

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



**Zona pellucida – její funkce a struktura
u různých živočišných druhů**

Bakalářská práce

Anna Ševčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Studijní forma: prezenční

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana doc. Ing. Jiřího Bezdíčka, Ph.D. a že jsem čerpala pouze z pramenů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne 27. 4. 2023

.....

Anna Ševčíková

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení: Anna Ševčíková

Název práce: Zona pellucida – její funkce a struktura u různých živočišných druhů

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra zoologie PřF UP

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Rok obhajoby: 2023

Počet stran: 37

Jazyk: český

Abstrakt:

V této bakalářské práci se formou rešerše zabývám vrstvou zona pellucida, její funkcí a strukturou u různých živočišných druhů. Popsala jsem základní vlastnosti jako jsou její vznik, zánik, složení a struktura. Dále také vlastnosti, které plní. Její vlastnosti jsem popsala u různých skupin živočichů, včetně jejich specifických funkcí. Další část práce je věnována procesu fertilizace a v návaznosti na to i metodě asistované reprodukce zvané IVF a specifickým vlastnostem a technikám souvisejícím s touto metodou.

Klíčová slova: zona pellucida, ZP, savci, oplození, IVF, vajíčko, spermie

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

First name and surname: Anna Ševčíková

Title: Zona pellucida – its function and structure in various animal species

Type of thesis: bachelor

Workplace: Department of Zoology PřF UP

Supervisor: doc. Ing. Jiří Bezdíček, PhD.

Year of defense: 2023

Number of pages: 37

Language: czech

Abstract:

My bachelor thesis, in the form of research, is focused on zona pellucida layer, its function and structure in various animal species. I described the basic properties such as its origin, disappearance, composition and structure. Furthermore, the properties that fulfill. I described its properties in different groups of animals, including their specific functions. Part of my work is focused on the process of fertilization and, following that, I added a part about the method of assisted reproduction called IVF and the specific characteristics and techniques related to this method.

Keywords: zona pellucida, ZP, mammals, fertilization, IVF, oocyte, sperm

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Jiřímu Bezdíčkovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, poskytnutí odborné literatury. Za cenné rady a odbornou konzultaci.

Dále bych ráda poděkovala paní Ing. Andree Nesvadbové, vedoucí embryologické a andrologické laboratoře (IVF clinic) v Olomouci, že mi umožnila návštěvu kliniky, poskytla mi cenné informace a fotografie z mikroskopu.

Obsah

Seznam zkratek.....	7
Cíle práce.....	8
Úvod	9
1. Zona pellucida, její vznik, struktura a funkce	10
1.1 Vznik ZP	10
1.2 Zánik ZP.....	11
1.3 Struktura a funkce ZP	12
1.4 Význam ZP	15
2. Zona pellucida u různých živočišných druhů.....	17
2.1 Paryby (<i>Chondrichthyes</i>).....	18
2.2 Ryby (<i>Osteichthyes</i>).....	18
2.3 Obojživelníci (<i>Amphibia</i>)	19
2.4 Plazi (<i>Reptilia</i>).....	20
2.5 Ptáci (<i>Aves</i>)	21
2.6 Savci (<i>Mammalia</i>).....	22
3. Fertilizace	24
3.1 <i>In vitro</i> fertilization (IVF).....	25
3.2 Imunologie – infertilita žen.....	27
3.3 Hardening.....	28
3.4 Asistovaný hatching.....	29
Závěr	30
Literatura	31

Seznam zkratek

AMK	aminokyseliny
AH	asistovaný hatching
EFS	empty follicle syndrome (syndrom prázdného folikulu)
FcRL3	Fc receptor-like 3
FSH	folikulostimulační hormon
HG	hatching gland
HGCs	hatching gland cells
ICSI	intra-cytoplazmatická injekce spermie
IMSI	intracytoplasmic morphologically selected sperm injection
IVF	<i>in vitro</i> fertilization
IVM	<i>in vitro</i> maturace
POF	premature ovarian failure (syndrom předčasného ovariálního selhávání)
TZP	transzonal projection
VM/VE	vitelinní membrána
ZP	zona pellucida

Cíle práce

V této práci se zabývám strukturou a významem vrstvy zona pellucida, jako důležité součásti oocytů savců. Cílem této bakalářské práce je zpracovat rešerši shrnující současné poznatky o stavbě vrstvy zona pellucida a rozdílech mezi jednotlivými živočišnými druhy. Součástí řešení tohoto tématu je zároveň shrnutí poznatků o dalších vrstvách (corona radiata, kumulární buňky, oolema), které jsou společně se zonou důležitou součástí celého procesu oplodnění.

Úvod

Oocyty obratlovců, především savců jsou typické tím, že je obklopuje relativně tlustá extracelulární vrstva. Tato vrstva se nazývá zona pellucida a je nezbytná pro vývoj a ochranu oocytů. Má velký význam při procesu oplození, při průchodu přes vejcovody, vývoji embrya a jeho implantaci do dělohy. Od počátku minulého století byla intenzivně zkoumána, čímž bylo odhaleno mnoho zajímavých informací, které se dodnes intenzivně zkoumají v souvislosti s procesem oplození, umělého oplození apod. (Moros-Nicolás a kol., 2021; Bokhove a Jovine, 2018; Familiari a kol., 2006).

Dnes je relativně dobře známá její struktura a komponenty ze kterých se skládá. Stále se ale objevují nové vlastnosti, které tato vrstva plní. Jednou z nich je například vlastnost tvrdnutí, tzv. hardening. Dále například ztenčování a hatching. Všechny tyto procesy se intenzivně zkoumají. Je snaha pochopit na jakých principech tyto procesy fungují a jakou roli hrají při oplození. Poznatky o těchto procesech by mohly odhalit důležité informace využitelné ke zlepšení technik umělého oplodnění, jak v hospodářské, tak humánní sféře (De Vos a Van Steirtegem, 2000; Makerevič a kol., 2017).

V této bakalářské práci jsem se rozhodla formou rešerše zpracovat informace o uvedené vrstvě, která hraje významnou roli při vývoji oocytů. Dále i její vlastnosti, které jsou využitelné v oblasti umělého oplodnění, což je dnes již běžný proces, jak u zvířat (v zemědělských chovech nebo v zoologických zahradách), tak také v humánní sféře. Část je věnovaná i metodě IVF, která díky novým poznatkům nabývá čím dál většího významu, protože díky nim se zvyšuje úspěšnost provedení tohoto procesu.

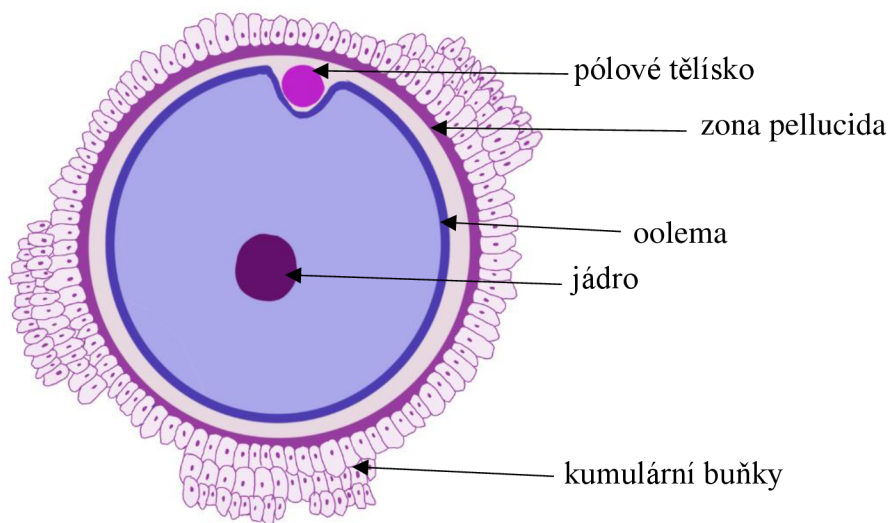
1. Zona pellucida, její vznik, struktura a funkce

Zona pellucida (ZP) je označení pro acelulární vrstvu složenou z glykoproteinů, která obklopuje plazmatický obal vajíčka zvaný oolema (Wassarman a Litscher, 2018; Wassaramn a kol., 2004; Bleil a Wassaramn, 1980). Jako první ji v roce 1827 objevil a popsal lékař a přírodovědec Karl Ernst von Baer (Litscher a Wassarman, 2020). Jedná se o silnou vrstvu na povrchu rostoucího oocyty (neoplozeného vajíčka), vyvíjejícího se ve vaječnicích savců (Wassarman a Litscher, 2018; Wassaramn a kol., 2004; Bleil a Wassaramn, 1980). ZP je vysoce porézní vrstvou, která je polopropustná pro velké molekuly, viry apod. (Wassarman a Litscher, 2012; Familiari a kol., 1972). Má ale také mnoho jiných, důležitých funkcí, při ochraně vajíčka, distribuci látek mezi vajíčkem a vnějším prostředím a další neméně důležité funkce. V posledních letech se především zkoumají funkce, které má ZP v procesu oogeneze a oplodnění (Familiari a kol., 2006; Hastings a kol., 1972).

1.1 Vznik ZP

Oogeneze je proces vzniku a vývoje vajíčka ve vaječnicích samic. Prvopohlavní buňky (gonocyty) dávají vznik oogoniím. Ogonie se následně mitoticky dělí a vytváří tak shluky, které tvoří oocyt I. řádu ($2n$). Ten se meioticky dělí (I. meiotické dělení). V profázi I. meiotického dělení se vývoj zastaví (Collado-Fernandez, 2012; Eckelbarger, 2005). Oocyt I. řádu v takové fázi obklopuje vrstva plochých epitelových buněk, které tvoří primární folikul. V období puberty se začnou oocyty dále dělit. Oocyt I. řádu se rozdělí na oocyt II. řádu ($1n$) a první pólóvé tělísko (Fusco a Minelli, 2019). Při II. meiotickém dělení se oocyt II. řádu dělí na vajíčko (ovum) a druhé pólóvé tělísko. Meiotické dělení je však dokončeno až poté, co pronikne spermie do vajíčka (Collado-Fernandez, 2012; Bukovsky a kol., 2005).

