní závěsný aparát vnitřních pohlavních orgánů (Reece et al., 1998).

Působením vaječnickových hormonů prodělává sliznice vejcovodu v průběhu pohlavního cyklu samice opakované změny, souborně označované jako vejcovodový cyklus. Svalovina vejcovodu je hladká, rozlišena na vnitřní kruhovou a vnější podélnou vrstvu a směrem k děloze zesiluje. Svými rytmickými stahy, spolu s kmitáním řasinek, zajišťuje přesun vaječné buňky do dělohy (Marvan a kol., 2003).

### 3.2 Oogeneze

Oogeneze, vývoj samičích pohlavních buněk, oocytů (Marvan a kol., 2003). Obdobně jako spermatogeneze probíhá i vývoj samičích pohlavních buněk ve třech obdobích: období rozmnožování, růstu a zrání (Sova, 1990). Vývoj samičích zárodečných buněk (vajíček), začíná již během fetálního vývoje samice (Romanovský et al., 1988). Výsledkem oogeneze je jedno oplození schopné vajíčko. Časový průběh oogeneze se liší od spermatogeneze. Fáze množení, začátek růstu a počátek zrání spadají do prenatálního období (Marvan a kol., 2003). Všechny oocyty pocházejí z kmenových buněk (primordiálních zárodečných buněk), které migrují do místa budoucího vaječníku. Tyto buňky se velmi dobře rozeznávají, liší se morfologií, velikostí i cytochemickými vlastnostmi (Wassarmann, 1988). Embryonální kmenová buňka má na rozdíl od kmenových buněk v diferencovaných tkáních neomezený diferenciatní potenciál. Tato schopnost, být zdrojem jakéhokoliv typu buněk, je postupně redukována v průběhu vývoje pod vlivem signálů vycházejících z mezibuněčných interakcí. Teprve tyto signály (epigenetické faktory) navozují expresi genů specifických pro určité linie buněk a nakonec pro určitý typ buňky (Čihák, 2001).

Zpětné „přeprogramování“ genomu diferencované somatické buňky na časnou embryonální úroveň lze navodit přenosem jádra do cytoplasmy vajíčka na místo jeho jádra, které bylo odstraněno. Na této specifické a vyjimečné vlastnosti cytoplasmy oocytu jsou založeny postupy, jejichž cílem je získat totipotentní embryonální kmenové buňky a z nich určité typy buněk terapeuticky použitelné k náhradě funkcí poškozených tkání (Čihák, 2001). Sládeček (1986) dodává, že podobně jako spermie také vajíčka se vyvíjejí z primordiálních gonocytů, které se usadily v základu samičí gonády, ve vaječníku (*ovarium*). Z prapohlavních buněk (PGC) vznikají oogonie, které se mitotickým dělením dále množí v rozmnožovací fázi oogeneze.



Obr. 3: Oogeneze

(<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Oogeneze.jpg>) [18.3.2012]

### 3.2.1 Fáze množení

Období množení začíná už u plodu samice, a to na povrchu vaječníku, kde se buňky zárodečného epitelu – oogonie – rychle mnohokrát za sebou mitoticky dělí (Sova, 1990). Na počátku oogeneze v embryonálním období, v průběhu utváření primitivního proužku, se primordiální zárodečné buňky formují a migrují. Nejprve se jedná o pasivní migraci ze stěny žloutkového vaku do epitelu zadního střeva. Následující migrace zárodečných buněk je vyvolána chemotaxí a směřuje podél dorzálního mesenteria pohlavní lišty až do místa budoucích gonád (Čihák, 2001). Sládeček (1986) dodává, že u savců pronikají oogonie bazální membránou zárodečného epitelu primitivní gonády a spolu s epiteliálními buňkami vnikají v zárodečných pruzích do její meduly. Tyto oogonie prvních generací degenerují a oogonie dalších generací zůstávají v povrchových, kortikálních vrstvách ovaria, kde se mitoticky množí. Výsledkem je velké množství oogonií, z nichž většina přestupuje z povrchu vaječníku pod vazivový obal kůry. Zde se každá vaječná buňka jako oocyt I. řádu obaluje

jednou vrstvou granulózniých buněk. Tak vznikají primární oocyty. Jsou přítomné ve velkém množství ve vaječnÍku novorozených samic (u telete 10 – 300 tisíc, u selete 60 - 100 tisíc) (Sova, 1990). Na konci rozmnořovací fáze vstupují oogonie do profáze I. dělení meiózy a stávají se z nich primární oocyty. U mnoha živočichů mizí v tomto období centrioly (Sládeček, 1986).

Dříve se myslelo, že se zárodečné buňky množí pouze v prenatalním vývoji samice, a samice se rodí s přesně stanoveným množstvím neobnovitelných zárodečných buněk (Eppig, 2001). Později však Johnson et al. (2004) ve svých pokusech zjistil, že vaječnÍky mladých i dospělých myší obsahují aktivní zárodečné buňky a jsou schopné po většinovém zničení primordiálních folikulů tyto folikuly obnovit. Oocyty mohou vzniknout kultivací buněk získaných z povrchového epitelu dospělých vaječnÍků, dokonce i z extragonadální tkáně.

### 3.2.2 Fáze růstu

Primární oocyty vstupují do období růstové fáze oogeneze, která vede k obrovskému zvětšení oocytu (Sládeček, 1986). Období růstu je velmi dlouhé, navazuje hned na období množení (Sova, 1990). Marvan a kol. (2003) dodává, že fáze růstu je dlouhé období, které trvá až do konce pohlavní činnosti. Primordiální folikuly se přeměňují na folikuly primární, které jsou složeny z oocytu a vrstvy kubických buněk (folikulárních) (Eppig, 2001). Granulózní buňky hrají v růstovém období nepostradatelnou roli. Oocyt bez jejich přítomnosti není schopen růstu a dalšího vývoje (Vanderhyden, 2002). Dále Eppig (2001) uvádí, že fáze růstu začíná po dosažení diktyoténního stádia. Od začátku pohlavní dospělosti v průběhu každého ovariálního cyklu vstupuje do fáze růstu vždy několik primárních *oocytů*. Toto období je charakteristické růstem jádra, aktivní syntézou RNA, proteinů, hromadění žloutkových inkluzí a vznikem a hromaděním kortikálních zrn pod jadernou membránou, které jsou důležité pro zajištění monospermatického typu oplození (Marvan a kol., 2003). Sládeček (1986) dodává, že v růstové fázi se jádro primárního oocytu velmi zvětřuje a vytváří tzv. zárodečný váček (*vesicula germinativa*), který byl poprvé pozorován J. E. Purkyněm v ptačím vejci v roce 1825. U obojživelníků se jádro zvětřuje více než 10 000krát. U mnoha živočichů se také velmi zvětřuje jadérko a vytváří v jádře tzv. zárodečnou skvrnu (*macula germinativa*). Po celé růstové období je jádro v profázi I. dělení meiózy, a to převážně v diploténu (Marvan a kol., 2003).

Růst primárního folikulu je spojen se zvětřováním vaječné buňky, která ve své cytoplazmě ukládá žloutkové inkluze. Rovněž folikulární buňky se zvětřují a postupně obalují oocyt v několika vrstvách (Marvan a kol., 2003). Obal oocytu složeny z několika vrstev



folikulárních buněk se nazývá membrana granulosa (Hyttel et al., 1999). Nejvnitřnější vrstva folikulárních buněk má cylindrický tvar a nazývá se *codona radiata* (Marvan a kol., 2003). Zároveň se mezi oocytem a granulózními buňkami tvoří *zona pelucida* (světlolomná blanka) (Eppig, 2001).

Když rostoucí folikul dosáhne určité velikosti (Marvan a kol., 2003), začne se jeho tvar měnit na ovoidní a začne se více zapouštět do kůry vaječníku (Hyttel et al., 1999). Pod vlivem LH jsou produkovány buňkami vrstvy theca interna androgeny. Ty difundují do granulózních buněk. Pod vlivem FSH konvertují androgeny na estrogény. Produkováné estrogény vyvolávají růst a dělení granulózních buněk a spolu s FSH stimulují granulózní buňky produkci sekretů, které způsobí separaci granulózních buněk (Reece et al., 1998). Mezi granulózními buňkami se začínou objevovat drobné štěrbinny vyplněné tekutinou. Postupným sléváním těchto štěrbin se nakonec vytvoří jednotná dutina, obsahující folikulární mok (Hyttel et al., 1999). Tato dutina se nazývá *antrum folliculi* (Reece et al., 1998). Tím se folikul mění v měchýřový folikul, viditelný už pouhým okem (Marvan a kol., 2003).

Dalším zvětšováním oocytu I. řádu, hlavně však množением folikulárních buněk a zvětšováním dutiny s folikulárním mokem, se celý folikul dále zvětšuje a postupně se vyklenuje nad povrch vaječníku. Zralý měchýřový – terciární folikul (Graafův folikul) představuje poslední vývojové stádium folikulogeneze (Marvan a kol., 2003). Ve folikulu se granulózní buňky shlukují v místě kolem oocytu, nazývají se kumulární buňky a vytvářejí vejconosný hrbolek, *cumulus oophorus* (Eppig, 2001). Folikulární buňky nejsou však jen pouhými obalovými buňkami oocytu, ale vykazují i významnou inkreční aktivitu; vylučují samičí pohlavní hormony – estrogény. Stěnu Graafova folikulu tvoří jeho obal, *theca folliculi* (Marvan a kol., 2003). Vznik Graafova folikulu z rostoucího folikulu je závislý na působení hormonů a začíná při dosažení puberty, kdy se tonická hladina LH (luteinizační hormon) a FSH (folikulostimulační hormon) začíná zvyšovat a klesat s průběhem každého estrálního cyklu. Intersticiální buňky začínají obklopotvat bazální membránu granulózních buněk, aby vytvořily obal, který se pak diferencuje na vnější a vnitřní vrstvu (*theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*). Na buňkách *theca interna* se formují receptory pro LH a na buňkách granulózních se formují receptory pro FSH a estrogény (Reece et al., 1998).

Během růstu folikulu se vaječná buňka postupně zvětšuje, díky ukládání žlutkových inkluzí ve své cytoplazmě. Před ovulací dosahuje velikosti 150 – 200 $\mu$ m, u prasete 120 $\mu$ m. Současně s tím v ní probíhá první zrací dělení, které nejčastěji dokončuje těsně před ovulací, někdy v průběhu ovulace nebo až po ní (Marvan a kol., 2003).

### 3.2.2.1 Meiotická kompetence

Meiotickou kompetencí můžeme označit schopnost znovuzahájení a dokončení meiotického zrání. Oocyt získává tuto schopnost během růstu, teprve oocyty s ukončenou fází růstu jsou schopné dosáhnout stádia druhé meiotické metafáze a jsou tedy meioticky kompetentní (Motlik et al., 1984). Meioticky kompetentní oocyty jsou větší než nekompetentní, vykazují kondenzaci chromatinu kolem jadérka a postupně se začínají jejich mikrotubuly organizovat do center, zatímco u nekompetentních oocytů jsou rozptýlené (Wickramasinghe et al., 1991).

Schopnost oocytu znovuzahájit meiózu však ještě nutně nemusí znamenat, že získal úplnou meiotickou kompetenci, potřebnou k dosažení metafáze II. Oocyty získané z malých antrálních folikulů jsou schopny znovuzahájit meiózu, což se projevuje rozpadem zárodečného váčku (*germinal vesical breakdown*, GVBD) a jsou schopny dále dosáhnout metafáze I, avšak ztrácejí schopnost vstoupit do druhého meiotického dělení a dosáhnout metafáze II. Jedná se tudíž pouze o dosažení částečné meiotické kompetence (Eppig, 2001).

Pokud dorostlé savčí oocyty opustí folikul, meióza se spontánně obnoví. Významné morfologické a funkční změny nastávají v prasečích oocytech během časných stádií antrální formace. Získání meiotické kompetence souvisí s velikostí oocytu, stejně jako s jeho nukleárními strukturami a funkcemi (Motlik et al., 1984). Martino et al. (1994) dodává, že byla pozorována korelace mezi průměrem oocytu a jeho schopností dokončit meiotické zrání, také oocyty s více vrstvami kumulárních buněk vykazují převahu při dokončování meiotického zrání. U koz jsou schopny dokončit zrání a dosáhnout meiotické kompetence oocyty uložené ve folikulech větších než 3,0mm.

Získání meiotické kompetence u oocytů bylo často spojováno se vzhledem antrální dutiny a velikostí oocytu. Toto bylo prokázáno u několika druhů hlodavců. Nicméně u oocytů prasat neznamená vytvoření antra ve folikulu způsoblost k obnovení meiotického zrání. Z plně vyvinutých folikulů s antrem pokračuje ve vývoji pouze 12% z nich. Když se tvoří antrum u prasečích folikulů (0 - 5mm v průměru), oocyty intenzivně syntetizují RNA. V této fázi je jejich schopnost obnovit jaderné zrání omezená. Během dalšího vývoje folikulů se jadérko zkomprimuje a RNA syntéza se výrazně snižuje. Velký počet těchto oocytů (66%) dosáhne nakonec členění zárodečného váčku, ale pouze 3 až 17% z nich dosáhne metafáze II.

Morfologické a funkční změny, které probíhají v oocytech od počátku antrálního folikulu, jsou jednou z věcí potřebných pro získání meiotické kompetence. Gall et al. (1996) vyzdvihuje důležitost bílkovin (jejich fosforylaci a defosforylaci), které hrají při zrání oocytů klíčovou roli. Je možné, že u meioticky nekompetentních oocytů jsou takovéto pochody

nedostatečné. Bylo prokázáno, že ve stádiu zárodečného váčku meioticky kompetentní a nekompetentní kozi oocyty zobrazují různé „vzory“ bílkovin a jejich fosforylace. Jakmile jsou oocyty schopny pokračovat v meióze, musí se podrobit zvláštním změnám ve fosforylaci proteinů.

Schopnost savčích oocytů pokračovat v meióze a dokončit první meiotické dělení vzniká postupně v průběhu jejich růstové fáze a získání meiotické kompetence souvisí s velikostí oocytu a folikulu (Gall et al., 1996). Vysoká míra RNA syntézy, která charakterizuje oocyty v antrálních folikulech je pravděpodobně potřeba pro uchování některých informací potřebných pro zahájení a dokončení meiotického dělení. Je možné, že neschopnost pokračovat v meióze je zapříčiněna nedostatkem mRNA kódující cytoplazmatické faktory (např. MPF). Současné experimenty ukazují, že většina oocytů prasat, menších než 1mm, může pokračovat ve vývoji i po členění zárodečného váčku a již pravděpodobně mají schopnost syntetizovat tyto cytoplazmatické faktory.

Významný pokles DNA transkripční aktivity dochází během procesu nukleolárního zhuštění, kdy oocyty dosáhnou plné velikosti. RNA syntéza tedy v oocytech také může hrát roli při konečném získání meiotické kompetence (Motlik et al., 1984).

### 3.2.3 Fáze zrání

Je posledním obdobím ve vývoji oocytu (Sova, 1990) a nastupuje po ukončení růstového období (Sládeček, 1986). Začátek meiózy nebo prvního zracího dělení proběhl už v prenatalním období, kdy byl přerušen v *diploenním* stádiu prvního zracího dělení (Wassermann, 1998). Meióza je charakteristická dvěma zracími děleními. První zrací dělení začíná ještě v dozrávajícím folikulu. Druhé zrací dělení se u mnoha živočichů zastavuje v metafázi až do doby, kdy je vajíčko oplozeno. Tento oocyt je možno považovat za zralý (Sládeček, 1986). Marvan a kol. (2003) dále uvádí, že v případě oplození dochází k oddělení jedné sady chromozómů s malou částí cytoplazmy do sekundárního pólového tělísko. Obě pólová tělíska nemají schopnost dalšího vývoje, i když první pólové tělísko se ještě může rozdělit. Polocyty nemají u většiny živočichů funkční význam a brzy zanikají (Sládeček, 1986). Nedojde – li k oplození, nebo partogenetické aktivaci degeneruje také oocyt (Marvan a kol., 2003).

Po ovulaci se na vaječníku v místě prasklého folikulu začne vyvíjet zvláštní kompaktní útvar s významnou funkcí – žluté tělísko (*corpus luteum*) (Marvan a kol., 2003). Prasklý Graafův folikul se nejprve vyplní sraženou krví. Buňky folikulární stěny se zde zmnožují, zvětšují a přeměňují se v luteální buňky s bohatým obsahem tukových kapének a žlutého barviva –

luteinu. Luteální buňky postupně vyplňují původní dutinu folikulu (Sova, 1990). Pokud byla dozralá vaječná buňka ve vejcovodu oplodněna, žluté tělíčko se silně zvětšuje a zůstává na vaječnicku téměř po celou dobu březosti (Marvan a kol., 2003). Sova (1990) dodává, že se pak takové žluté tělíčko nazývá *corpus luteum graviditatis (verum)*. Jeho buňky syntetizují a do tkáňového moku vyměšují pohlavní hormon progesteron, který na vaječnicku blokuje dozrávání a ovulaci dalších folikulů. Pokud nedojde k oplození, žluté tělíčko se postupně zmenšuje, až po sobě zanechá jen bělavou skvrnu na vaječnicku a cyklus se může opakovat (Marvan a kol., 2003).

V dnešní době je také možné nechat zrát oocyty v podmínkách *in vitro*. Největšímu průlomů v tomto oboru došlo v 60. letech, kdy publikoval svou práci J. J. Eppig. Zjistil, že pro růst oocyty jsou zásadní granulózní buňky, a že v podmínkách *in vitro* lze oocyt i oplodnit. Postupem času byly kultivovány oocyty mnoha živočichů (myši, potkana, křečka, kočky, prasete, ovce, kozy, krávy a dalších), ale také člověka (Senbon et al., 2003).

### 3.2.4 Buněčný cyklus

Cyklus buňky začíná obdobím mezi dvěma děleními, tj. intervizí, a končí rozdělením buňky. Během cyklu dochází k syntéze nových nukleových kyselin i proteinů a k vlastnímu rozdělení buňky. U většiny buněk se tento cyklus opakuje a má několik fází. Začátek intervize je označován jako  $G_1$  – fáze, po ní následuje S - fáze a  $G_2$  - fáze. Vlastní dělení bývá označována jako M - fáze (Marvan a kol., 2003). Hlavním kritériem tohoto dělení cyklu na čtyři fáze jsou dvě nápadné události: replikace jaderné DNA a rozdělení jádra spojené zpravidla s rozdělením buňky (*cytokinezi*). Období replikace jaderné DNA bylo označeno jako S - fáze a časový úsek zahrnující meiózu (mitózu) jako M - fáze. Mezi obě tyto fáze jsou zařazeny dva časové úseky, kdy syntéza jaderné DNA neprobíhá, první byla označena jako  $G_1$  - fáze a druhá jako  $G_2$  - fáze. Časové trvání všech fází dohromady označujeme jako délku buněčného cyklu nebo jako generační dobu buňky (Nečas, 1989).

$G_1$  – fáze začíná v okamžiku, kdy se po rozdělení mateřské buňky stává dceřiná buňka soustavou schopnou samostatné existence a končí zahájením replikace jaderné DNA, tj. S - fází (Nečas, 1989). Buňka přibývá na hmotnosti, zvyšuje se počet mitochondrií. Tvoří se zásoba RNA (Marvan a kol., 2003). Zvětšuje se počet většiny buněčných struktur, jako ribosomů, mitochondrií, endoplazmatického reticula atd. Vytváří se také zásoba nukleotidů a syntetizují se enzymy pro budoucí replikaci jaderné DNA. Časový úsek zahrnující tuto fázi není u různých buněk stejný. V této fázi leží hlavní kontrolní uzel celého buněčného cyklu (Nečas, 1989).

S-fáze (syntetická) - v ní probíhá replikace jaderné DNA, což znamená zdvojnásobení genů a DNA (Marvan a kol., 2003). Replikace nejaderné DNA (tj. mitochondriální a chloroplastové) není ve většině případů synchronizována s S - fází, ale probíhá během celého cyklu (s výjimkou M – fáze) souběžně s tím, jak se počet struktur s nejadernými chromozómy zmnožuje (Nečas, 1989). Pokračuje syntéza RNA a proteosyntéza. Její trvání představuje 30-50% celého buněčného cyklu (Marvan a kol., 2003), délka trvání této fáze je u různých buněk různá, ale u dané buňky je vždy konstantní (Nečas, 1989).

G<sub>2</sub> – fáze, také nazývané druhá přípravná fáze, nastupuje skončením S - fáze a končí zahájením meiózy (Nečas, 1989). Pokračuje zde syntéza RNA, proteosyntéza a zvýšená syntéza bílkovin mitotického aparátu. Je ukončena zahájením mitózy. Její délka představuje 10 – 30% doby celého buněčného cyklu (Marvan a kol., 2003). V této fázi leží druhý ze základních kontrolních uzlů buněčného cyklu, který rozhoduje o tom, zda buňky do meiózy skutečně vstoupí (Nečas, 1989).

M - fáze – je poslední etapou buněčného cyklu, která je zpravidla zakončena vlastním rozdělením buňky tj. cytokinezí. Za začátek této fáze považujeme chování jádra, zejména nástup strukturních změn chromozómů, tedy jejich kondenzace, rozpad jaderné membrány atd. (Nečas, 1989). Dělení buněk tedy probíhá nejčastěji jako mitóza, dále meióza, která je zvláštním typem dělení zrajících pohlavních buněk, a amitóza, která je v současné době považována za zcela výjimečnou (Marvan a kol., 2003). Gálová a kol. (2004) dodává, že meióza je specifický typ dělení, výsledkem kterého je vznik pohlavních (haploidních buněk). Samotné meióze předchází replikace homologických chromozómů (dvě kopie každého chromozómu, jedna od matky a jedna od otce), které se potom párují a podléhají dvěma dělením. Z původní diploidní 2n buňky vznikají čtyři haploidní buňky n (toto platí u spermií, u oocytů vzniká pouze jedna plnohodnotná haploidní buňka a ostatní jsou pólocyty), ze kterých každá získá poloviční množství původních chromozómů, tj. jednu chromozómovou sadu, jeden úplný chromozómový genom. Tato redukce je potřebná, protože splynutím gamet při oplození dojde k obnovení diploidního počtu chromozómů v buňkách embrya (Gálová a kol., 2004). Trvání M - fáze je relativně konstantní fází cyklu a je poměrně krátké, zaujímá 5 - 10 % cyklu (Nečas, 1989).

Narozdíl od mitózy se meióza skládá z dvou jaderných dělení – prvního meiotického dělení a druhého meiotického dělení. V čase prvního meiotického dělení dochází k redukci počtu chromozómů a je označováno také jako heterotypické. Skládá se ze čtyř fází: Profáze I, Metafáze I, Anafáze I a Telofáze I (Gálová a kol., 2004).

### **3.2.4.1 Profáze**

První zrací dělení má mnohem delší profázi, než je tomu u somatických buněk. Profáze je dlouhá a skládá se z několika stádií – leptotenního, zygotenního, pachytenního, diplotenního a diakineze. Gálová a kol. (2004) dodává, že profáze je složitou a nejvýznamnější fází celého meiotického dělení. V klidovém stádiu neboli v intervizi jsou chromozómy nespiralizovány. Ještě na počátku profáze jsou chromozómy téměř neznatelné (Marvan a kol., 2003). Gálová a kol. (2004) dodává, že dochází ke kondenzaci chromozómů, rozpadá se jaderná membrána a ztrácí se jadérko. Každý replikovaný chromozóm se páruje se svým homologem za vzniku struktury nazývané bivalent, který obsahuje čtyři chromatidy. Chromozómy jsou navzájem spojené pomocí synaptonemálního komplexu, tvořeného proteinovou kostrou, kterou má z každé strany přiložený jeden z replikovaných chromozómů. Párování chromozómů do bivalentů umožňuje genetickou rekombinaci, při které může být část mateřské chromatidy zaměněná odpovídajícím fragmentem homologii otcovské chromatidy. Tento děj se označuje jako crossing-over, neboli překřížení. Nečas (1989) dodává, že celá I. profáze probíhá v jádře s dosud zachovalou membránou a jadérkem.