Již zmiňovaný folikul také prodělává několik vývojových stádií. Primární folikul je tvořený oocytem I. řádu a jednou vrstvou folikulárních buněk. Tyto buňky začínají růst a vytváří kolem oocyty několik vrstev granulozních buněk, které na vnější povrch oocyty produkují glykoproteiny, ze kterých se vytváří ZP (viz obrázek 1) (Baena a Terasaki, 2019; Bukovsky, 2005; Eppig, 2001; Geneser, 1986). To se odehrává během 2. až 3. týdne růstové fáze myšičího vajíčka (Wassarman a Litscher, 2012). Když vajíčko dosáhne plné velikosti, folikul se začne výrazně dělit a růst. Dochází k nárůstu buněk až o 60 000 buněk, čímž se z něj stává Graafův folikul, který má uprostřed dutinu tzv. antrum, naplněnou tekutinou, okolo které je několik řad kumulárních buněk. Vrstva těchto buněk, které jsou nejbližší oocyty, se mění ve vrstvu, které se říká corona radiata (Wassarman a Litscher, 2012).



Obrázek 1: Oocyt nacházející se v sekundárním folikulu. (Obrázek vlastní, podle: Bedford, 1983)

1.2 Zánik ZP

Po oplození oocyту spermii dochází k dalšímu vývoji. Vzniká embryo, které prochází několika vývojovými stádii: zygota, 2 blastomery, dále dochází ke zmnožení buněk, morula, blastocysta. Následně dochází ke gastrulaci. ZP setrvává okolo vajíčka až do období blastocysty. Ta prochází několika fázemi: raná blastocysta, expandovaná, volná a prodloužená blastocysta. U člověka jsou to fáze 7. až 10. dne po oplození (Litscher a Wassarman, 2020). Expandovaná blastocysta je u člověka období 8. až 9. dne. V této fázi se embryo zvětšuje a zároveň se zmenšuje periviteliní prostor a také se zužuje ZP. Následuje volná blastocysta, kdy embryo vystupuje ze ZP a zůstává volně (Gupta, 2023; Malínský a Lichnovský, 2006; Wassarman a kol., 2004; Modlínski, 1970). Blastocysta se díky specifickým proteázám dostává ven ze ZP těsně před nidací do dělohy (Wassarman a Litscher, 2012). Tento proces vystoupení blastocysty ze ZP se nazývá „hatching“ (Wassarman a kol., 2004)

Hatching je proces, který probíhá u všech obratlovců, kteří mají kolem vajíčka a později i vyvíjejícího se embrya ochranný obal zvaný ZP, viteliní membrána (VM/VE) případně ochranný obal vajíčka atp. (Korwin-Kossakowski, 2011; Nokhbatolfoghahai a Downie, 2007; Yamagami 1981). Čas spuštění hatchingu je běžně dán geneticky, ale také teplotou. Existují však i výjimky. Mezi jednotlivými živočišnými druhy jsou podmínky pro hatching poměrně variabilní (Martin, 1999). Podle Yamagami (1981) se tento proces dělí do dvou kategorií: mechanický a enzymatický hatching. Mechanický neboli biochemický hatching nastává při působení často vnějších faktorů (Yamagami, 1981), jakými jsou například teplota, chemické složení prostředí okolo nebo také světelné podmínky. U ryb a obojživelníků je dále významná například koncentrace kyslíku ve vodě případně pH vody, salinita. Tyto faktory mohou mít

přímý vliv na hatching, resp. na prodloužení nebo zkrácení doby jeho nástupu v procesu embryogeneze. Nepřímý vliv se projevuje ovlivněním sekrece enzymů potřebných k tomu, aby hatching proběhl (Korwin-Kossakowski, 2011; Martin, 1999). Enzymatický hatching umožňuje tzv. hatching gland (HG), což je žláza objevená u některých druhů obratlovců. Je složená z tzv. „hatching gland cells“ (HGCs), které obsahují granula, která produkují hatching enzymy. Působením těchto enzymů dochází k rozkládání ZP a vystoupení embrya z ochranného obalu. Poté, co se embryo ze zony dostane, dochází k úplné degeneraci HGCs (Korwin-Kossakowski, 2011; Nokhbatolfighahai a Downie, 2007). Tyto enzymy se u různých živočichů liší. Například u ryb se jedná o enzym chorionaza (Quesada a kol., 2019; Korwin-Kossakowski, 2011; Yamagami, 1981), ovastacin je enzym u lidí a myši. Dále byly enzymy nalezeny například i u členovců, kde se jednalo o astacin. Všechny tyto enzymy patří do stejné skupiny enzymů (Quesada a kol., 2019).

1.3 Struktura a funkce ZP

Savčí oocyty se během dvou týdnů vývoje zvětší v průměru z 12 μm na konečných asi 85 μm . V průběhu růstu oocytu se na jejím plazmatickém obalu (oolemě) začíná tvořit ZP, která je zpočátku jen tenkou difuzní vrstvou složenou z fibril. Postupně se mění v hustší, průsvitnou vrstvu o tloušťce přibližně 8 μm (Wassarman a Litscher, 2012; Wassarman a Josefowicz, 1978). Její tloušťka se může pohybovat mezi 2–30 μm (viz obrázek 2) v závislosti na tom u jakého druhu se vyskytuje (Moros-Nicolás a kol., 2021; Litscher a Wassaraman, 2020; Gupta a kol., 2012; Wassarman a Litscher, 2012; Fléchon a kol., 2004; Bertrand a kol., 1995). Při podrobných pozorováních ZP skotu, králíků (Moros-Nicolás a kol., 2021), ale také křečků, lidí a myši, byla objevena její vícevrstevná struktura složená z vnější, vnitřní a mezilehlé vrstvy. Vnější i vnitřní vrstva je typická pravidelným uspořádáním fibril, zatímco uprostřed mají fibrily zcela náhodné uspořádání. Toto uspořádání se následně po oplození může měnit, a to díky procesu zvanému hardening. Napříč obratlovcí je tato vrstva typická buď 2 nebo 3 vrstvami fibril, které jsou různě uspořádané (Litscher a Wassarman, 2020).



Obrázek 2: Mikroskopický snímek zralého oocyty s plně vytvořenou ZP (Autor fotografie: A. Nesvadbová).

Proteiny ZP

ZP je složena z proteinů, které tvoří až 30 ng v závislosti na druhu (Gupta a kol., 2012). Pro výskyt proteinů je typická vnější vrstva ZP, která má pravidelné uspořádání fibril a jejich větší denzitu než vnější vrstva (Litscher a Wassarman, 2020). Proteiny jsou nejčastěji syntetizovány rostoucím oocytem. U některých skupin organismů se však komponenty mohou syntetizovat i ve folikulárních buňkách či v játrech (Wang a kol., 2021; Wassarman a Litscher, 2018; Jovine, 2005). Výzkumy potvrzují, že součástí každé zona pellucida savců jsou tři základní glykoproteiny, které se označují ZP1 (ZPB), ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC) a u člověka navíc ZP4 (Gupta, 2023; Litscher a Wassarman, 2020; Wassarman a kol., 2004; Bokhove a Jovine, 2018; Wassarman a Litscher, 2018; Gupta a kol., 2012; Hasegawa a kol., 2006; Jovine a kol., 2005; Wassarman a kol., 2004; Wassarman a kol., 1999; Green, 1997). ZP4 není specifický jen pro vrstvu ZP humánních oocytů, ale byl prokázán také u krys (Hoodbhoy a kol., 2005), křečků (Izquierdo-Rico a kol., 2009), opic *Macaca radiata* (Ganguly a kol., 2008) a také prasat (Gupta, 2015). Tyto tři základní proteiny se vyskytují u všech savců a jejich složení a funkce jsou si z velké části podobné.

Například sekvence myších a humánních ZP2 a ZP3 jsou si podobné z 56 % a 67 %, což naznačuje, že by mohly být tyto glykoproteiny odvozeny ze společných předků genů (Gupta, 2023; Wassarman a Litscher, 2012). Tyto proteiny jsou důležitou součástí ZP a tvoří její velkou část. Bleil a Wassarman (1980) zjistili, že všechny ZP, které zkoumali u myši, se skládaly ze 4,8 až 5,0 ng proteinů, což je více než 80 % jejich suché hmoty a okolo 17 % z celkové hmoty proteinů oocytů. Obecně se však množství proteinů v ZP odhaduje pouze na ~3,5 ng (Wassarman a Litscher, 2012). Každý z těchto proteinů má svou specifickou funkci, která je důležitá při oogenezi, fertilizaci a preimplantačním vývoji (Bokhove a Jovine, 2018; Wassarman a Litscher, 2018; Hasegawa a kol., 2006; Jovine a kol., 2005; Wassarman a kol.,

2004). Tyto proteiny jsou také specifické svým glykoproteinovým řetězcem a jinou molekulovou hmotností, která v případě ZP1 tvoří 36 %, ZP2 47 % a ZP3 17 % z celkového množství proteinů ZP (Bleil a Wassarman, 1980).

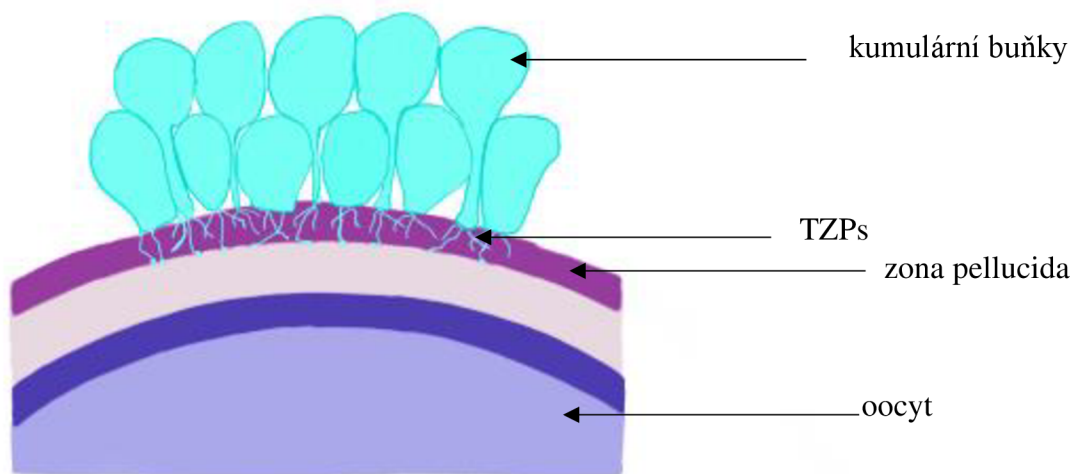
Některé funkce proteinů jsou u různých druhů odlišné, jiné zase podobné. Jednou z nejvýznamnějších funkcí ZP proteinů je vazba spermie na vajíčko, proto je vysoce specifická pro jednotlivé druhy. Stejná funkce těchto proteinů však ještě neznamená, že by se navzájem mohly nahradit. Receptory na ZP jsou druhově specifické a není tedy možné je pro danou funkci využít pro jiný druh (Gupta, 2015).