#### **Leptotenní stádium**

V leptotenním stádiu se chromozómy spiralizují, dehydratují a dekondenzují. V jádru a jsou patrné jako štíhlá vlákna. Z počátku sice připomínají klubíčka, ale pak se přesouvají a vytvářejí útvar v podobě růžice, tzv. leptotenní buket (Marvan a kol., 2003).

#### **Zygotenní stádium**

V zygotenním stádiu se k sobě homology přikládají a dochází k jejich spojení neboli konjugaci. Vzniklé útvary se nazývají bivalenty (Marvan a kol., 2003). Tím se k sobě přesně přikládají jejich homologii centromery i všechny homologii kusy. V synapsi chromozómů hraje důležitou roli složitý bílkovinný systém chromozómů, tzv. synaptonemální komplex. V této fázi označujeme chromozómy jako chromatidy (Nečas, 1989). Počet konjugovaných dvojic je poloviční proti původnímu počtu (Marvan a kol., 2003).

#### **Pachytenní stádium**

V pachytenním stádiu se bivalentní chromozómy zkracují, ztlustňují, přičemž každý chromozóm se podélně rozštěpí na dvě chromatidy. Každý bivalent je nyní tvořen čtyřmi chromatidami, tzv. tetráda (Marvan a kol., 2003). Obě sesterské chromatidy, které vznikly z jednoho původního chromozómu, se pak kolem sebe spirálovitě obtácejí. Jsou však spolu spojeny společnou, dosud nezdojenou, centromerou. Oba spárované homologii chromozómy každého bivalentu (se svými dvojitými chromatidami) se rovněž kolem sebe spirálně ovíjejí.

Následné postupné oddělování homologních chromozómů končí jejich rozestupem, s výjimkou určitých míst, kde jim vzájemné obtočení v oddělení brání. Takových míst může být v jednom páru i několik, avšak nemusí být žádné. V těchto místech se chromatidy, zpravidla po jedné chromatice z každého homologního chromozómu, přeruší, hned na to se jejich oddělené části znovu spojí, avšak někdy opačně, takže si nesesterské chromatidy daného chromozómového páru své oddělené části vymění (Nečas, 1989). Tento děj se nazývá crossing-over, jehož podstatou je vzájemná výměna genetického materiálu. Vznikem tetrad nastávají podmínky pro redukci chromozómů, protože během dvou zracích (meiotických) dělení se 4 části tetrad rozdělí do čtyř gamet. Tvorba tetrad je hlavním rozdílem mezi meiózou a mitózou (Marvan a kol., 2003).

### **Diplotenní stádium**

V diplotenním stadiu se dvojitě bivalenty dále zkracují (Nečas, 1989), homologní chromozómy oddělují, ale jejich chromatidy ještě zůstávají spojeny v místech, tzv. chiasmatech (Marvan a kol., 2003). Chiasmata se tak stávají dobře patrnými, stejně jako místa, kde jsou dosud spojeny (Nečas, 1989).

### **Diakineze**

V diakinezi se bivalentní chromozómy nadále zkracují a chromozómy zůstávají spojeny svými centromerami. Po skončení výměny následují další fáze jako při mitóze (Marvan a kol., 2003). Nečas (1989) ještě dodává, že chiasmata se posunují až ke koncům chromatid. Tento děj se nazývá terminalizace chiasmat.

## **3.2.4.2 Metafáze**

Na začátku I. Metafáze se rozpustí jaderná membrána a zaniká jádro (Marvan a kol., 2003), mizí jadérko a diferencuje se dělicí vřeténko (Nečas, 1989). Bivalenty se připárují k dělicímu vřeténku (Gálová a kol., 2004) a uspořádají se do ekvatoriální roviny (Marvan a kol., 2003). Jedna centromera z každého páru pak v této rovině orientuje svůj chromozóm (otcovský či mateřský event. rekombinovaný) směrem k jednomu pólu buňky a druhá k opačnému. Tato orientace obou rodičovských chromozómů (se zdvojenými chromatidami) je v každém páru náhodná, je tím rozhodnuto o jejich pozdější náhodné segregaci do gamet (a tím o sestavení chromozómové sady každé gamety) (Nečas, 1989).

Kontrola přechodu z metafáze do anafáze je hlavní složkou regulace buněčného cyklu. Blok v metafázi je součástí oogeneze u mnoha organismů a je významným kontrolním stanovištěm v meiotickém buněčném cyklu (McKim et al., 1993).

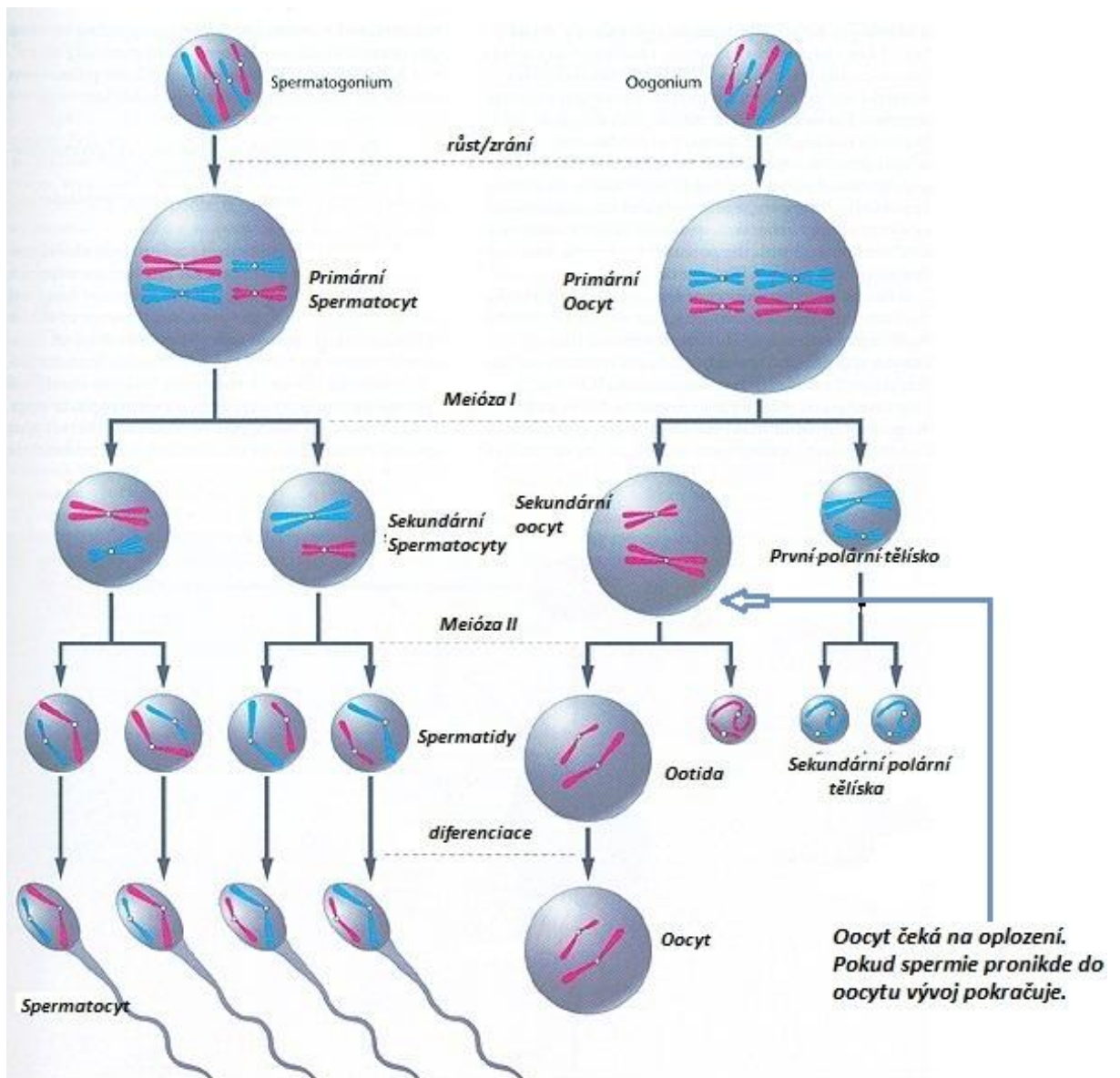
### 3.2.4.3 Anafáze

V anafázi I se homologní chromozómy přesouvají k opačnému pólu buňky jako diody s dvěma chromatidami, protože centromery se nerozdělily (Marvan a kol., 2003). Bivalenty zanikají (Nečas, 1989). Gálová a kol. (2004) dodávají, že se oba replikované chromozómy (stále tvořené dvěma sesterskými chromatidami) oddělují a jsou taženy k opačným pólům. Sesterské chromatidy jsou stále pevně spojené a pohybují se jako jeden celek (jeden chromozóm). Obě chromatidy jsou navzájem identické, s výjimkou míst, kde došlo ke genetické rekombinaci (crossing-over). V této fázi meiotického dělení dochází tedy k samostatné redukci počtu chromozómů, čímž se anafáze I zásadně liší od anafáze mitotického dělení, při které putují k pólům jednotlivé chromatidy. Nečas (1989) dodává, že se chromozómy po mikrotubulech dělicího vřeténka posunují k opačnému pólu buňky, kde se nakonec shromáždí úplná haploidní sada chromozómů.

### 3.2.4.4 Telofáze

V I. Telofázi vznikají dvě sekundární buňky (*primární polocyt a oocyt*) s polovičním počtem chromozómů (diád). Nedochozí však k rekonstrukci jádra ani k dekonenzaci chromozómů. Na chromozómech je patrné zdvojení ve dvě chromatidy. Po krátké intervizi následuje druhé zrací dělení (Marvan a kol., 2003). Sládeček (1986) dodává, že dceřiné chromozómy seskupují u pólů, částečně nespiralizují, ztenčují se a prodlužují, kolem nich se z okolního endoplazmatického retikula vytváří nová jederná membrána a dělicí vřeténko se depolymerací tubulinu vláček rozpadá. Činností nukleolárních organizátorů některých chromozómů vznikají v dceřiných jádrech nová jadérka, *nukleoly*.





Obr. 4: Meióza

(<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcaplan/anat2/notes/APIINotes2%20meiosis.htm>) [18.3.2012]

### 3.3 Vybrané faktory ovlivňující růst oocytů

#### 3.3.1 MPF

MPF byl poprvé objeven v oocytech žáby *Rana pipiens* v roce 1971. Byl pojmenován Maturation Promoting Factor, protože ovlivňuje zrání oocytů. U vyšších živočichů byl poprvé popsán v oocytu myši v roce 1977 a o pár let později také v oocytu prasete (Fulka, 1983). Později byl přejmenován na Metaphase Promoting Factor, protože byla jeho přítomnost a funkce objevena i v somatických buňkách, kde reguluje vstup do M - fáze (Verlhac et al., 1993).

MPF se skládá ze dvou podjednotek. Regulační podjednotku tvoří cyklin B (B1, B2) a funkci pojednotky zastává cyklin dependentní kináza (cdk1), označované také jako Cdc2 (Voronina and Wessel, 2003). Wu et al. (1997) dodává, že cyklin-dependentní kináza cdk1 se jinak také označuje p34cdc2.

MPF je jeden z článků regulačního řetězce, je druhově zaměnitelný a je společným pro tělní i zárodečné buňky. U embryí je součástí „hodin“ určujících pravidelný rytmus dělení (Nedvídek a Romanovský, 1993). Ovšem hlavní funkcí MPF je regulace buněčného cyklu, jeho spuštění, vedoucí k meiotickému zrání oocytů. Na meiotickém zrání se podílejí i mnohé další faktory, které s MPF „spolupracují“ jako například: hormonů a signálů procházejících mezi buňkami (Verlhac et al., 1993). Jeho přítomnost v cytoplazmě stimuluje spiralizaci chromatinu do chromozómů, tvorbu dělicího vřeténka a přechod do metafáze. Trvalá přítomnost aktivní formy vede k zastavení meiózy v metafázi (dlouhodobě např. u oocytů až do oplození) (Nedvídek a Romanovský, 1993).

Výše zmíněný p34cdc2 je univerzální regulátor buněčného cyklu ovlivňující přechod z G2 do M - fáze v meiotických i mitotických cyklech. Zatím co hladiny cdk1 zůstávají konstantní po celou dobu působení, množství cyklinů však obvykle kolísá v průběhu buněčného cyklu díky periodickým syntézám a degradacím (Wu et al., 1997).

Mechanismy působení při meióze a mitóze jsou zcela odlišné, přesto stejné cykliny mohou být hlavními regulátory stejných procesů. Vývoj oocytu zůstává dlouhou dobu pozastaven v profázi MI. Následně pokračuje meiotické dělení oocytu, přičemž se nejdříve hromadí a posléze aktivuje MPF. Meiotické dělení je samo o sobě modifikací mitotického, přičemž buňka nepodléhá replikaci DNA a proto se množství DNA snižuje – tudíž je buňka při meióze haploidní. To je důsledkem skutečnosti, že regulace MPF během meiózy pomocí MPF je jiná než během mitotického cyklu. MPF aktivita se tedy v meióze prudce zvyšuje po prvním meiotickém dělení. Mechanismus regulace meiózy pomocí MPF je u všech druhů stejný.

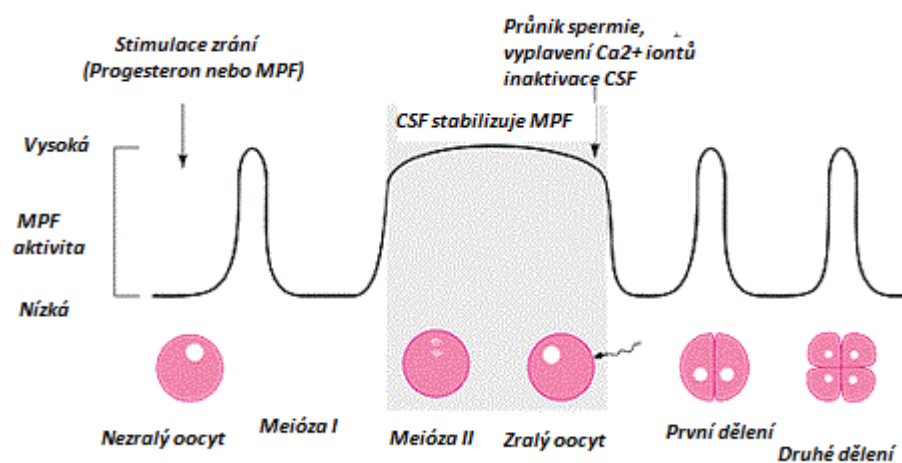
Jedním z mechanismů regulace meiózy pomocí MPF v oocytech je akumulace proteinu cyklinu B (tento mechanismus je nejlépe prozkoumán u ryb) (Voronina and Wessel, 2003).

Ve fázi růstu oocytů, vzniká neaktivní komplex pre-MPF, který vzniká spojením obou podjednotek MPF – cdk1 a cyklinu B. (Murray and Kirschner, 1989). Znovuzahájení meiózy tedy vyžaduje zaktivování pre-MPF (Motlík a Kubelka, 1990). Aktivita MPF je ovlivňována fosforylací a syntézou proteinů (Procházka et al., 1989). K aktivaci MPF je nezbytná defosforylace p34cdc2 na threonin 14 a tyrosin 15. K úplné aktivaci komplexu p34<sup>cdc2</sup> musí současně s defosforylací dojít i k fosforylací na threoninu 161 prostřednictvím protein kinázy, která se nazývá cdc-aktivační kináza (Dunphy and Kumagai, 1991).

Doprava MPF mezi cytoplazmou a jádrem je důležitá pro jeho aktivaci, funkci a dynamické změny v jeho lokalizaci mohou přispět k jeho aktivaci (Voronina and Wessel, 2003).

Zránění oocytů a jeho pozastavení v metafázi meiózy II se řídí změnami v aktivitě MPF. Byly provedeny pokusy, které zkoumaly dynamiku aktivity MPF a jejich dílčích proteinů a průběhu zrání oocytů *in-vitro*. U oocytů skotu má MPF poměrně nízkou aktivitu v prvních 8 hodinách zrání. Poté se MPF činnost postupně zvyšuje a prvního vrcholu dosahuje po 12 – 14 hodinách zrání. Následně dochází k náhlému poklesu činnosti po 16 - 18 hodinách během předpokládané anafáze a telováže. MPF činnost opět vzrůstá po 20-24 hodinách zrání (MII). Tato vysoká úroveň MPF je udržována po dobu několika hodin, poté se hladina postupně snižuje a 48hodin po začátku zrání je již jen stěží detekovatelná. (Wu et al., 1997).

MPF spolupracuje s dalšími významnými faktory ovlivňujícími meiózu. Nejvíce je provázána spolupráce mezi MPF a MAPK. Aktivita MPF klesá při přechodu mezi meiózou I a meiózou II, zatímco MAPK aktivita je stabilní. Stále se pokoušíme odhalit souhry těchto klíčových regulátorů meiózy u obojživelníků a savců.



Obr. 5: Hladina MPF během zrání oocytu a raného embryonálního vývoje

(<http://9e.devbio.com/article.php?id=78>) [18.3.2012]

### 3.3.2 Cyklické nukleotidy

Významnými prvky řídicími růst a zrání oocytů jsou cAMP (cyklický adenosin monofosfát) a cGMP (cyklický guanosin monofosfát) (Törnell et al., 1991).

cAMP je produkován adenyláte cyklázami a degradován fosfodiesterázami (Richard, 2007). Jejich tvorba v buňce je pod vlivem signálů prostředí, zachycovaných receptory buněčné membrány. Princip působení je založen na proteinových hormonech přenášených přes membránový receptor na enzym adenylcyklázu, který vyvolá syntézu cAMP (Sládeček, 1986). Nečas (1989) dodává, že po vazbě hormonu se změní konformace receptoru. Takto pozměněný receptor působí jako alosterický regulátor na zvláštní membránový protein (GTP – vázící protein či zkráceně G-protein), který pak aktivuje adenylcyklázu. Zvýšení či snížení aktivity adenylcyklázy pak mění vnitrobuněčnou hladinu cAMP. cAMP kontroluje aktivitu jiných enzymů – např. proteinkináz, které fosforylují další enzymy, čímž regulují (zvyšují nebo snižují) jejich aktivitu. cAMP bývá považován za jakýsi univerzální přenašeč informací v hormonálních regulacích. Dále vysoká hladina cAMP inhibuje buněčné dělení patrně tím, že se podílí na inhibici polymeraci tubulinu při vzniku dělicího vřeténka a hlavně tím, že inhibuje PKA. Tímto snížením aktivity PKA je umožněna aktivace CDK1/cyklinu B.

V normálním cyklu buňky se hladina cAMP periodicky mění – je hydrolyzována fosfodiesterázou a je nejnižší v průběhu mitózy, kdežto hladina cAMP v oocytu prodělává opačné výkyvy, přechodně stoupá v M a G1 – fázi, potom klesá. Pro nástup S - fáze má význam zvýšení hladiny cAMP spolu ionty  $Ca^{2+}$ , jejichž uvolňování v buňce je regulováno proteinem kalmodulinem. Cyklický AMP může vyvolat změny v distribuci iontů  $Ca^{2+}$ , které ovlivní mikrotubuly i kontraktilní mikrofilamenty cytoskeletu, to je důležité v mobilitě povrchu buňky (Sládeček, 1986).

V somatických buňkách cAMP funguje jako pozitivní a negativní regulátor buněčného cyklu, jeho účinky se projevují především v G1 fázi buněčného cyklu. Dále je cAMP známým inhibitorem zrání oocytů. Vysoká hladina cAMP v cytoplazmě inhibuje zrání oocytů. Údaje z výzkumu naznačují, že změny hladiny cAMP v průběhu zrání oocytu závisí na mechanismu vyvolání zrání oocytů (Voronina and Wessel, 2003).

Vysoká úroveň cAMP v oocytech dokáže zastavit zrání oocytu v diplotenní profázi I u savců. Poté u savců LH vyvolá proces, který vede k poklesu intracelulární cAMP úrovně a tento pokles je opět příčinou znovuzahájení meiózy (Senthilkumaran, 2011). Existuje rovnováha mezi výrobou a degradací cAMP v profázi I., která udržuje hladinu cAMP na odpovídající úrovni pro zachování meiotické profáze (Lowther et al., 2011). MPF pak přispěje k postupu

oocyty k dokončení metafáze I následované metafází II (Senthilkumaran, 2011). Tuto teorii ve své práci podporuje i Richard (2007), který dochází ke stejnému závěru, že savčí oocyty jsou *in vivo* pozastaveny v profázi prvního meiotického dělení před předovulačním vyvoláním zrání LH. Jednou z důležitých signálních molekul pro toto zahájení meiózy je cyklický AMP. Práci na stejné téma v pozdějších letech publikoval i Norris et al. (2009), který tuto teorii podporuje a více do hloubky rozebírá. Uvádí, že savčí oocyty jsou blokovány v meiotické profázi, v níž je udržují inhibičním signálem okolní somatické buňky v ovariálním folikulu. V reakci na LH, který se váže na receptory somatických buněk, oocyt pokračuje do druhé meiotické metafáze, kde může být oplodněn.

Předmětem výzkumu také bylo, jak regulovat signály ze somatických buněk, které ovlivňují přechod z profáze do metafáze, a dokázat že signální molekulou může být cGMP. Pomocí FRET na základě senzorů cyklických nukleotidů ve folikulech bylo zjištěno, že cGMP prochází pomocí gap junctions do oocyty, kde inhibuje hydrolýzu fosfodiesterázy PDE3A. jedná se o enzym štěpící cAMP na jeho necyklickou formu AMP. PDE je specifická pro oocyty a nezbytná pro znovuzahájení meiózy u myši. Tato inhibice udržuje vysokou koncentraci cAMP a tím blokuje meiotický postup. LH obrátí inhibiční signál snížením hladiny cGMP v somatických buňkách a uzavřením gap junctions mezi somatickými buňkami. Výsledný pokles cGMP v oocyty zbavuje inhibici PDE3A a to zvyšuje svou činnost až 5x. To způsobí snížení hladiny cAMP, což vede k obnovení meiózy (Norris et al., 2009).

Funkce cAMP při zrání oocytů je méně jasná. cGMP a cAMP spolu signalizačně spolupracují a snížení hladiny cGMP je jedním ze spouštěcích signálů vedoucích k meiotickému zrání (Vaccari et al., 2009). Signální dráhy, které zvyšují hladinu intracelulárního cyklického AMP (cAMP), mohou buď předcházet, nebo vyvolávat zrání oocytů, v závislosti na druhu živočicha. U savců vysoká hladina cAMP inhibuje zrání. Pod vlivem gonadotropinů a růstových faktorů je úzká spolupráce mezi kumulárními buňkami a oocytem. Tyto signály se podílejí buď na zachování nebo přerušení meiotického zrání. Zatím co cAMP je klíčovou molekulou při zachování meiotického bloku, cGMP může hrát roli při kontrole spontánního nebo vyvolaného zrání oocyty vyvolaného gonadotropiny (Silvestre et al., 2011). Molekulární a strukturální změny ve folikulu vyvolané gonadotropinem LH vyžadují komplexní interakce mezi somatickými buňkami a oocytem. Je dobře známo, že signály pocházející z oocytů hrají zásadní roli v uspořádání, růstu a vývoji folikulů. Naopak přesný podíl místních signálů obou oddílů potřebný k ovulaci je doposud méně objasněn. LH působí na obnovení meiotického zrání u oocytů, na vývoj kumulárních buněk, na prasknutí folikulů, přímo aktivuje granulózní buňky a nepřímo působí na kumulární buňky a oocyty. Je

možné, že cAMP a současné poznatky potvrzují, že i cGMP se šíří prostřednictvím sítě gap junctions ze somatických buněk do oocyty. Nedávná zjištění naznačují, že biochemický mechanismus, který udržuje oocyt v pozastavené meióze je pravděpodobně důsledek regulace oocyty PDE a tudíž nepřímo cAMP. Přesný sled událostí regulujících buněčný cyklus není dosud znám. Je ale všeobecně známo, že pokles cAMP je primární signál. Tento pokles v cAMP je způsoben aktivací PDE v oocytech, ale i uzavřením gap junctions. Regulační mechanismy, které vedou k aktivaci PDE v oocytech se nyní intenzivně zkoumají (Conti, 2010).