Kumulární buňky oocyty

Při vývoji oocyty je nezbytná komunikace a výměna komponent s jeho okolím. Vajíčko v antrální folikulu obaluje několik vrstev granulózničních buněk, přičemž první tři vrstvy označujeme jako kumulární buňky. Komunikaci mezi těmito buňkami a vajíčkem zprostředkovávají gap junctions. Tyto intracelulární spoje zajišťují komunikaci a hrají významnou roli jak při vývoji, tak v procesu rozmnožování (Bani-Yaghoub, 1999; Bani-Yaghoub a Bechberger, 1999; Eppig a O'Brien, 1996). Zajišťují kontakt nejen vajíčka s granulózničními buňkami, ale také kontakt v rámci celého ovaria (Ackert a kol., 2001). Kromě toho jejich spolupráce umožňuje významně regulovat meiotické zrání vajíčka a také přeměnu folikulárního epitelu na žluté tělísko (Anderson a Albertini, 1976). Gap junctions se skládají z intercelulárních membránových kanálků, které umožňují průchod malých molekul (inoty, cAMP, ATP, Ca²⁺ atd.) o velikosti 1 < kDa (Nielsen a kol., 2012; Kidder a Mhawi, 2002; Ackert a kol., 2001). Tyto kanálky se skládají z různých konexinů. Každý konexin je tvořen šesti konexinovými proteiny (Nielsen a kol., 2012). Konexiny a jejich specifická funkce se může lišit mezi druhy. Nejlépe prozkoumané jsou u myši a krysa, kde mají často i podobnou nebo stejnou funkci. Mezi kumulárními buňkami zajišťuje kontakt převážně konexin43. Pokud kumulární buňky tento konexin nemají, zastaví se vývoj oocyty v prenatální fázi. Tento konexin byl také zaznamenán v malém množství na povrchu oocyty. Mezi granulózničními buňkami a oocytem je spojení zajištěno pomocí konexinu37. Jeho nepřítomnost výrazně ovlivňuje vývoj antrálního folikulu (Kidder a Mhawi, 2019). Spojí jsou do rostoucího oocyty přenášeny aminokyseliny (AMK), glukóza a nukleotidy (Kidder a Mhawi, 2019; Eppig, 1991). Mimo to však procházejí také signály, které regulují meiotické zrání plně vyrostlého oocyty (Díaz-Fontdevila a kol., 2009; Fagbohun a Downs, 1991).

Gap junctions jsou dlouhé jen několik nanometrů, a proto je přenos látek k oocyty přes ZP zprostředkován transzonal projections (TZPs) (viz obrázek 3). TZPs propojují kumulární buňky s oocytem a umožňují tak komunikaci v obou směrech (Kidder a Mhawi, 2019). Jak zjistili Baena a Terasaki (2019), z každé kumulární buňky vychází více než jeden TZPs směrem k ZP. Ne všechny spoje dosáhnou zony, některé končí slepě, ještě před jejím dosažením, a jiné naopak procházejí skrz ni až k oocyty (Baena a Terasaki, 2019).

Kumulární buňky jsou významné i z hlediska imunitní ochrany oocyty. Chrání je před vlivy vnějšího prostředí, které by mohly způsobit zánět, čímž by došlo k reakci vedoucí k autoimunitnímu onemocnění. Tento princip je často vysvětlením pro neplodnost, kde mají kumulární buňky velký význam, protože usnadňují selekci spermií, jejich kapacitaci a akrozomální reakci (Xia a Chan, 2009).



Obrázek 3: Schéma několika kumulárních buněk s transzonálními výběžky (TZPs) přes ZP k oocytu. (Obrázek vlastní, podle: Baena a Terasaki, 2019)

1.4 Význam ZP

Funkce ZP jsou spojené s důležitými procesy, kterými prochází oocyt před oplozením i po něm. Je významná pro vývoj oocytu, oplodnění a počáteční vývoj embrya. Vytváří se v procesu folikulogeneze, zprostředkovává komunikaci mezi oocytem a vnějším prostředím. Následně plní funkci při procesu oplození, kdy prostřednictvím proteinů zajišťuje navázání a průchod kapacitovaných, druhově specifických spermií. Po oplození dochází ke změnám ve struktuře. Tyto změny jsou řízeny enzymaticky a jejich výsledkem jsou strukturní změny, které brání spolu s dalšími mechanismy tomu, aby docházelo k polyspermii. Po oplození plní především ochrannou funkci až do fáze, kdy se vyvíjející embryo implantuje do dělohy samice. Chrání vzniklé embryo, které se dělí až do fáze blastocysty, kdy prochází embryo přes vejcovody až do dělohy, kde ZP setrvává těsně do chvíle před nidací do dělohy (Moros-Nicolás a kol., 2021; Bokhove a Jovine, 2018; Wassarman a Litscher, 2018).

Významnost této vrstvy byla potvrzena výzkumy různých autorů. Po prokázání, že jednobuněčná fáze vajíčka je skoro stejně úspěšná, jako další pozdější fáze, včetně fáze blastocysty, byl zkoumán vliv odstranění ZP. Zda bude mít odstranění ZP nějaký vliv na úspěšnost následného vývoje, bylo zkoumáno na osmibuněčných embryích a blastocystách. Výsledky výzkumu neodhalily signifikantní rozdíl mezi úspěšností přenosu vajíček osmibuněčné fáze, a to jak v případě, kdy byla ZP odstraněna pomocí pronázy, tak i při odstranění jinými metodami. Odstranění ZP pomocí pronázy tak zabránilo téměř zcela vývoji těchto osmibuněčných fází vajíček, když byly přeneseny do vejcovodů samičky. U blastocyst byla také využita k odstranění ZP pronáza. Po její aplikaci a transportu do dělohy nebo vejcovodů nebyl pozorován žádný další vývoj. V případě, kdy byla pro odstranění použita nižší koncentrace, byly blastocysty úspěšně přeneseny a nebyl zastaven ani jejich následný vývoj. (Bronson a McLaren, 1970; Mintz, 1967).

Těmito výzkumy bylo potvrzeno, že blastocysty potřebují ZP pro průchod vejcovodem, a ještě po nějakou dobu, co se nacházejí v děloze. Následně asi den po přesunu však ZP ztrácejí spontánně a v této fázi již není potřebná pro jejich další vývoj (Bronson a McLaren, 1970; Orsini a McLaren, 1967; Tarkowski, 1961). Pro odstranění se dříve běžně využívala právě pronáza. Mnohé z výzkumů však odhalily, že při vystavení vajíček plnému působení enzymu pronáza nedochází k žádnému dalšímu vývoji blastocyst ani jiných vývojových stádií oplozených vajíček. Proto se později začaly užívat nižší koncentrace, případně jiné enzymy. Tento negativní vliv pronázy popsal už McLaren ve své práci „Transfer of zona-free mouse eggs to uterine foster mothers“ z roku 1969.

2. Zona pellucida u různých živočišných druhů

ZP zastává u všech savců stejně důležitou funkci, a to jak v procesu ontogeneze, tak především ve fázi oplození, kdy zajišťuje, aby vše proběhlo tak, jak má (fyziologicky), tedy aby se navázaly druhově specifické a morfologicky nedefektní spermie. Dále indikuje akrozomální reakci a také zajišťuje, aby nedocházelo k polyspermii, což je stav, kdy přes ZP projde do oocytu více než jedna spermie.

Prvotní studie provedené především na myších a krysách ukázaly konstantní výskyt tří glykoproteinů, které byly později pojmenovány jako ZP1, ZP2 a ZP3. Výskyt těchto proteinů se později potvrdil i u dalších savců, pro které je tato fibrilární, extracelulární vrstva typická (Spargo a Hope, 2003). Mimo savce se v podobné formě nachází i u dalších vyšších obratlovců, například u ostnokožců, ptáků, plazů, obojživelníků a ryb (Litscher a Wassarman, 2020; Feng a kol., 2018; Wassarman a Litscher, 2018; Jovine a kol., 2005; Spargo a Hope, 2003). Jakousi obdobu ZP můžeme najít i u bezobratlých živočichů. U některých živočichů se označuje jako VE (Wassarman a Litscher, 2018; Wassarman a kol., 2004; Spargo a Hope, 2003; Sládeček, 1986).

VE je stejně jako ZP vícevrstevná struktura složená z fibril, které jsou uspořádány do tří vrstev. Její hlavní funkcí je vytvoření bariéry mezi bílkem a žloutkem, čímž ovlivňuje vlastnosti a vývoj embrya (Bellairs a kol., 1963). Největší podobnost můžeme pozorovat u vnitřní vrstvy ZP a VE (Mann, 2008). Sekrece komponent této vrstvy je umožněna granulozními buňkami obklopujícími oocyt a samotným oocytem (Wassarman a Litscher, 2018; Mann, 2008; Jovine, 2005). Některé glykoproteiny VE se prokazatelně syntetizují i jinde než v oocytu, a to konkrétně v játrech, odkud jsou následně za kontroly estrogenu transportovány krevním řečištěm do vaječnicků (Jovine a kol., 2005). Stejně jako ZP je VE vrstva, která svou vnitřní částí přiléhá k oocytu a je složena z proteinů (Mann, 2008). Tyto proteiny se podobají ZP proteinům a často jsou také glykosylovány (Jovine a kol., 2005). Mezi hlavní proteiny této vrstvy patří GPI, GPII a GPIII (Mann, 2008). Vnitřní vrstva obsahuje proteiny podrodin ZPC/ZP3, ZP1 a ZPD, což je rozdělení, které ve svých pracích zmiňují například Feng a kol., 2018 nebo také Moros-Nicolás a kol., 2021.

Jedno z prvních rozdělení genů kódujících proteiny ZP navrhnul J. D. Harris a kol. (1994) v díle s názvem „Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families“. Toto rozdělení rozřazuje geny do tří podrodin. Nezahrnuje však možné paralogie v rámci podrodin a tak bylo později nahrazeno lépe propracovaným rozdělením. Mimo vytvoření podrodin však navrhl i dodnes využívané označení proteinů - ZPA ZPB a ZPC a to konkrétně dle délky proteinové sekvence, od té nejdelší ZPA po nejkratší ZPC. Toto rozdělení nebylo v souladu s pořadím, ve kterém byly označeny proteiny u savců, konkrétně u myší, a proto ZPA odpovídá ZP2, ZPB odpovídá ZP1 a ZPC odpovídá ZP3 (Spargo a Hope, 2003).