### 3.3.3 OMI

OMI (oocyte maturation inhibitor) je polypeptid, produkováný granulózními buňkami (Wassermann, 1998), vyskytující se u mnoha druhů savců. Zesiluje účinek cyklického AMP (Tsafiri and Pomerantz, 1984). Jeho produkce se zvyšuje díky folikostimulačnímu hormonu (FSH) (Van de Wiel, 1983). Účinek OMI je zprostředkován přes okolní kumulární buňky pomocí polopropustných spojů gap junctions, a má inhibiční účinek na dozrávání. Výsledky dokazují, že inhibiční účinek není druhově specifický (Cameron et al., 1983). OMI byl nalezen především ve folikulární tekutině (Eceay and Powers, 1990). Ovšem Wastergaard (1988) dodává, že při začátku ovulace není přítomen ve folikulární tekutině vůbec. Cameron et al. (1983) dále uvádí, že jeho studie dokázala, že OMI je přítomný v lidské folikulární tekutině má reverzibilní inhibiční účinek.

Velký vliv při řízení syntézy a vylučování OMI mohou mít různé hormony. Výsledky ukazují, že OMI, nalezený v antrálních folikulech prasat, vylučovaný granulózními buňkami má nízkou molekulovou hmotnost, která se pohybuje pod hranicí 10 kDa. Časem, jak postupuje vývoj folikulů, granulózní buňky ztrácejí svou schopnost vylučovat OMI. Ještě důležitější je, že byly objeveny hormony, které ovlivňují sekreci OMI. FSH stimuluje sekreci a androgeny jí inhibují. Tyto údaje poskytují důkazy o tom, že na správné hladině gonadotropinů, cyklického AMP a steroidů závisí meióza, která buď pokračuje, nebo oocyt zaniká atrezií. Buněčné interakce těchto hormonů, a to zejména FSH a androgenů kontrolují množství OMI (a případně i další intrafolikulární faktory), které se mohou podílet buď na povolení buněčného zrání nebo na setrvání v klidové fázi (Anderson et al., 1985).

Předovulační nárůst gonadotropinů indukuje ve vyspělých Graafových folikulech řadu změn. Mezi ně patří i obnovení meiotického dělení oocyty, což je proces pozastavený krátce po porodu. Zde má roli folikulární faktor oocyte maturation inhibitor (OMI), který oocyt napomáhá udržovat v klidové fázi před znovuobnovením meiózy. Pro správné fungování

těchto pochodů není důležitý jen OMI, ale i další navzájem spolupracující faktory jako je například výše zmíněný cyklický AMP (Tsafiriri and Pomerantz, 1986).

Nejdůležitější funkcí OMI je tudíž udržení oocyty v diktyoténním stádiu meiotické profáze I, dále je také důležitým faktorem udržujícím životaschopnost buněk. S postupným vývojem folikulu současně klesá koncentrace OMI (Van de Wiel, 1983).

Folikulární tekutina obsahuje nízkomolekulární OMI, který působí na zachování oocyty v klidové fázi meiózy. Přidáním luteinizačního hormonu ke kultivovaným oocytům prasat můžeme zvrátit inhibiční účinek OMI. Při poklesu hladiny OMI ve folikulární tekutině folikul dozrává. FSH a prolaktin stimulují granulózní buňky k produkci OMI. Zvýšená hladina LH může vést ke zrání vajíček ještě před ovulací, díky tomu, že stimuluje syntézu testosteronu buňkami theca a tím inhibuje syntézu OMI granulózními buňkami. Časně zrání oocytů spojené s atrézií folikulů může být způsobeno poklesem OMI kvůli smrti granulózních buněk anebo kvůli zvýšení hladiny folikulárních androgenů (Channing et al., 1982). Fyziologický rozbor ukazuje, že vliv OMI *in-vitro* je reverzibilní, a jeho působení může být překonáno působením luteinizačního hormonu. Působnost OMI vyžaduje přítomnost kumulárních buněk v okolí oocyty, protože bylo zjištěno, že obnažený oocyt zbavený kumulárních buněk, nereaguje na působení OMI (Torbjörn et al., 1979).

### 3.3.4 Vápník

Vápník, je jednou z nejvýznamnějších nitrobuněčných signálních molekul kontrolující velkou škálu buněčných procesů, jako je například svalová kontrakce, synaptický přenos a hraje roli i ve zrání a oplodnění oocyty. Vápník může být navázaný na proteiny a jeho nejčastějším depotem je ednoplazmatické retikulum (Clapham, 2007). U oocytů prasnic je vápník uskladněn hlavně v mitochondriích, vakuolách, na povrchu lipidových granul a v cytoplazmě (Petr et al., 2001). Nyní existuje stále více důkazů nasvědčujících, že změny v intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$  mohou mít klíčovou roli.  $Ca^{2+}$  ovlivňuje přechod mezi G a S fázemi (Santella, 1998). Vápník také upravuje některé z cyklů buněčného dělení jako např. oddělování chromozómů nebo přechod z metafáze do anafáze (Voronina and Wessel, 2003). K aktivaci  $Ca^{2+}$  může vést mnoho vazebných bílkovin hlavní z nich je kalmodulin (Santella, 1998).

Změny v intracelulární koncentraci vápníku představují zásadní signalizační mechanismus, který umožňuje komunikaci mezi buňkami a jejich životním prostředím (Wakai et al., 2011). Machaca (2011) dodává, že změny v koncentraci a rozmístění  $Ca^{2+}$  iontů v cytoplazmě tvoří

všudypřítomné intracelulární signalizační moduly v buněčné fyziologii. S příchodem barviv  $\text{Ca}^{2+}$ , které umožňují vizualizaci  $\text{Ca}^{2+}$ , v kombinaci s výkonnými experimentálními nástroji, jako jsou elektrofyziologické nahrávky, bylo dokázáno že intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  je zapojen do prakticky všech aspektů buněčné fyziologie včetně buněčné poliferace.  $\text{Ca}^{2+}$  signály jsou spojeny s různými fázemibuněčného cyklu a zásah do  $\text{Ca}^{2+}$  signalizačních drah často narušuje průběh buněčného cyklu. I když existuje závislost mezi signály  $\text{Ca}^{2+}$  a mechanismy buněčného cyklu, je obtížné přisoudit přesnou roli  $\text{Ca}^{2+}$  signálům.

Přechodné zvýšení intracelulární koncentrace vápníku je potřebné pro vyvolání zrání oocytů. Ovšem nelze jednoduše říct, že vápník sám o sobě stačí pro vyvolání zrání. Při zrání oocytů vápník nejvýrazněji ovlivňuje vytvoření I. pólocytu a translokaci kortikálních granulí na povrchu buněk. Ovšem mechanismus působení vápníku není dosud plně objasněn. Jedním z klíčových faktorů může být spolupráce vápníku a calmodulin-dependentních kináz, CaMKII (Voronina and Wessel, 2003).

Zvýšení hladiny intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v důsledku buněčného stresu nebo vysoké extracelulární koncentrace, může narušit průběh normálního zrání. Za fyziologických podmínek  $\text{Ca}^{2+}$  přechodně slouží jako druhotný posel v savčích oocytech a stimuluje mitochondriální oxidační metabolismus a produkci ATP. Za patologických stavů, při dlouhodobém zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$ , může  $\text{Ca}^{2+}$  aktivovat destruktivní enzymatické dráhy a zabránit vytváření energie v buňce. Přebytek  $\text{Ca}^{2+}$  řídí otevření mitochondriálních pór, což má za následek uvolňování cytochromu C a aktivaci proteolytických kataláz, které vedou k apoptotické buněčné smrti. Bez funkčního mechanismu na výrobu energie, oocyty po spotřebování energetických zásob odumrou. Cytostolický hořčík  $\text{Mg}^{2+}$  působí jako protipól nitrobuněčného  $\text{Ca}^{2+}$ , a tím reguluje do jisté míry nepříznivé dopady způsobené jeho vysokou koncentrací (Krisher, 2004).

Zvýšená signalizace pomocí púlzů  $\text{Ca}^{2+}$  aktivuje oocyt, což je první fáze vývoje embryí, která se skládá z biochemické a strukturální změny a transformuje oocyt do zygoty (Wakai et al., 2011).

Přechodné zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  se může samovolně aktivovat a regulovat meiotické zrání. Zatímco mnoho studií se zaměřuje na výkyvy  $\text{Ca}^{2+}$  při oplození zralého oocytu, málo studií se zabývá intracelulární úrovní  $\text{Ca}^{2+}$  v nezralém oocytu. V nezralých oocytech myši se přechody  $\text{Ca}^{2+}$  vyskytují každé 1 až 3 minuty po uvolnění vajíčka z folikulu a přetrvávají 1 až 3 hodiny. Přesto zůstává sporné, zda přechody  $\text{Ca}^{2+}$  u nezralých myších oocytů mají opravdu vliv na zárodečný váček. Zdroj  $\text{Ca}^{2+}$  při zrání oocytů je také zajímavý. Některé savčí oocyty, včetně prasečích, mají  $\text{Ca}^{2+}$  volné v intracelulárním prostoru. Zdrojem



je endoplazmatické reticulum a mitochondrie. Receptory uvolňující  $\text{Ca}^{2+}$  do volného prostředí se nacházejí na endoplazmatickém reticulu. Je zajímavé, že tyto receptory jsou aktivní ve fázi zárodečného vajíčku, po dozrání I v metafázi II, možná I v mezifázovém období (Krisher, 2004).

### 3.3.5 PKC

Protein kináza C (PKC) hraje klíčovou regulační roli v mnoha buněčných procesech. Od ovládnutí základních činností buňky až po složité funkce jako je paměť. Nicméně systému signalizace PKC u savců je velice složitý. Vzory PKC signalizace jsou evolučně konzervovány od prvoků až k lidem, což podtrhuje význam této kinázy v buněčné signalizaci (Mellor and Parker, 1998). Členové rodiny PKC (serin/treonin kinázy) jsou důležitou součástí signálních drah a regulátory buněčné proliferace a diferenciaci.

Rodina PKC sdružuje dvanáct jedinečných serin/treonin kináz a můžeme je dle struktury dělit do tří skupin. Konvenční – které na sebe vážou vápník i diacylglyceroly. Nové – které na sebe vápník nevážou a jsou na něm nezávislé. Atypické – které nevážou vápník ani diacylglyceroly, ale jsou homologní s ostatními třídami (Mellor and Parker, 1998).

Nedávné studie prokázaly zapletení PKC v kontrole buněčného cyklu na dvou místech a to v přestupu z G1 do S fáze a v přechodu z G2 do M fáze. Aktivace PKC během progresu G1 moduluje aktivitu specifické cyklin – dependentní kinázy (CDKs) toto je rozhodující bodem v progresi buněčného cyklu a vede k přechodu z G1 do S fáze (Fishmann et al., 1998). Black (2000) toto tvrzení ve své studii potvrzuje, PKC je důležitá zejména při řízení střídání fází buněčného cyklu (z G1 do S fáze a z G2 do M fáze). Jak již bylo řečeno PKC enzymy fungují jako regulátory buněčného cyklu na dvou místech, a to v průběhu výstupu z G1 fáze a v přechodu z G2 do M fáze (Livneh and Fishmann, 1997). Dále se členové rodiny protein kinázy C široce podílejí na regulaci buněčného růstu a buněčného cyklu. Stále více studií dokazuje předchozí tvrzení, že je PKC klíčový regulátor buněčného cyklu včetně kontroly výstupu z G1 a G2 fáze a kontroly kontrolních uzlů (Black, 2000). Na základě výsledků další studie lze předpokládat, že se PKC podílí na regulaci procesů spojených s aktivací oocytů (Sedmikova, 2006).

Úloha PKC v řízení meiotického zrání savčích oocytů není zatím zcela objasněna. Je však známo, že aktivita PKC se během meiotického zrání oocytů mění během přestupu metafáze I. do anafáze I. (Quan et al., 2003).

### 3.3.6 Src kináza

Src je výchozí základní jednotkou v mnoha biochemických pochodech, v nichž se uplatňuje jako přenašeč signálu z extracelulárního prostoru do vnitřku buňky, dále má velký podíl na uspořádání cytoskeletu a na adhezní systém, který podporuje migraci a invazi buněk (Guarino, 2010).

Src je protein skládající se z několika domén (N-terminální doména, jedinečná doména, SH3 doména, SH2 doména, linker doména, katalycká doména a C-terminální ocas (Guarino, 2010).

Rodina SRC kináz je skupina devíti cytoplazmatických proteinů (tyroxin kináz) a jsou nezbytné pro mnoho buněčných funkcí. Některé se zdají být všudypřítomné, zatímco jiné se nacházejí pouze v určitých tkáních. Schopnost členů rodiny SRC iontové dopravy je známá již několik let (Cohen, 2005).

Aktivace SRC je výchozím bodem pro několik biochemických kaskád. SRC podporuje přežití buněk a navíc má podstatný vliv na reorganizaci cytoskeletu a přilnavosti systémů, které podporují buněčné migrace a invaze. Zvýšení aktivity Src se často vyskytuje u mnoha typů rakoviny u lidí. Proto inhibitory Src jsou považovány za slibné léky pro léčbu rakoviny (Guarino, 2010).

### 3.3.7 MAPK

MAP kináza je důležitým proteinem podílejícím se na meiotickém zrání (Verlhac et al., 1993) a vyvolává přechod z G2/M1 (Stanford et al., 2003).

Patří do skupiny serin/threonin kináz, které jsou velmi aktivní při zrání savčích oocytů (Gozoh et al., 1991). MAP kinázu tvoří 5 podskupin. MAPK signální dráhy patří mezi nejrozšířenější mechanismy řízení eukaryotických buněk. MAPK dráhy u savců mohou být aktivovány celou řadou různých podnětů, např. hormony, růstovými faktory, a proto se někdy také označuje jako ERK (extracelulárně regulovaná kináza) (Kyriakis and Avruch, 2001). MAPK patří do rodiny MAP kináz, což jsou serin/threonin kinázy. Tato rodina se rozděluje na několik podrodin. Podrodiny jsou rozdělovány podle svého substrátu, molekulové hmotnosti nebo podle způsobu regulace (Tao et al., 2005). Byly identifikovány 3 podjednotky MAPK a to ERKs (extracelulárně regulovaná kináza), JNKs a P38-MAPKs (P42MAPK, P44ERK – rozdělení podle molekulové hmotnosti). Bylo prokázáno, že ERKs je důležitý pro přežití buněk, zatímco JNKs a P38-MAPKs regulují stres a podílejí se na apoptóze (Wada and Penninger, 2004).

Zrání oocytů řídí koordinované akce dvou kináz, Maturation Promoting faktoru (MPF) a mitogen activated protein kinázy (MAPK). Důležitost role MPF je dobře známa, zatímco úloha MAPK nebyla zatím plně objasněna u velkých domácích savců (u myši je již dobře prozkoumána) (Gordo et al., 2001). MPF reguluje aktivaci MAPK (Josefsberk et al., 2003).

MAP kináza se v nezralých oocytech, zastavených v G2 fázi, vyskytuje v cytoplazmě. Při přesunu do M fáze se MAPK přesouvá do zárodečného váčku. MAPK dále znovuzahajuje meiózu a přenáší signály pro zrání oocytu z cytoplazmy do jádra (Stojkovic et al., 1999). Inoue et al. (1998) k tomuto dodávají, že neaktivní MAPK je přítomen již u nezralých oocytů pozastavených v G2 fázi a tato kináza byla lokalizována jenom v cytoplazmě. V přechodu mezi G2 a M fázi se MAPK přesunulo do zárodečného váčku (GV). Kromě toho jiná analýza ukázala, že jaderná MAPK existovala v aktivní formě. Při výzkumu bylo zjišťováno zda MAPK může vyvolat GVBD (rozpad zárodečného váčku) a tak bylo mikroinjekováno aktivní MAPK do nezralých oocytů prasat. Aktivní MAPK byl rychle inaktivován a nezrychlil GVBD. V kontrastu s tímto, když byla MAPK injektováno ve fázi GV byl vývoj výrazně urychlen. Tyto výsledky ukazují, že v prasečích oocytech se neaktivní MAPK lokalizuje v cytosolu nezralých oocytů, část aktivované MAPK putuje do GV těsně před GVBD i což naznačuje, že MAPK zprostředkovává signál vyvolávající zrání z cytoplazmy do jádra a podílí se na opětovném zahájení meiózy.

Dále byly zkoumány zněny v činnost MAPK během meiotického zrání oocytů u kozy. MAPK aktivita vzrostla po GVBD a přetrvávala během přechodu z MI do MII. Výsledky výzkumu naznačují, že by mohl být MAPK zapojena do regulace organizace mikrotubulů. U kozích oocytů není MAPK do znovuzahájení meiózy, ale spíše do akcí těsně souvisejících s GVBD (Dedieu et al., 1996).

Aktivace MAPK (mitogen activated protein kinázy) kaskády je spojená s obnovením meiózy v oocytu u mnoha různých druhů. Po ředu let se vědci domnívali, že signál pro vyvolání meiotického obnovení je přenášen MAPK. Dnešní výzkumy ukazují, že aktivace MAPK není nutná pro znovuzahájení meiózy u zvířat. Místo toho činnost MAPK hraje důležitou roli v urychlení aktivace MPF v oocytu, který je důležitý pro obnovení meiotického zrání. MAPK je také důležitý pro potlačení intervize (replikace DNA) mezi dvěma meiózami (Voronina and Wessel, 2003).

### 3.3.8 Kalcineurin

Kalcineurin byl poprvé objeven v roce 1976 pány Wangem a Desaiem. Nezávisle na tom v roce 1976 Watterson a Vanaman také získali vysoce čisté frakce kalcineurinu z hovězího mozku.

Jedná se o heterodimerický protein, patřící do rodiny serin/threonin kináz, která se aktivuje vápenatými ionty a kalmodulinem. Skládající se z katalycké (kalcineurin A) a regulační podjednotky (kaldineurin B) (Rusnak adn Merz, 2000). U savců se kalcineurin A vyskytuje ve 3 různých isoformách (CnA $\alpha$ , CnA $\beta$ , CnA $\gamma$ ) (Kincaid, 1993). Kalcineurin B byl objeven pouze ve dvou isoformách a to isoformě B1 a B2 (Chan et al., 2005). Jako serin threonin protein fosfáza, se kalcineurin účastní řady buněčných procesů (Rusnak adn Merz, 2000). Bandyopadhyay et al. (2002) dodává, že se Ca<sup>2+</sup> váže s vysokou afinitou na vazebná místa lokalizovaná na podjednotce kalcineurinu B.

Kalcineurin je široce zastoupen v tkáních savců, s nejvyšší úrovní nalezenou v mozku. Navíc byly podjednotky kalcineurinu A a B pozorovány v tukové tkáni, nadledvinách, kostech, srdci, zadním mozku, míše, ledvinách, játrech, B a T lymfocytech, v plicích, slinivce břišní, placentě, krevních destičkách, sítnici, kosterních svalech, hladkém svalstvu, slezině, varlatech, spermích, brzlíku a ve štítné žláze (Rusnak adn Merz, 2000). Kalcineurin hraje roli v programované buněčné smrti T a B lymfocytů. V poslední době bylo také prokázáno, že hraje roli v apoptóze nervových buněk (Rusnak adn Merz, 2000). Morya et al. (2000) dodává, že ve své studii prokázal jeho přítomnost ve varleti myši v jádrech prodlužujících se spermatid.

Nishiyama et al. (2008) prokázal, že pokud je kalcineurin inhibovaný v neporušených oocytech dápatky, je zabráněno ukončení MII fáze. Dále bylo prokázáno, že rozhodující pro zahájení embryonálního vývoje obratlovců je aktivace a následná inaktivace kalcineurinu v oplozených oocytech.

Kalcineurin je silně inhibován imunopresivními léky. V mnoha studiích používají tyto imunopresivní léky a/nebo moderní genetické metody pro narušení produkce kalcineurinu u mnoha modelových organismů, jako jsou kvasinky, vláknité houby, rostliny, obratlovci včetně savců, aby mohli prozkoumat jeho biologické funkce. Jeho možné užití je jako imunopresivum v humánní medicíně (Bandyopadhyay et al., 2002). Množství přírodních produktů, které byly izolovány jsou určitými inhibitory kalcineurinu a dalších serin/threonin protein fosfáz. Nejvíce účinným inhibitorem jsou imunopresivní léky např. FK 506 nebo cyklosporin A, které inhibuje kalcineurin (Rusnak and Merz, 2000).

### 3.3.9 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý tvoří dvouatomová molekula. Tato molekula je schopna difundovat přes buněčné membrány a regulovat funkci buněk (Dixit and Parvizi, 2001). Amale et al. (2011) dodává, že se jedná o důležitou signální molekulu.

NO je důležitý biologický messenger, vykazuje široké spektrum účinků během fyziologických a patologických procesů (Tao et al., 2005). Reaguje na širokou škálu biomolekul, jako je DNA, transkripční faktory, enzymy, cytokiny a membránové receptory a může zprostředkovat celou řadu biologických funkcí. NO se se kromě jiného podílí také na regulaci důležitých funkcí organismu např. specifická a nespecifická imunitní obrana, sekrece hormonů a další (Moncada et al., 1991), regulace různých reprodukčních procesů u samic, jako je ovulace, implantace a relaxace myometria (Andronowska et Chrusciel, 2007), dále hraje důležitou roli v procesu dilatace krevních cév. NO vysílají endotelové buňky jako odpověď na stimulace nervových zakončení (Alberts et al., 1998). Další důležitou funkcí NO je ovlivňování sexuálního chování (Sica et al., 2009) a postnatální vývoj mléčné žlázy (hlavně v postpubertálním období) (Islam et al., 2009). Dále je NO nezbytný pro kvalitní výživu oocytů po ovulaci (Goud et al., 2008). Zároveň působí jako důležitý faktor pro folikulogenezi, atrézii, ovulaci, luteinizaci a zrání oocytů (Hattori and Tabata, 2006).

Oxid dusnatý je syntetizován třemi různými NO syntázami. Všechny tři izoformy NOS jsou homodimery, které jsou složeny ze dvou monomerů. Monomery mohou být funkčně i strukturně roděleny (Liu and Gross, 1996). Mezi ně patří I. nervová (nNOS), II. iducibilní (iNOS), III. endoteliální (eNOS) (Förstermann et al., 1991). nNOS se hlavně vyskytuje v nervové tkáni mozku a v nervovém systému (Bredt and Snyder, 1990), také byl lokalizován v cytoplazmě ovocytu a v zárodečných váčcích (GV) (Chmelikova et al., 2010). iNOS se vyskytuje v celé řadě buněk např. hepatocytů, buněk hladké svaloviny, fibroblastů, buněk Langerhansových ostrůvků, epitelálních buněk, neutrofilních granulocytů, chondrocytů a buněk respiračního epitelu (Bredt and Snyder, 1990) a je rozptýlen v cytoplazmě vajíčka (Chmelikova et al., 2010), eNOS se vyskytuje v cévním endotelu a v celé řadě tkání včetně neuronů hipokampu, krevních destiček, nadledvin, ledvin, plic, pankreatických ostrůvků, placenty, dělohy (Jablonka-Shariff et al., 1997) byl také zjištěn v granulózích a thekálních buňkách (Tessaro et al., 2011), a je také přítomen v bodech v cytoplazmě oocytu, tak v zárodečných váčcích a je také spojen s meiotickými vřetenky (Chmelikova et al., 2010). eNOS a iNOS byly nalezené ve všech stádiích folikulu (primární, sekundární, terciární), hlavně v cytoplazmě nezralých oocytů (Pires et al., 2009).