Charakteristické geny kódující proteiny ZP byly později klasifikovány do šesti podrodin. Těmito podrodinami ZP proteinů byly: ZP1, ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC), ZP4 (ZPB), ZPD A ZPAX (Moros-Nicolás a kol., 2021; Wang a kol., 2021; Feng a kol., 2018). Jedná se o geny, které nevykazují mnoho podobností s těmi u bezobratlých. Výzkum provedený Feng a kol. (2018) uvádí ještě vhodnější rozdělení do osmi podrodin, které by mělo být v souladu s dnešní nomenklaturou. A mělo by tak zahrnovat evoluční vztahy mezi ZP genovými podrodinami. Jedná se o ZPAX, ZPY, ZP1/4, ZP2, ZP3.2, ZP3.3, ZP3.1, ZPD (Feng a kol., 2018). Moros-

Nicolás a kol. (2021) uvádějí další možné rozdělení, které je v souladu s nomenklaturou, a to do čtyř podrodin ZPA, ZPB, ZPC a ZPX. Toto rozdělení vzniklo na základě analýzy dat sekvencí cDNA z různých sekvenčních nukleotidových databází (Moros-Nicolás a kol., 2021).

2.1 Paryby (*Chondrichthyes*)

Paryby jsou nejstarší známou, žijící skupinou obratlovců, u kterých se vyskytují čelisti. Do této skupiny řadíme žraloky, rejnoky, chiméry atd (Litscher a Wassarman, 2018; Heinicke a kol., 2009; Hamlett, 2005). Jedná se o skupinu se značnou reprodukční diverzitou. Méně, než polovina z nich klade vejce. Tato vejce mohou být velká až 10 cm a zpravidla je obklopuje kolagenní vrstva (collagenous capsule) a ZP (Litscher a Wassarman, 2018; Galíndez a kol., 2014). K fertilizaci však musí dojít ještě před konečným zformováním kolagenní vrstvy, protože ta na rozdíl od ZP kostnatých ryb (*Teleost*) neobsahuje mikropyle či jiné útvary umožňující průchod spermií k vajíčku. Samotná ZP pak plní ochrannou funkci po celou dobu vývoje embrya (Litscher a Wassarman, 2018; Hamlett, 2005).

Analýzou proteinové vrstvy okolo vajíčka byly nalezeny tři geny kódující proteiny ZP. Tyto geny spadají do podrodin ZP2, ZP3 a ZP4. Objevují se zmínky i o čtvrtém genu, který prozatím nebyl průkazně potvrzen, ale pravděpodobně by zapadal do podrodiny ZPD. Můžeme najít i zmínky o pátém genu podrodiny ZPAX, ten je ale dnes považován za identický se ZP2. Porovnáním sekvencí ZP proteinů savců, paryb a ryb došli vědci k závěru, že se jedná o homologní geny, tedy geny společného původu (Litscher a Wassarman, 2018).

2.2 Ryby (*Osteichthyes*)

Všechny ryby mají kolem oocyty tlustý, fibrilární, extracelulární matrix, který se označuje ZP, ale také VE, případně chorion (Sano a kol., 2022; Litscher a Wassarman, 2018; Thompson a kol., 2017; Spargo a Hope, 2003). Litscher a Wassarman (2018) uvádějí, že rybí ZP je nejčastěji složena ze 2 až 4 proteinů, které jsou homologní k těm v savčí ZP. Syntéza těchto proteinů může probíhat stejně jako u savčí zony v rostoucím oocyty, ale také v játrech, případně i v obou orgánech (Litscher a Wassarman, 2018; Conner a Hughes, 2003; Spargo a Hope, 2003). Proteiny některých ryb ZP1 α , ZP1 β a ZP3 jsou ortologní k humánním či myším ZP1 a ZP3, což ukazuje na původ těchto proteinů u společného předka. Procentuální shoda v sekvencích mezi ZP ryb a ZP u myši a lidí se pohybuje okolo 33 %. Nižší procentuální shoda v sekvencích naznačuje pouze možnou shodu ve funkcích těchto proteinů u ryb a savců (Litscher a Wassarman, 2018). V některých pracích se geny kódující proteiny rybí ZP považují za homologní s těmi v ZP *Tetrapoda*. Fylogenetické analýzy provedené v rámci některých výzkumů, například Sano a kol. (2022) však naznačují, že ač existují jisté podobnosti ve struktuře některých genů, jejich vývoj je nezávislý na vývoji genů *Tetrapoda*. Kromě toho, že počty proteinů v ZP se liší, tak také množství genů je jiné. Savčí genom se skládá ze 3 až 4 genů, zatímco rybí genom může mít 7 a více ZP genů (Goudet a kol., 2008).

Mezi hlavní funkce ZP proteinů savců patří schopnost kontroly navázání kapacitovaných spermií. Naproti tomu u ryb tato funkce není třeba, protože sperma se k vajíčku dostává přes mikropyle. Jde tedy o přímou cestu a kontakt spermie a vajíčka a není zapotřebí žádného procesu navázání. Proto mají proteiny spíše strukturální funkci (Litscher a Wassarman, 2018).

Osteichthyes je skupina, typická osifikovanou kostrou. Zahrnují skupinu *Sarcopterygii* a *Actinopterygii*. Mezi *Actinopterygii*, česky paprskoploutvé, patří většina dnes žijících ryb, až na latimerie (*Latimeria*) a bahníky (*Protopterus*) (Zhao a kol., 2021; Friedman a Brazeau, 2010).

Osteichthyes jsou skupinou, která produkuje mnoho malých vajíček, u kterých probíhá vnější oplození. Vajíčka mohou být velká maximálně 5 mm v průměru, narozdíl od *Chondrichthyes*, kteří produkují až několika centimetrová vajíčka. Velikost vajíčka ryb se liší také v závislosti na výskytu daného druhu. Vajíčka bentických druhů jsou větší a obaluje je mnohem širší membrána (ZP) než vajíčka druhů pelagických. Velikosti ZP se pohybuje od cca 7 µm po 30 µm, někdy až 60 µm. Rozdíl je také ve vrstvách ZP. Některé druhy mají pouze jednu vrstvu diametrálně uspořádaných fibril, jiné jsou vícevrstvé, někdy třívrstvé stejně jako u savčí ZP (Litscher a Wassarman, 2018). U savců spermie přiléhá k ZP a dostává se skrz ni, čímž dochází ke splnutí membrán a následnému proniknutí spermie do vajíčka, tedy oplození (Florman a Ducibella, 2006). U ryb tomu však takto není. V ZP se nachází struktura, jakýsi otvor, kterým se spermie dostane k vajíčku. Tento útvar nazýváme mikropyle, a může se nacházet ve větším počtu, než jedna (Schreier a kol., 2021).

Mezi rybami existuje i parafyletická skupina bezčelistnatců. Z bezčelistnatců dodnes přežívají pouze dvě skupiny: sliznatky a mihule. Obě tyto skupiny patří mezi nejstarší žijící skupiny obratlovců vůbec, a proto se o nich uvažuje jako o možných původcích ZP genů. Vajíčko sliznatek je obklopeno tlustou fibrilární strukturou, která může mít až 250 µm (Litscher a Wassarman, 2018), což dává vajíčku výraznou pevnost, která je nejspíš nezbytná pro přežití v bentosu, na dně moří (Gaisler a Zima, 2018; Litscher a Wassarman, 2018; Jørgen a kol., 2012). Na rozdíl od sliznatek se mihule přirozeně vyskytují spíše v jezerech, řekách a v pobřežních oblastech (Gaisler a Zima, 2018; Young, 1962). To pravděpodobně vysvětluje i relativně tenčí vrstvu obklopující vajíčko, která se pohybuje v rozmezí 6–11 µm (Litscher a Wassarman, 2018; Dziewulska a Domagała, 2009).

V souvislosti s rybí ZP je především zkoumáno, zda je tloušťka ZP ukazatelem konkrétních ekologických vlastností (Thompson a kol., 2017). Už od konce 20. století se bere tlustší ZP jako ukazatel nevlídných podmínek, ve kterých se daná vajíčka musejí vyvíjet. Jedná se jak o prostředí bentosu, tak také o oblasti s nižší teplotou, tedy polární oblasti. V souvislosti s tím se také zkoumá možná schopnost glykoproteinů ZP, ochránit vajíčka před zmrznutím (Litscher a Wassarman, 2018).

2.3 Obojživelníci (*Amphibia*)

Dnešní obojživelníky dělíme do tří řádů: *Caudata* (ocasatí), *Anura* (žáby), *Gymnophiona* (červoiři). Tyto skupiny jsou výrazně odlišné od jiných obratlovců způsobem života a také rozmnožovacími strategiemi. Pro obojživelníky je charakteristické, že jsou přizpůsobeni životu jak ve vodě, tak i na souši. To se odráží i v rozmnožovacím cyklu, kdy jsou vylíhnutí jedinci přizpůsobeni životu ve vodě a později se vyvíjejí v dospělé schopné života na souši (Cogger a Zweifel, 1998). Proto se liší i stavba jejich vajíček, která mají velmi jednoduchou stavbu bez skořápky či jiného ochranného obalu. Po oplození se tak vejce skládá pouze z embrya, žloutku, který jej vyživuje, a rosolovité, ochranné vrstvy okolo něj (Hedrick, 2008; Cogger a Zweifel, 1998).

V procesu oogeneze u samic dochází k ovulaci vajíčka, při kterém se vajíčko uvolňuje z ovariálního folikulu a oocyt tak vstupuje do tělní dutiny pouze s tenkým obalem kolem oocytu (Oielska, 2009). Tomuto obalu se u obojživelníků říká tak, jako u ryb a dalších živočichů VE (Sano a kol., 2022; Litscher a Wassarman, 2020; Oielska, 2009; Spargo a Hughes, 2003). VE obojživelníků se stejně, jako ZP, skládá z glykoproteinů a její komponenty jsou sekretovány oocytem (Conner a Hughes, 2003; Jovine a kol., 2002). U některých druhů se VE syntetizuje v pozdní fázi oocytu prvního řádu, ještě před vytvořením kortikálních granul a utvořením žloutku. Postupně vyplňuje fibrilami periviteliní prostor mezi vnější vrstvou oocytu a folikulárními buňkami.

Ve VE obojživelníků byly detekovány až 4 glykoproteiny, které jsou svou nukleotidovou sekvencí shodné s těmi v savčí ZP. Jedná se o geny z podrodin ZPA, ZPB, ZPC a ZPAX (Sano a kol., 2022; Oielska, 2009; Hedrick, 2008). U obojživelníků se vyskytují i zmínky o genech z podrodiny ZPD. U savců nejsou záznamy o genech skupiny ZPD žádné, což ukazuje na možnost, že tento gen vymizel ještě před vyčleněním savců (Moros-Nicolás a kol., 2021). Shoda v sekvencích se nachází i při porovnání sekvencí proteinů VE ryb a VE obojživelníků. To ukazuje na skutečnost, že některé z těchto genů se do dnešní podoby dostaly ještě před evolučním oddělením ryb a obojživelníků (Moros-Nicolás a kol., 2021; Smith a kol., 2005; Spargo a Hope, 2003). Okolo plně vyvinutého oocytu se nachází VE v podobě dvouvrstvy. Vnější vrstva je tvořena hustou sítí fibrilárních vláken, která jsou nasměrována paralelně s povrchem oocytu. Vnitřní vrstva je naopak typická volným uspořádáním fibril (Oielska, 2009).

Pro každou skupinu organismů existuje modelový druh, který se nejlépe zkoumá, a slouží jako výchozí pro poznatky nejen o ZP/VE. Ve skupině obojživelníků je velmi často zmiňován v souvislosti se ZP a ZP geny druh *Xenopus laevis*, což je zástupce z řádu *Anura*. Zároveň se jedná o organismus, u kterého se poprvé podařilo izolovat VE z živočišného vajíčka (Hedrick, 2008).

2.4 Plazi (*Reptilia*)

Další skupinou obratlovců jsou plazi. Jedná se o skupinu často chápanou jako parafyletickou, tedy nezahrnující všechny potomky společného předka. Nejčastěji jsou z této skupiny vyčleňováni ptáci (*Aves*) (Moravec, 1999; Cogger a Zweifel, 1998). Podle autorů Moravec (1999) a Cogger a Zweifel (1998) zahrnuje tato skupina řády *Testudines* (želvy), *Rhynchocephalia* (hatérie), *Squamata* (šupinatí) *Crocodylia* (krokodýli).

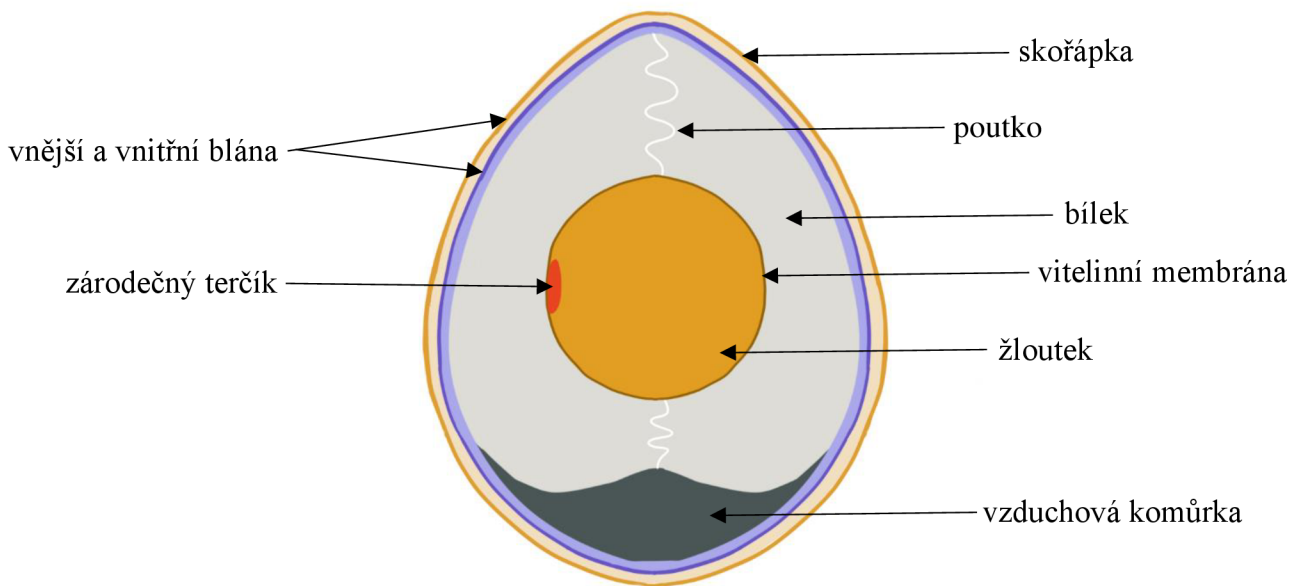
Plazi jsou živočichové s vnitřním oplozením. Výjimkou jsou hatérie, u kterých se spermie předávají kloakálním kontaktem. U plazů můžeme pozorovat všechny tři typy rozmnožování: vejcoživorodost, vejcorodost a v některých případech i živorodost. V případě vejcorodých a vejcoživorodých se zárodek vyvíjí ve vajíčku, které jsou oproti těm u obojživelníků mnohem složitější a lépe přizpůsobené na nepříznivé podmínky prostředí. Embryo je tak chráněno skořápkou. Uvnitř se nachází žloutek, který embryo vyživuje a dále tři zárodečné blány: allantois, chorion a amnion (Moravec, 1999; Cogger a Zweifel, 1998).

Stejně jako vajíčka jiných obratlovců, i to plazí, chrání glykoproteinová vrstva. Některé zdroje ji udávají jako periviteliní membránu, ale často se také používá pojmenování shodné s pojmenováním u ryb a obojživelníků, tedy ZP (Vieira a kol., 2010; Spargo a Hope, 2003). ZP se začíná formovat v období kdy začíná oocyt růst, v tomto období má asi 80 µm. Zona se

formuje až do období, kdy začíná tzv. vitelogeneze. Na počátku vitelogeneze má oocyt asi 1700 μm a kolem něj je již zformovaná ZP o tloušťce asi 3.5 μm (Vieira a kol., 2010; Andreuccetti a Carrera, 1987). Její komponenty jsou syntetizovány samotným oocytem a také folikulárními buňkami (Wang a kol., 2021; Vieira a kol., 2010). Tyto komponenty jsou následně transportovány pomocí vezikulů do perivitelinního prostoru. Perivitelinní prostor není rovnoměrný, jedná se pouze o krátké úseky okolo oocytu. Úseky se postupně vyplňují fibrilární složkou, která je proložena amorfním materiálem (Vieira a kol., 2010; Andreuccetti a Carrera, 1987).

2.5 Ptáci (*Aves*)

Ptáci jsou skupinou obratlovců typickou např. přítomností peří, pevnou a lehkou kostrou a snášením vajec se skořápkou (Young, 1962). Tato vejce lze charakterizovat jako amniotická vejce, což znamená, že mají tři zárodečné blány. Velikost vejce závisí na velikosti ptačí samičky. Vždy ho ale již při kladení obklopuje pevná vrstva zvaná skořápka. Ta je většinou složena z uhličitanu vápenatého (Rahman, 2013; Young, 1962). Kromě skořápky je dále embryo obklopeno VE. Další struktury viz obrázek 3. VE obklopuje a chrání samotný žloutek a také dává žloutku kulovitý tvar. Zároveň jej tak odděluje od bílku a udržuje ho v centrální části vajíčka. Dělí se na vnitřní a vnější vrstvu. Vnitřní vrstva je transparentní a přiléhá na žloutek. Vnější vrstva má bělavou barvu. VE a žloutek jako jediné nejsou formovány přímo ve vejcovodech. Vnitřní vrstva VE je produkována vaječníky, zatímco vnější vrstva se syntetizuje v horní části vejcovodů (Jovine a kol., 2002). Samotné komponenty VE se stejně jako u ryb mohou syntetizovat nejen v oocytu ale také v játrech (Wang a kol., 2021; Jovine a kol., 2002). Celá membrána je stejně jako u jiných živočichů složena z fibrilárního materiálu a její součástí jsou glykoproteiny. Jednou z nejdůležitějších funkcí VE u ptáků je zabránění polyspermie (Damaziak a kol., 2018; Rahman, 2013; Mann, 2008). Stejně jako VE/ZP jiných živočichů je i ta ptačí typická glykoproteiny různých podrodin. U různých druhů byly prokázány různé geny, celkem však 6 podrodin. V genomu kuřat, jež jsou nejčastěji zkoumanou skupinou z ptáků bylo objeveno všech 6 VE genů: ZPA, ZPB1, ZPB2, ZPC, ZPX1, ZPX2 (Sanol a kol., 2022; Mann, 2008). Geny podrodiny ZPAX byly nalezeny jak u kuřat a jiných ptáků, tak i u obojživelníků. Nebyly však nalezeny u savců, což naznačuje, že se tato podrodina genů pravděpodobně vytratila před vyčleněním savců (Moron-Nicolás a kol., 2021).



Obrázek 4: Podrobný popis ptačího vejce v podélném řezu (Obrázek vlastní, podle: <https://www.britannica.com/topic/egg-food>)

2.6 Savci (*Mammalia*)

Savci jsou skupinou, která je typická tím, že kolem jejich oocytu se nachází ZP. Jedná se zároveň o nejlépe prozkoumanou skupinu z hlediska její struktury, vlastností a funkce. U savců se na rozdíl od jiných živočichů používá v zásadě pouze označení ZP (Spargo a Hope, 2003). Její komponenty jsou stejně jako u obojživelníků syntetizovány pouze samotným oocytem (Wang a kol., 2021; Jovine a kol., 2002). Hlavním zdrojem informací o ZP u savců jsou myši a krysy. Na těchto organismech se ZP zkoumala od počátku, kdy byla známá její existence, což vedlo k tomu, že ty nejzásadnější informace pochází právě z výzkumu na těchto organismech. Později byly obdobné vlastnosti a funkce potvrzeny i u dalších druhů savců (Feng a kol., 2018). Dnes již dobře známe i charakteristiku humánní ZP, což přináší velké množství informací využitelných například při řešení neplodnosti.

Savčí ZP je typická výskytem 3–4 glykoproteinů označovaných jako ZP1 (ZPB), ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC) a ZP4 (viz Tabulka 1). Tyto proteiny se napříč savci velmi podobají nejen strukturou, ale často také funkcí. Podobnosti v sekvencích AMK můžeme nalézt například mezi humánními ZP proteiny a těmi u myši. Humánní ZP1 je z 64 % identická s myší ZP1 a z 96 % je shodná se sekvencí ZP1 u primátů z rodu makak. U prasat představuje ZP1 pseudogen. Humánní ZP2 má z 57 % identickou sekvenci jako myší ZP2, 64 % shoda sekvence je v porovnání s prasečí a 94,2 % se ZP2 makaků. ZP3 humánní je z 67 % identická s myší, z 74 % z prasečí a z 93,9 % se ZP3 makaků. ZP4 u člověka je z 68 % identická s prasečí a z 92 % se ZP4 makaků. ZP4 u myši představuje pseudogen (Gupta, 2023; Gupta a kol., 2012). Většina funkcí ZP se mezi druhy neliší. Někdy jsou však vykonávány odlišnými proteiny. Například u humánní ZP vykonává ZP1 a ZP3 funkci primárního receptoru pro spermie a ZP2 někdy funguje jako sekundární receptor (Gupta, 2015; Gupta a kol., 2012). Některé studie předpokládají, že navázání spermie zajišťuje někdy i ZP4 (Gupta, 2015), ale například výzkum Moros-Nicolás a kol. (2021) říká, že tento specifický protein se tohoto procesu neúčastní.