Celá řada faktorů ovlivňuje aktivitu NOS izoform, nejdůležitější úlohu zřejmě sehrávají protein kinázy (Alderton et al., 2001). Buňky jsou schopny produkovat i více než jednu izoformu NOS (Suschek et al., 1993). NOS mají vliv na příslušné oocyty hlavně v první metafázi meiózy (Tichovska et al., 2011). Pokud bude vyblokován gen pro některou z izoform NOS dopad na zrání bude velký, zpomalí se rozpad zárodečného váčku a řada oocytů nedosáhne druhé meiotické metafáze, ale bude zablokována ve stádiu metafáze I, mnoho z nich také bude vykazovat atypické morfologické změny (Jablonka-Shariff, 1998).

Chmelikova et al. (2010) prováděla výzkum zabývající se isoformami NOS. Cílem této práce bylo zjistit změny v expresi izoform NOS a mRNA a změny v intracelulární lokalizaci jednotlivých izoform NOS v období růstu oocytů u prasat, a také určit zda tyto změny souvisí s procesem získání meiotické kompetence. V prasečích oocytech a jejich okolních buňkách byly obsaženy všechny NOS bílkoviny. Jejich množství a lokalizace se změnila získáním meiotické kompetence. nNOS byl lokalizován hlavně v kůře meioticky nekompetentních oocytů, zatímco meioticky kompetentní oocyt má nNOS obsažený v jádru. iNOS protein byl rozdělen do cytoplasmy a do jádra všech oocytů a u meioticky nekompetentních oocytů byl obsažen také v jadérku. eNOS protein byl obsažen v cytoplasmě ve formě jemných granulí se silným fluorescenčním signálem. V meioticky nekompetentním oocytu byl protein soustředěn v jaderné oblasti a v oocytu s částečně a plně vyvinutou meiotickou kompetencí byl protein obsažen také na periférii.

Všechny tyto nálezy naznačují, že izoformy NOS můžou významně ovlivnit získání meiotické kompetence v oocytech prasat (Chmelikova et al., 2009). Jsou známy i inhibitory pro iNOs a eNOS jedná se o N omega-nitro-L-arginin (L-NNA) a N omega-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME) (Tao et al., 2005).

Schwarz et al. (2010) dodává, že i samotný NO je velice důležitý, a je zřejmě zapojen do postupu oocytu do MII fáze v meióze a jeho nedostatek v průběhu zrání zvyšuje možnost apoptózy u embryí produkovaných in-vitro. Inhibice syntézy oxidu dusnatého během zrání ovlivňuje kvalitu embrya. Nízká koncentrace NO bude stimulovat a zlepšovat pochody probíhající během reprodukce, ale nedostatek nebo přebytek NO má negativní důsledky. Jedním z nedostatků v této oblasti je v současné době nedostatek podrobností o molekulárním mechanismu. To je částečně způsobeno nedostatkem technologií pro efektivní detekci NO (Thales and Epel, 2003). Tuto teorii podporuje i práce Viginio et al. (2008), který zdůrazňuje, že správné mikroprostředí v ovariálním folikulu je životně důležité pro normální vývoj oocytů, folikulogenezi a včasnou ovulaci. A vysoká hladina NO v lidském folikulu je škodlivá. Dubey et al. (2011) dodává, že při vyšších koncentracích NO byli

pozorovány cytotoxické účinky. Naopak nízké koncentrace vykazovaly účinky stimulační. Ke stejným výsledkům dospěla ve své práci i Tichovska et al. (2011), která souhlasí s předchozím tvrzením a uvádí, že přidáním velkého množství NO do prostředí při kultivaci *in-vitro* se narušuje životaschopnost oocytů. Při velmi nízké koncentraci je účinek opačný. Dále její experimenty potvrdili spojení NO s obdobím růstu ovocytu a se získáním meiotické kompetence.

Přesný mechanismus působení NO/NOS na meiotické zrání oocytů není doposud plně objasněn (Törnell et al., 1991).

### 3.3.10 Sirovodík

Sirovodík ( $H_2S$ ) je produkován endogenně z L-cysteinu v savčích tkáních a může fungovat jako neuromodulátor v mozku, stejně jako regulátor hladkého svalstva a má ještě celou řadu dalších fyziologických rolí.

Dva hlavní enzymy odpovědné za výrobu  $H_2S$  jsou cystathionin  $\beta$ -syntáza (CBS) a cystathionin  $\gamma$ -lyáza (CSE) (Kimura, 2000). L-cystein je společným substrátem pro oba enzymy (Shibuya et al., 2009). Tyto enzymy byly detekovány v dělohách u březých i jalových samic, v plodových obalech v dělohách potkanů (Carson and Konje, 2010). Cystathionin  $\beta$ -syntáza (CBS) je přítomná v poměrně vysoké úrovni v mozku, hlavně v hipokampu (Kimura, 2000). Dalším enzymem, který se podílí na produkci sirovodíku je 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (Shibuya et al., 2009).

Sirovodík  $H_2S$  je považován za člena skupiny signálních molekul zvaných gasotransmitters stejně jako oxid dusnatý a uhelnatý. Bylo prokázáno, že vzniká v endokrinních a reprodukčních orgánech a vyvolává různé akce.  $H_2S$  moduluje sekreci inzulínu v ostrůvkách pankreatu. Tukové tkáně mají také schopnost produkovat  $H_2S$ , který upravuje místní citlivost na inzulín a cévní reakce.  $H_2S$  působí na osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny a je zapojen do stresových reakcí. Účinky na reprodukční funkce savců také nejsou zanedbatelné, a je možnost využití  $H_2S$  při léčení poruch reprodukce. Pochopení regulačních mechanismů syntézy  $H_2S$  může pomoci vyvinout nové léčebné postupy (Xiao-Yan et al., 2011).

Dříve byl sirovodík považován za toxický pro reprodukční cesty obou pohlaví. Nicméně nedávno byl objeven v reprodukčních systémech obou pohlaví u různých savců (včetně lidí). Nejdůležitější funkcí  $H_2S$  v samčí pohlavní soustavě je usnadnění erektivních funkcí. Zapojení  $H_2S$  drah do procesu ztopoření penisu bylo nedávno zkoumání pomocí hladké svaloviny získané z transsexuálních chirurgických zákroků. Zjištění z tohoto výzkumu

naznačují, že H<sub>2</sub>S může být nový léčebný prostředek používaný při erektilních dysfunkcích. Dále bylo dokázáno, že H<sub>2</sub>S může hrát roli v regulaci funkcí varlat (Xiao-Yan et al., 2011).

H<sub>2</sub>S hraje roli nepřímo také v reprodukci samic. Myši knokautované na CBS jsou plodné, ale snižují plodnost samčího potomstva, to ukazuje, že CBS je nezbytný pro ženské reprodukční funkce. CBS je distribuován všude po vaječniku, nejsilnějšího projevu dosahuje u folikulárních buněk ve všech fázích vývoje. CBS knokautované samice myši mají méně vytvořených folikulů, zkrácený a nepravidelný cyklus, také dramaticky menší procento přeživších plodů. CBS byla detekována v děloze, plodových obalech a placentě (Xiao-Yan et al., 2011). Role CBS během zrání a růstu oocytů není zatím zcela prozkoumána. Výsledky nedávné studie prokázaly, že CBS se účastní procesu zrání oocytů. CBS není detekován v oocytech, ale je obsažen ve folikulárních buňkách v různých fázích vývoje. Předpokládáme, že CBS funguje jako prostředník mezi oocytem a folikulárními buňkami. V jedné studii byla výrazně potlačena úroveň CBS v granulózních buňkách oocytu in-vitro. Tímto se výrazně snížila rychlost zrání oocytů, což může být do budoucna zcela zásadní zjištění (Liang et al., 2007).

Nedostatek kyslíku výrazně zvýší produkci H<sub>2</sub>S v placentě. H<sub>2</sub>S se tedy podílí na placentární hypoxii. Nedávné studie také prokázaly, že H<sub>2</sub>S funguje jako relaxant hladkého svalstva samicích reprodukčních orgánů (Xiao-Yan et al., 2011). Carson and Konje (2010) souhlasí s předchozím tvrzením a dodává, že H<sub>2</sub>S by mohl hrát roli při udržování děložní nečinnosti během těhotenství.



## **4 Závěr**

Hlavní cílem této bakalářské práce bylo podat stručný, ucelený a přehledný souhrn základních informací, týkajících se samičí pohlavní soustavy, oogeneze a vybraných faktorů regulujících růstovou periodu oocyty. Z mnoha faktorů, které růstovou periodu oocyty ovlivňují, byly vybrány pouze ty nejdůležitější a nejlépe prozkoumané. Snažila jsem se o ucelenou a přehlednou strukturu jednotlivých kapitol tak, aby byly srozumitelné i studentům, kteří s touto problematikou nejsou podrobně seznámeni.

## 5 Použitá literatura

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630 s.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function, and inhibition. *Biochemical Journal*. 357. 593-615.
- Amale, M. H., Shahne, A. 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). 284-291.
- Anderson, L. D., Stone, S. L., Channing, C. P. 1985. Influence of hormones on the inhibitory activity of oocyte maturation present in conditioned media of porcine granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development*. 12 (2). 119-130.
- Andronowska, M., Chrusciel, M. 2007. Expression and cellular distribution of NADPS-diaphorase and nitric oxide synthases in the porcine uterus during early pregnancy. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 45 (4). 375-380.
- Bandyopadhyay, J., Lee, J., Yu, J. R., Jee, C., Cho, J. H., Jung, S., Lee, M. H., Zannoni, S., Singson, A., Kim, D. H., Koo, H. S., Ahnn, J. 2002. Calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, is involved in movement, fertility, egg laying, and growth in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*. 13 (9). 3281-3293.
- Black, J. D. 2000. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Frontiers of Bioscience*. 1 (5). 406-423.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 (2). 682-685.
- Cameron, I. L., Lum, J. B., Nations, C., Asch, R. H., Silverman, A. Y. 1983. Assay for characterization of human follicular oocyte maturation inhibitor using *Xenopus* oocytes. *Biology of reproduction*. 28 (4). 817-822.
- Carson, R. J., Konje, J. C. 2010. Role of hydrogen sulfide in female reproductive tract. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 5 (2). 203-213.
- Clapham, D. L. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131 (6). 1047-1058.

- Cohen, D. M. 2005. SRC family kinases in cell volume regulation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 288 (3). 483-493.
- Conti, M. 2010. Signaling networks in somatic cells and oocytes activated during ovulation. *Annales Endocrinologie*. 71 (3). 189-190.
- Čihák, R. 2001. *Anatomie 1 – druhé, upravené a doplněné vydání*. Grada Publishing, a. s. Praha. 497 s.
- Čihák, R. 2002. *Anatomie 2 – druhé, upravené a doplněné vydání*. Grada Publishing, a. s. Praha. 470 s.
- Čihák, R. 2004. *Anatomie 3 – druhé, upravené a doplněné vydání*. Grada Publishing, a. s. Praha. 692 s.
- Dedieu, T., Gall, L., Rozet, N., Sevellec, C., Ruffini, S. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Molecular Reproduction and Development*. 45 (3). 351-358.
- Dixit, V. D., Parvizi, N., 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*. 65 (1-2). 1-16.
- Dubey, P.K., Tripathy, V., Singh, R. P., Sharma, G. T. 2011. Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Journal of Veterinary Science*. 12 (3). 257-265.
- Dunphy, W., Kumagai, A. 1991. The cdc25 protein contains intrinsic phosphatase activity. *Cell*. 54. 423-431.
- Eceay, T. W., Powers, D. R. 1990. Differential effects of testosterone and dibutyryl cycliv AMP on the meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 253 (1). 88-98.
- Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovaria follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122 (6). 829-838
- Fishmann, D. D., Segal, S., Livneh, E. 1998. The role of protein kinase C in G1 and G2/M phases of the cell cycle (review). *International Journal of Oncology*. 12 (1). 181-186.
- Fulka, J. 1983. Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific vision. *Experimental Cell Research*. 146. 212-218.