Ke správnému rozpoznání a navázání jsou potřeba všechny tři proteiny ZP1, ZP2 i ZP3 (Gupta, 2015; Moros-Nicolás a kol., 2021). Naproti tomu u myši je primárním receptorem pro spermie ZP3 a jako sekundární receptor funguje ZP2 (Moros-Nicolás, 2021; Feng a kol., 2018; Wassarman a Litscher, 2009; Wassarman a Litscher, 2004).

Variabilní je napříč druhy i tloušťka ZP. Myši ZP se pohybuje okolo 5 μm (Wassarman a Litscher, 2022; Fléchon a kol., 2004), prasečí až 10 μm (Fléchon a kol., 2004). Humánní ZP má průměrně okolo 18 μm (Wassarman a Litscher, 2022).

Tabulka 1: Typy proteinů tvořících ZP u vybraných druhů savců (Tabulka vlastní, zdroje: Gupta, 2023; Moros-Nicolás, 2021; Gupta, 2012).

Druhy	ZP protein			
	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Myš	✓	✓	✓	×
Prase	×	✓	✓	✓
Pes	×	✓	✓	✓
Tur	×	✓	✓	✓
Člověk	✓	✓	✓	✓
Krysa	✓	✓	✓	✓
Křeček	✓	✓	✓	✓
Králík	✓	✓	✓	✓
Makak kápový	✓	✓	✓	✓

3. Fertilizace

Fertilizace, neboli oplodnění, je proces, při kterém se spojují dvě pohlavní buňky (spermie a vajíčko). Dochází tak ke kombinaci haploidních sad chromozomů dvou jedinců a vzniku oplodněné buňky (zygoty). Fertilizace zahrnuje několik fází: kapacitaci spermií, jejich průnik přes corona radiata a ZP, kontakt spermie s oolemou, spojení plazmatických membrán a vniknutí spermie do vajíčka. V tomto procesu hraje ZP významnou roli jako bariera, kterou musí spermie překonat na cestě k vajíčku a následně po proniknutí spermie brání polyspermii, tedy průniků více než jedné spermie (Kim a kol., 2008; Florman a Ducibella, 2006; Wassarman a kol., 2001).

Proto, aby mohla spermie vajíčko oplodnit, je potřeba, aby proběhlo dozrávání, tzv. kapacitace. Bez tohoto kroku není spermie schopná oplodnit vajíčko *in vivo* ani *in vitro*. Jedním z kroků při kapacitaci je odstranění cholesterolu z membrány spermie, čímž se zpřístupní některé transportní kanály (Sutovsky, 2009; Florman a Ducibella, 2006; Bedford, 1983).

Při samotném průchodu do vajíčka prochází spermie nejdříve přes vrstvu kumulárních buněk, čímž se dostane až k vrstvě corona radiata. Ta představuje bariéru pro pronikající spermii. Pro průnik využívá enzym hyaluronidáza, který je uložen v hlavičce spermie, které se říká akrozom. Kromě hyaluronidázy se v hlavičce nachází i mnoho dalších významných proteinů. Pro samotnou akrozomovou reakci, tedy průchod přes kumulární buňky, ZP a oolemu jsou však nejvýznamnější proteiny hyaluronidáza a akrosin. Hyaluronidáza je uvolňována z akrozomu a štěpí kyselinu hyaluronovou mezi buňkami corona radiata. Touto vrstvou proniká větší množství spermií. Poté se dostávají k vrstvě ZP (Sutovsky, 2009; Kim a kol., 2008; Geneser, 1986), kde se spermie naváže v místě, kde se nachází protein ZP3. Zde dochází k akrozomální reakci. Nejprve dojde ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů směrem do spermie, poté pomocí SNARE proteinů dojde k přiblížení spermie a ZP, uvolní se enzym akrosin, který ZP naruší a spermie tak může volně projít touto vrstvou až do perivitelinního prostoru mezi zonou a oolemou. Při kontaktu spermie s oolemou se spustí kortikální reakce, což způsobí zablokování receptorů ZP3, čímž dojde k zabránění průchodu dalších spermií přes ZP (Florman a Ducibella, 2006; Ramalho-Santos a kol., 2000). Spermie se k oolemě přikládá hlavičkou ze strany. Jejich plazmatické membrány postupně splývají, až se celá spermie včetně bičíku dostane do cytoplazmy vajíčka. Tím se dokončí meiotický vývoj a vznikne druhé pólóvé tělísko (Makarevič a kol., 2017; Kim a kol., 2008).

Přiblížení membrán spermie a vajíčka je nezbytný proces, který vede k oplození. Účastní se ho velké množství proteinů jak na membráně spermie, tak na oolemě, tedy plazmatické membráně vajíčka. Některé se účastní pouze přiblížení a navázání membrán spermie a vajíčka a další pak v procesu kdy membrány fúzí. Významným objevem byla interakce dvou proteinů Izumo1 a Juno. Izumo1 je protein nacházející se na membráně spermií. Juno se nachází na oolemě. Tyto dva proteiny tvoří vazbu nezbytnou k navázání kapacitovaných spermií, které prošly akrozomovou reakcí. Výzkumy prokázaly, že nepřítomnost těchto proteinů způsobuje neplodnost, a to buď se strany samce nebo ze strany samice, případně od obou (Vondrakova a kol., 2022; Jean a kol., 2018; Bianchi a kol., 2014). Juno je zároveň považováno za protein, jehož nepřítomnost brání polyspermii. Tento protein je poměrně rychle po oplození na membráně oolemy nedetekovatelný. U lidských oocytů je nedetekovatelný již cca 40 minut po oplození. Čímž brání navázání spermií na oolemu a brání tak vniknutí více než jedné spermie do vajíčka. Zatím však nelze průkazně říct, zda Juno pouze opouští interakci s Izumo1 nebo zda opouští i oolemu (Vondrakova a kol., 2022; Bianchi a kol., 2014).

Tato interakce Juno/Izumo1 je typická pro všechny savce včetně vačnatců. Následná fúze membrán je však druhově specifický proces. V roce 2022 vyšla práce od Vondráková a kol., ve které byl identifikován a pojmenován protein, který stojí právě za fúzi membrány spermie a vajíčka. Jedná se o FcRL3 (Fc receptor-like 3), který byl výzkumnou skupinou pojmenován jako MAIA. MAIA se tak považuje za hlavní protein, který umožňuje fúzi membrán. Bylo potvrzeno, že v jeho přítomnosti dochází ke změnám mezi oběma membránami. V přítomnosti MAIA byla Vondráková a kol., (2022) několika metodami prokázána fúze membrán a následný průchod hlavičky spermie přes oolemu. Kromě proteinu Juno a MAIA se mohou navázání a fúze dále účastnit i jiné proteiny, jako jsou tetraspaniny, např. CD9 aj. (Vondráková a kol., 2022). Jedná se o významný objev v oblasti reprodukční biologie, který je velkým přínosem a může vést ke zlepšení metod léčby neplodnosti, ale i jiných odvětví reprodukční biologie.

Z toho vyplývá, že zona pellucida je velmi důležitá při procesu fertilizace, protože selektuje morfologicky normální spermie, indukuje akrozomální reakci a předchází polyspermii (Gupta, 2015; Marco-Jiménez a kol., 2012). Zároveň zprostředkovává komunikaci mezi oocytem a vnějším prostředím přes TZPs (Kidder a Mhawi, 2019).

3.1 *In vitro* fertilization (IVF)

In vitro fertilization neboli oplodnění *in vitro* (IVF) je metoda umělého oplodnění probíhající mimo živý organismus. Jedná se o biotechnologii využívanou především v chovu hospodářských zvířat, v rámci zoologických zahrad a dnes už také běžně v humánní sféře. Tato technologie je široce využívaná pro produkci embryí pro základní výzkum, při chovu hospodářských zvířat a dále například při klonování a transgenezi (genetická modifikace organismů) (Marco-Jiménez a kol., 2012).

ZP hraje významnou roli v metodě IVF. Pro to, aby metoda proběhla úspěšně je potřeba aby oocyt obklopovala neporušená a plně vyvinutá ZP (Edwards, 2007). Neméně důležitá je pro průchod spermií (Makarevič a kol., 2017; Parrish, 2014), a následnému zabránění polyspermii. Její vlastnosti se v průběhu vývoje mění a tím ZP určuje i dobu po jakou je oocyt možné oplodnit spermií, případně dobu, po jakou je možné oplozené vajíčko implantovat do dělohy samice (Makarevič a kol., 2017).

In vitro fertilization (IVF) je metoda umělého oplodnění probíhající mimo tělo organismu. Tato metoda se začala zkoumat již v 19. století. Mezi lety 1878–1953 se několik vědců pokusilo o důkaz a pochopení IVF, mnohá z jejich tvrzení byla následně vyvrácena. Na počátku byly zkoumány organismy jako např. hlístice, mořští živočichové později se začaly zkoumat i savčí skupiny, mezi které patřili například křečci, morčata a králíci (Makarevič a kol., 2017; Yanagimachi, 2012). První, plně provedenou fertilizaci *in vitro*, uskutečnili irští vědci Lu a kol. v roce 1988 (Makarevič a kol., 2017). První narození dítěte tzv. „ze zkumavky“ bylo zaznamenáno roku 1978. Tento úspěch se připisuje britským fyziologům Edwards a Steptoe (Yanagimachi, 2012). V tehdejší Československu se to podařilo o 4 roky později brněnskému kolektivu v čele s profesorem Ladislavem Pilkou (Makarevič a kol., 2017).