- Förstermann, U., Schmidt, H., Pollock, J. S., Slang, H., Mitchell, J. A., Warmer, T. D., Nakane, M., Murad, F. 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochemical Pharmacology*. 42 (10). 1849-1857.
- Gall, L., De Smedt, V., Crozet, N., Ruffini, N., Sévellec, C. 1996. Meiotically incompetent and competent goat oocytes: timing of nuclear events and protein phosphorylation. *Theriogenology*. 46 (5). 825-835.
- Gálová, E., Ševčovičová, A., Miklovičová, M., Švec, M. 2004. Vybrané texty a príklady k cvičenkám z genetiky. Univerzita Komenského Bratislava. 106 s.
- Gordo, A. C., Chang, L. H., Smith, S., Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59 (1). 106-114.
- Goud, P. T., Goud, A. P., Diamond, M. P., Gonik, B., Abu- Shoud, H. M. 2008. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. *Free Radical Biology and Medicine*. 45 (4). 453-459.
- Gozoh, Y., Nishida, E., Matsuda, S., Shiina, N., Kosako, H., Shiokawa, K., Akiyama, T., Ohta, K., Sakai, H. 1991. In vitro effects on microtubule dynamics of purified xenopus m-phase-activated MAP kinase. *Nature*. 349 (6306). 251-254.
- Guarino, M. 2010. Src signaling in cancer invasion. *J. Cell. Physiol*. 223(1). 14 – 26.
- Hattori, M., Tabata, S. 2006. Nitric oxide and ovarian function. *Journal of Animal Science*. 77 (3). 275 -284.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Grepe, T. 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34 (5). 447-454.
- Chan, B., Greenen, G., McKeon, F., Ellenberger, T. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. 102 (37). 13075-13080.
- Channing, C. P., Pomerantz, S. H., Bae, I. H., Evans, V. W., Atlas, S. J. 1982. Actions of hormones and other factors upon oocyte maturation. *Advances in Experimental Medicine in Biology*. 147. 189-210.

- Chmelikova, E., Jeseta, M., Sedmikova, M., Petr, J., Tumova, L., Kott, T., Lipova, P., Jilek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18 (3). 235-244.
- Chmelikova, E., Sedmikova, M., Petr, J., Kott, T., Lanska, V., Tumova, L., Tachovska, H., Jeseta, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (4). 137-149.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58 (1). 130-136.
- Islam, M. S., Matsumoto, M., Tsuchoda, K., Oka, T., Janouchu. H., Suzuki, S. 2009. Immunohistochemical localization of Nitric Oxide Synthase (NOS) in mouse mammary gland during reproductive cycle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 71 (7). 945-949.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460-468.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knockout mouse oocytes. *Endocrinology*. 139 (6). 2954.
- Johnson, J., Canning, J., Keneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428. 145-150.
- Josefsberk, L. Y., Galliani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. Maturation-Promoting Factor Governs Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Interphase Suppression During Meiosis of Rat Oocytes. *Biology of Reproduction*. 68 (4). 1282-1290.
- Kimura, H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 267 (1). 129-133.
- Kincaid, R. 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man - a study in structural conservatism and biological diversity. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. 27. 1-23.
- Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 82 E. E14-E23.

- Kyriakis, J. M., Avruch, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiology Refectory*. 81 (2). 807-812.
- Liang, R., Yu, W. D., Du, J. B., Yang, L. J., Yang, J. J., Xu, J., Shang, M., Guo, J. Z. 2007. Cystathionine beta synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive toxicology*. 24 (1). 89-96.
- Liu, Q., Gross, S. S. 1996. Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods in Enzymology*. 268. 311-324.
- Livneh, E., Fishmann, D. D. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle kontrol. *Biochemical Journal*. 248 (1). 1-9.
- Lowther, K. M., Nikolajev, V. O., Mehlmann, L. M. 2011. Endocytosis in the mouse oocyte and its contribution to cAMP signaling during meiotic arrest. *Reproduction*. 141 (6). 737-747.
- Machaca, K. 2011. Ca(2+) signaling, genes and the cell cycle. *Cell calcium*. 49 (5). 323-330.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M. J., Paramio, M. T. 1994. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 41 (4). 969-980.
- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresán, J., Masanyi, L., Vernerová, E. 2003. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Praha. 303s.
- McKim, K. S., Jang, J. K., Theurkauf, W. E., Hawley, R. S. 1993. Mechanical basis of meiotic metaphase arrest. *Nature*. 362. 364-366.
- Mellor, H., Parker, J. P. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal*. 332. 281-292.
- Moncada, S., Plamer. P. M. J., Higgs, E. A. 1991 Nitric oxide-physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 43 (2). 109-142.
- Morya, M., Katagiri, C., Ikebe, M., Yagi, K. 2000. Immunohistochemical detection of calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase II in the mouse testis. *Zygote*. 8 (4). 303-328.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72 (2). 323-328.
- Motlík, J., Kubelka, M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27. 366-375.

- Murray, A. W., Kirschner, M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle . *Nature*. 339. 275-280.
- Nečas, O. 1989. *Přehled biologie*. Avicentrum. Praha. 624 s.
- Nedvídek, J., Romonovský, A. 1993. *Obecná zoologie – Biologie buněk a tkání*. Karolinum. Praha. 231s.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2008. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449 (7160). 341-345.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H. C., Ke, H. M., Nikolajev, 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). 1869-1878.
- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Zedníková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58 (2). 196–204.
- Pires, P. R. L., Santos, S. V., Adona, P. R., Natori, M. M., Schwarz, K. R. L., de Bem, T. H. C., Leal, C. L. V. 2009. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Animal Reproduction Science*. 116 (3-4). 233-243.
- Procházka, R., Motlík, J., Fulka, J., 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cellular Differ Development*. 27. 175-181.
- Quan H. M., Fan, H. Y., Meng, X. Q., Huo, L. J., Chen, D. Y., Yang, P. M., Sun, Q. Y. 2003. Effect of PKC activation on the meiotic maturation, fertilization and early embryonic development of mouse oocytes. *Zygote*. 11 (4). 329 – 337.
- Reece, W. O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada Publishing. Praha. 456 s.
- Richard, F. J. 2007. Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*. 85 (1). E4-E6.
- Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Medvídek, J., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Sefert, J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V., 1988. *Obecná biologie*. SPN Praha . 695 s.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiological Reviews*. 80 (4). 1483 -1521.

- Santella, L. 1998. The role of calcium in the cell cycle : Fact and hypotheses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 244 (2). 317-324.
- Sedmikova, M., Rajmon, R., Petr, J., Svestkova, D., Chmelikova, E., Bantirgu, A., Rozinek, J., Jilek, F. 2006. Effect of protein kinase C inhibitors on porcine oocyte activation. *Journal of Experimental Zoology*. 305 (4). 376-382.
- Senbon, S., Hirao, Y., Miyano, T. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from *in vitro* culture. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (4). 259 – 269.
- Senthilkumaran, B. 2011. Recent advances in meiotic maturation and ovulation: comparing mammals and pisces. *Frontiers of Bioscience*. 16. 1898-1914.
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 2009. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants and Redox Signaling*. 11. 703-714.
- Schwarz, K. R. L., Pires, P. R. L., de Bem, T. H. C., Adona, P. R., Leal, C. L. V. 2010. Consequences of Nitric Oxide Synthase Inhibition During Bovine Oocyte Maturation on Meiosis and Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (1). 75-80.
- Sica, M., Martini, M., Viglietti-Panzica, G. 2009. Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. *BMC Neuroscience*. 15 (10). 78.
- Silvestre, F., Boni, R., Fissore, R, A., Tosti, E. 2011. Ca<sup>2+</sup> Signaling During Maturation of Cumulus-Oocyte Complex in Mammals. *Molecular Reproduction and Development*. 78 (10-11). 744-756.
- Silvestre, F., Gallo, A., Cuomo, A., Covino, T., Tosti, E. 2011. Role of cyclic AMP in the maturation of *Ciona intestinalis* oocytes. *Zygote*. 19 (4). 365-371.
- Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia. Praha. 480 s.
- Sova, Z. 1990. Fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Most. 469 s.
- Stanford, J. S., Liebermann, S. L., Wong, V. L., Ruderman, J. V. 2003. Regulation of the G2/M transition in oocytes of *xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*. 260 (2). 438-448.



- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle, S., Zakchartchenko, V., Algerio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle kontrol and oocyte mturation: Review of Literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 335–342.
- Suschek, C., Rothe, H., Fehsel, K., Enczmann, J., Kolb, B. V. 1993. Induction of macrophage – like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endoteheial cells. IL - 1 $\beta$  mediated induction regulated by tumour necrosis factor  $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . *J. Journal of Immunology*. 151. 3283-3291.
- Tao, Y., Xie, H. R., Hong, H. Y., Chen, X. F., Jang, J., Xia, G. L. 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote*. 13 (1). 1-9.
- Tao, Y., Zhang, H., Hong, H., Xia, G. 2005. Regulation between nitric oxide and MAPK signal transduction in mammals. *Progress in Natural Science*. 15 (1). 1-9.
- Tessaro, I., Luciano, A. M., Francoisi, F., Lodde, V., Corbani, D., Modina, S. C. 2011. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. *Journal of Animal Science*. 89 (9). 2389-2396.
- Thales, C. D., Epel, D. 2003. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: A little dab'll do ya. *Current Pharmaceutical Design*. 9 (5). 399-409.
- Tichovska, H., Petr, J., Chmeliko, E., Sedmikova, M., Tumova, L., Krejcova, M., Dorfleova, A., Rajmon, R. 2011. Nitric oxide and meiotic kompetence of porcine oocytes. *Animal*. 5 (9). 1398-1405.
- Torbjörn, H., Cornelia, P., Seymour, H., Pomerantz, H., Schwarz-Kripner, A. 1979. Intrafollicular control of oocyte maturation in the PIG. *In Vitro*. 15 (1). 32-39.
- Törnell, J., Billing, H., Hillesjo, T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human Reproduction*. 6 (3). 411 – 422.
- Tsafiriri, H., Pomerantz, S. H. 1984. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. *Symphosia of the Society Experimental Biology*. 38. 25-43.
- Tsafiriri, H., Pomerantz, S. H. 1986. Oocate maturation inhibitor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 15 (1). 157-170.

- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hesieh, M., Menniti, F. S., Congi, M. 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595-604.
- Van de Wiel, D. F., Bar – Ami, S., Tsafiriri a., De Jong, F. H. 1983. Oocytes maturation inhibitor, inhibic and steroid concentrations in porcine follicular fluid at variol stages of the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 68. 247-252.
- Vanderhyden, B. C. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. d2006-2022.
- Verlhac, M. H., Depennart, H., Maro, B., Coby. M., Clarke, H. J. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing center dutiny meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. 158 (2). 330–340.
- Vignini, A., Turri, A., Giannubilo, S. R., Pescosolido, D., Scognamiglio, P., Zanconi, S., Silvi, C., Mazzanti, L., Taranquilli, A. L. 2008. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: the relationship to embryo grading. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 277 (3). 229-232.
- Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmnetal Biology*. 58. 53-110.
- Wada, T., Penninger, J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene Science*. 23 (16). 2838-49.
- Wakai, T., Vanderhyden, V., Fissore, R. A. 2011. Ca(2+) Signaling During Mammalian Fertilization: Requirements, Players, and Adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(4). A006767.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil, E., Neil, J. *The physsiology of reproduction*. New York: Raven Press. 69-102.
- Wastergaard, L. G. 1988. Intrafollicular factors regulating human ovaria follicular development and ovocyte meiosis. *Danish Medical Bulletin*. 35 (3). 270 – 281.
- Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*. 143 (1). 162-72.

- Wu, B., Ignatz, G., Curie, W. B., Yang, X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 56 (1). 253-259.
- Xiao-Yan, Zhu., Hang, Gu., Xin, Ni. 2011. Hydrogen Sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75-82.