Této metodě předchází několik dalších kroků, které jsou nezbytné před samotným oplozením oocytu. Prvním a velice důležitým krokem je výběr vhodných oocytů. Pro IVF je nutné použít jen kvalitní dozrálé oocyty s přítomností kumulárních buněk, homogenní ooplazmou a neporušenou ZP. Tomu předchází hyperstimulace, což je hormonální stimulace vaječníků,

kteřá způsobí vývin více vajíček ve folikulech (Makarevič a kol., 2017; Edwards, 2007). Následuje odebrání oocytů z vaječnicků. To může probíhat různými metodami. Odebrané oocyty pak vždy putují do maturačního media, v němž dochází ke zrání oocytů, které se tak stávají vhodné pro fertilizaci. Toto médium obsahuje folikulostimulační hormon (FSH), který stimuluje růst ovariálních folikulů. Tato fáze se nazývá *in vitro* maturace (IVM) (Makarevič a kol., 2017). Tím jsou oocyty připraveny k oplodnění. Předtím, než k oplodnění dojde, je ale nutné zajistit spermie. Pro metodu IVF se používá buď čerstvé nebo zmrazené sperma. V případě použití čerstvého, je nejprve nutné odebrat dostatečné množství ejakulátu a následně makroskopicky i mikroskopicky zhodnotit jeho kvalitu. Následuje proces kapacitace, tedy dozrávání spermií. Tento proces se provádí jak u čerstvého, tak rozmrazeného spermatu. Při kapacitaci dochází k biochemickým změnám v akrozomální části spermie, tedy na hlavičce. Změny jsou nezbytné k tomu, aby byly spermie následně schopné akrozomální reakce, tedy průchodu přes kumulární buňky, ZP, a nakonec i splynutí s oolemou a proniknutí do oocytu (Makarevič a kol., 2017; Parrish, 2014). Studie ukázaly, že kapacitace spermií z čerstvého ejakulátu je časově náročnější než u rozmrazených spermií z pejet. Naopak byla ale zaznamenána vyšší úspěšnost fertilizace v případech, kdy byly pro oplodnění použity čerstvé dávky ejakulátu (Parrish, 2014).

Poté, co je připraven oocyt i spermie, je třeba provést samotné oplodnění. Životnost neoplozených oocytů je po ovulaci pouhých pár hodin a je proto velmi důležité celý proces správně načasovat. Existují také důkazy, že při stárnutí oocytů dochází ke změnám vlastností ZP a její schopnosti umožnit penetraci spermie do vajíčka, tzv. hardening (Makarevič a kol., 2017). Při procesu, kdy spermie musí překonat bariéry oocytu, docházelo v počátcích výzkumu k velké chybovosti, a proto se hledaly možnosti, jak proces usnadnit a zvýšit jeho úspěšnost. Dnes již běžně využívanou metodou usnadňující průchod spermie přes veškeré bariéry oocytu je intra-cytoplazmatická injekce spermie (ICSI). ICSI umožňuje dopravení jedné konkrétní spermie přímo do oocytu. Spermie se do oocytu vpravuje pomocí mikroinjekce a díky tomu obchází všechny počáteční kroky IVF, tedy průchod spermie přes kumulární buňky, navázání na specifické proteiny ZP, průchod zonou a fúzi s oolemou vajíčka. Využíváním ICSI se úspěšnost oplodnění zvýšila až o 80 % (Makarevič a kol., 2017; Yanagimachi, 2012). Později byla vyvinuta technika IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection), která před samotným ICSI hodnotí morfologii spermie, tak aby byla vybrána ta nejvhodnější. (Makarevič a kol., 2017).

U metody IVF je velmi důležité načasování. Je nutné, aby všechny kroky byly provedeny ve správný čas, jinak se zvyšuje pravděpodobnost neúspěchu. Pro přesnost je nutné znát morfologii a vývojová stádia oocytu i spermií u jednotlivých živočišných druhů. Také znalost molekulárních mechanismů je základem úspěšnosti v IVF, ale také obecně v oblasti reprodukční biologie (Makarevič a kol., 2017). I přesto nastávají chyby v 10–15 % případů umělého oplodnění. Mnoho studií uvádí jako hlavní důvod neúspěšného oplození defekty spermií. Méně časté se pak zdají neúspěchy způsobené abnormálními a nedozrálými oocyty (Marco-Jiménez a kol., 2012; Liu a Baker, 2000). Důležitým krokem je navázání spermie na specifické proteiny ZP (Liu a Baker, 2000). To bylo velkým problémem při IVF, dokud se nezačala využívat ICSI a v posledních letech navíc v kombinaci s IMSI. I přesto však úspěšnost nedosahuje 100 %. Výzkum z roku 2000, provedený Liu a Baker prokázal pozitivní korelaci mezi normální morfologií, dobrou pohyblivostí spermií a úspěšností v navázání a průchodu přes ZP. U párů účastnících se tohoto výzkumu, které měly dlouhodobý problém s fertilizací, bylo procentuálně více případů, kdy selhání IVF způsobila neschopnost spermií navázat se a projít

ZP. U těchto párů bylo nejprve využito běžné metody IVF, kde se úspěšnost fertilizace nijak nezvýšila. Následně byla aplikovaná metoda IVF za využití ICSI. V tomto případě fertilizace proběhla úspěšně u nadpolovičního počtu párů (Liu a Baker, 2000).

Využití metody IVF je velké, a přináší mnoho užitečných informací, jak pro výzkum, tak i pro praxi. Využívá se především pro testování biologických procesů, dále k uchování živočišných genetických zdrojů a v neposlední řadě se využívá v asistované reprodukci u zvířat a lidí. Testování biologických procesů přináší mnoho užitečných informací, jak o celém procesu *in vitro*, tak i o konkrétních látkách, které se procesu účastní. Tyto informace jsou následně využívány k tomu, aby metoda IVF proběhla co nejúspěšněji. Uchování živočišných genetických zdrojů je důležité pro uchování biodiverzity, která aktuálně rychle klesá. Tento pokles je pozorovatelný např. u některých druhů hospodářských zvířat, kde dochází k výrazné genetické selekci a tím se zvyšujícímu inbreedingu (Makarevič a kol., 2017).

3.2 Imunologie – infertilita žen

Faktorů ovlivňujících plodnost u žen je několik. Mezi ty nejčastější patří například hormonální problémy, genetické příčiny, neprůchodnost vejcovodů a také imunitní reakce. Při narušení prostředí, tedy imunologie ovaria dochází k jeho autoimunitnímu poškození. Mezi hlavní příčiny patří hormonální dysbalance. Dále také přímé poškozením tkáně ovaria během *in vitro* fertilizace (Ulčová-Gallová a Madar, 2020).

Výsledkem autoimunitního poškození vaječnicků může být u některých samic snížená plodnost spojená s vysokými hladinami antiovariálních a antizonálních protilátek. Vysoká hladina antiovariálních protilátek je spojena se syndromem předčasného ovariálního selhávání (POF) nebo také s anovulací. Vysoké hodnoty antizonálních protilátek se objevují při opakovaném získávání oocytů z folikulů od živých dárkyň (Ulčová-Gallová a Madar, 2020). Antizonální protilátky mohou bránit správnému splnutí oocytu se spermii (Malíčková, Drahošová, Ulčová-Gallová, Madar, 2020; Shibahara a kol., 2020). Několik studií ze 70. let minulého století prokázalo, vysoké koncentrace těchto látek u mnoha žen, kterým byla prokázána infertilita (Shibahara a kol., 2020; Gupta, 2015). Protilátky se nacházejí na povrchu oocytů a nasedáním na receptory spermií je deformují či maskují, a tak brání jejich interakci se ZP (Malíčková, Drahošová, 2020; Shibahara a kol., 2020). V takovém případě je vhodným řešením právě metoda IVF spolu s ICSI.

To, že je ZP důležitá při fertilizaci, podpořilo zjištění, že mutace v genech kódujících lidské ZP proteiny mohou vézt k abnormalitám ZP, případně jejímu ztenčení či její úplné nepřítomnosti. Mutace také způsobují syndrom prázdného folikulu (EFS). To vše může způsobit selhání při fertilizaci (Gupta, 2023; Moros-Nicolás a kol., 2021). EFS je stav, ke kterému dochází při stimulaci vaječnicků v procesu IVF. I přes zdánlivě normální růst a dozrávání folikulů se v nich nenachází žádná vajíčka. Hormonální hladiny jsou také v normě, nic tedy nenaznačuje abnormální stav (Stevenson a Lashen, 2008). Mutace ZP proteinů u králíků odhalily, že mutace v genu kódující ZP1 mohou ovlivnit nejen uspořádání ZP kolem oocytu, ale také jeho vývoj. Mutace ZP2 vedou k vytváření velmi tenkých ZP případně ZP neobklopujících oocyt, tyto defekty znamenají, že oocyt není vhodný pro IVF metodu a je tedy třeba zvolit jiný postup. ZP3 mutace vedou k EFS. Méně časté se pak zdají mutace genů ZP4 (Moros-Nicolás a kol., 2021).

3.3 Hardening

ZP je charakterizována jako elastický vícevrstevný obal oocyty. Její mechanické vlastnosti se však mohou časem měnit. Hardening neboli tvrdnutí, je proces, při kterém dochází ke změně ve struktuře ZP. Jde o přirozený proces, ke kterému dochází po oplodnění oocyty spermií. Slouží k tomu, aby následně zabránil polyspermii, aby chránil vzniklé embryo až do doby, než bezpečně projde vejcovody a dojde k tzv. hatchingu (Wang a kol., 2021; De Vos a Van Steirteghem, 2000). A v případě organismů s vnějším vývojem embrya, slouží především jako ochrana proti vnějším vlivům prostředí. Jedná se o velice důležitou vlastnost ZP, která zvyšuje šance na přežití. Je velmi důležitá, jak u živorodých taxonů, tak u těch, kteří kladou vejce do vodního prostředí (ryby a obojživelníci). Pro tyto organismy s vnějším vývojem embrya je hardening zásadní pro jejich přežití. Tuhnutím ZP je udržováno vnitřní prostředí, tedy především tlak a voda. Dále ochrana před nástrahami vodního prostředí. Přes zonu probíhá také difúze a výměna plynů. Navíc chrání embryo před bakteriemi, ale má i mnoho dalších velmi důležitých funkcí. Toto je typické především pro ryby, obojživelníky a mořské ježky, jejichž způsob vnějšího vývoje vyžaduje více funkcí vajíčka než u těch s vnitřním vývojem embrya (Wang a kol., 2021).

Ke změnám dochází hned po oplození. Oocyt uvolňuje obsah svých kortikálních granulí, které se nacházejí pod plazmatickou membránou oocyty (Papi a kol., 2010). Tento proces se nazývá kortikální reakce a jeho výsledkem je změna mechanických vlastností ZP (De Vos a Van Steirteghem, 2000). Změny, které v této souvislosti probíhají, jsou výsledkem působení enzymů. Změny zahrnují například štěpení ZP2, což je protein, který pomáhá spermii při přichycení k ZP. Bez tohoto proteinu se spermie nejsou schopny přichytit k zoně a úspěšně projít skrz (Papi a kol., 2010). V případě ryb pak dochází k zabránění průchodu spermií skrz mikropyle. (Wang a kol., 2021). Dále dochází k oddálení ZP od povrchu oocyty. Takže i kdyby se některá ze spermií dostala přes ZP, nebyla by schopná dosáhnout povrchu oocyty a nedošlo by ke splynutí plazmatických membrán (Papi a kol., 2010). Podrobně popisuje změny ve své práci Wang a kol. (2021), kteří uvádějí 4 možné biochemické procesy, které se na hardeningu podílejí. Prvním z nich je proces, který zmiňuje většina prací, která se hardeningem zabývá. Jedná se o štěpení ZP2 pomocí ovascatin proteázy. Dalším je deglykosylace ZP3 případně jiných ZP podjednotek zodpovědných za navázání kapacitovaných spermií a umožnění jejich průchodu přes ZP. Zesíťování glykanu způsobené lektinem tzv. cross-linking. A jako poslední proces uvádí začlenění iontů zinku do ZP (Wang a kol., 2021).

Tyto změny ve struktuře ZP byly pozorovány několika autory na myších, křečcích, prasatech skotu (Papi a kol., 2010) ale také u humánních ZP. Jedná se tedy o proces, který probíhá u všech savců, jejichž vajíčko je chráněno ZP. Změny jsou pozorovatelné i na povrchu ZP, která tuhnutím mění charakter. Tuhnutím je v tomto procesu myšleno nejen skutečné ztuhnutí, ale také zvýšení odolnosti ZP vůči proteolytickému štěpení. Snímky z mikroskopických pozorování potvrzují, že ZP při hardeningu ztrácí charakter uspořádaných fibril. ZP která prošla tímto procesem je tedy složena převážně z husté sítě náhodně uspořádaných svazků fibril. Výsledkem je nerovnoměrný povrch ZP, ale také změna ve vnitřním složení fibril. To vše ve výsledku znemožňuje průchod spermiím a chrání embryo při jeho následném vývoji (De Vos a Van Steirteghem, 2000).

Hardening je přirozený proces nastávající pro oplození. Může být však indukován i dlouhou kultivací *in vitro* či *in vitro* stárnutím. Tyto procesy jsou využívány při mimotělním oplození.

Mohou mít negativní vliv na úspěšnost například metody IVF. Po oplození oocyty dochází postupně ke ztenčování ZP. Toto ztenčení není rovnoměrné a je velice důležité při následném hatchingu. V některých případech se při IVF stává, že k ztenčování zony nedojde a ta je před implantací do dělohy stále relativně tlustá. Tento stav narušuje přirozený proces hatchingu a může vézt i k úplnému znemožnění implantace vajíčka do dělohy (De Vos a Van Steirteghem, 2000). Jedná se o poměrně častou příčinu neúspěchů, a proto je hardeningu v posledních letech věnována větší pozornost.

3.4 Asistovaný hatching

Asistovaný hatching (AH) je mikrochirurgický zákrok prováděný při umělém oplodnění. Tato metoda usnadňuje otevření ochranného obalu embrya, tedy ZP. AH je prováděn velmi jemnou mikrojehlou či laserem. V některých případech se vrstva narušuje i chemickou cestou, to však není příliš časté. Tento proces je prováděn těsně před transferem embrya do dělohy samice. Technika zvyšuje šance na otěhotnění (Alteri a kol., 2018; Hammadeh a kol., 2011; De Vos a Van Steirteghem, 2000). Často se provádí v kombinaci s metodou IVF s využitím ICSI.

Při této technice je do ZP vytvořen malý otvor. Jeho velikost je závislá od druhu, na jehož ZP se otvor vytváří. Například u myších ZP musí být velikost otvoru nad 10 μm , menší otvory narušují správný hatching. Kdežto například u skotu otvory menší než 40 μm jsou z pravidla při uchycení embrya do dělohy mnohem úspěšnější (Alteri a kol., 2018).

Nejde však pouze o mechanické narušení obalu pomocí laseru či mikromanipulátorů, ale také o metody, které napomáhají úspěšnému hatchingu za použití například proteináz. Jde o metody, které ZP ztenčují či narušují tak aby z ní následně embryo snáze vystoupilo (Hammadeh a kol., 2011; De Vos a Van Steirteghem, 2000). Velmi využívanou je právě metoda ztenčení a přirozeného hatchingu. Ta má několik výhod, především předchází rizikům spojeným se změnami v pružnosti vrstvy či štěpení embryí a vzniku monozygotických dvojčat (Alteri a kol., 2018; Hammadeh a kol., 2011). Dnes již existují pochybnosti o výhodách ztenčení, naopak přibývá podkladů, které popisují pozitivní nárůst případů, kdy byla implantace embrya úspěšná právě díky asistovanému hatchingu který plně prolomuje ochranný obal pomocí laseru či mikromanipulátorů (Alteri a kol., 2018).

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování rešerše shrnující současné poznatky o stavbě vrstvy zona pellucida. První kapitola shrnuje poznatky o jejím vzniku v období před oplozením. Dále strukturu, kterou utváří fibrily a především glykoproteiny, které jsou důležité při oplození oocyty spermii. Kromě významu při oplození a bezprostředně před ním kapitola zmiňuje i jiné neméně důležité funkce jako například role při zabránění polyspermii apod. Součástí této kapitoly je i shrnutí poznatků o dalších vrstvách – corona radiata a kumulární buňky.

Druhá kapitola porovnává vlastnosti a strukturu ZP u různých živočišných druhů. Zahrnuje popis velkých skupin živočichů, jakými jsou paryby, ryby, obojživelníci, plazi, ptáci a savci. V rámci savců tato práce zahrnuje rozdíly v přítomnosti glykoproteinů a rozdíly v jejich funkcích.

Ve třetí kapitole je popsán přirozený proces oplození a také metody mimotělního oplození tzv. IVF. Kromě základního popisu této metody jsou popsány i rizika, která sebou metoda nese. Dále také techniky, kterými se úspěšnost procesu oplození zvyšuje v podmínkách *in vitro*.

Napříč organismy, u kterých se ZP vyskytuje lze pozorovat jisté podobnosti, ale také rozdíly. U některých není znám jejich evoluční vývoj u jiných je naopak evoluce zjevná při větvení některých taxonů. Lze pozorovat, že funkce některých komponent ZP se v historii osvědčily a přetrvávají proto dodnes i u těch evolučně nejmladších taxonů. Naopak komponenty jejichž funkce byla nahraditelná, či v případě některých taxonů postradatelná byly vyřazeny nebo nahrazeny jinými. Postradatelnost některých funkcí proteinů je způsobena rozdíly v prostředí, které taxony obývají a také stylem života, který je pro ně typický. To vše ukazuje důležitost přítomnosti ZP jejích komponent a na jejich nepostradatelnost.

Tato práce slouží jako souhrn informací dostupných o ZP. Poukazuje na důležitost této struktury, velké množství funkcí, které plní, ale také shrnuje užitečné informace využitelné v mnoha oblastech reprodukční biologie.

Literatura:

- Alteri, A., Viganò, P., Maizar, A. A., Jovine, L., Giacomini, E., Rubino, P. (2018): Revisiting embryo assisted hatching approaches: a systematic review of the current protocols, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35, 367 – 391.
- Anderson, E., Albertini, D. F. (1976): Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary, *Journal of cell biology*, 71, 680 – 686.
- Andreuccetti, P., Carrera, M. (1987): The differentiation of the Zona Pellucida (Vitelline envelope) in the Lizard *Terentola mauritanica*, *Development, Growth and differentiation*, 29, 113 – 122.
- Baena, V. a Terasaki, M. (2019): Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle, *Scientific reports*, 9, 1262.
- Bani-Yaghoub, M., Underhill TM and Naus CCG (1999): Gap junction blockage interferes with neuronal and astroglial differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells, *Developmental genetics*, 24, 69 – 81.
- Bani-Yaghoub, M., Bechberger, J. F., Underhill TM and Naus CCG (1999): The effect of gap junction blockage on neuronal differentiation of human, *Experimental neurology*, 156, 16 – 32.
- Bedford, J. M. (1983): Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals, *Biology of reproduction*, 28, 108 – 120.
- Bellairs, R., Harkness, M., Harkness, R. D. (1963): The vitelline membrane of the hen's egg: a chemical and electron microscopical study, *Journal of ultrastructure research*, 8, 339 – 359.
- Bertrand, E., Van den Bergh, M., Englert, Y. (1995): Fertilization and early embryology: Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human reproduction*, 10, 1189 – 1193.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G. J. (2014): Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization, *Nature*, 508, 483 – 487.
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. (1980): Structure and Function of the Zona Pellucida: Identification and Characterization of the Proteins of the Mouse Oocyte's Zona Pellucida, *Developmental biology*, 76, 185 – 202.
- Bokhove, M., Jovine, L. (2018): Structure of Zona Pellucida Module Proteins, *Current topics in developmental biology*, 130, 413 – 442.
- Bronson, R. A., McLaren, A. (1970): Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida, *Journal of reproduction and fertility*, 22, 129 – 137.
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Wimalasena, J., Ayla, M. E., Dominguez, R. (2005): Oogenesis in adult mammals, including humans, *Endocrine*, 26(3), 301 – 316.
- Cogger, H. G., Zweifel, R. G. (1998): *Encyclopedia of reptiles and amphibians*, 2. vydání, San Diego California: Academic press, ISBN: 0-12-178560-2.
- Collado-Fernandez, E., Picton, H. M., Dumollard, R. (2012): Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals, *The internal journal of developmental biology*, 56, 799 – 808.

- Conner, S. J., Hughes, D. C. (2003): Analysis of fish ZP1/ZPBA homologous genes – evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution, *Reproduction*, 126, 347 – 352.
- Damaziak, K., Marzec, A., Kieliszek, M., Buclaw, M., Michalczyk, M., Niemiec, J. (2018): Comparative analysis of structure and strength of vitelline membrane and physical parameters of yolk of ostrich, emu, and greater rhea eggs, *Poultry science*, 97, 1032 – 1040.
- De Vos, A., Van Steirteghem, A. (2000): Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction, *Cell tissues organs*, 166, 220 – 227.
- Díaz-Fontdevila, M., Pommer, R., Smith, R. (2009): Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility, *Fertility and sterility*, 91(5), 2061 – 2068.
- Dziewulska, K., Dolmagała, J. (2009): Ripening of the oocyte of the river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) after river entry, *Journal of applied ichthyology*, 25, 752 – 756.
- Eckelbarger, K. J. (2005): Oogenesis and oocytes, *Hydrobiologia*, 535, 179 – 198.
- Edwards, B. (2007): IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF – time for a rethink, *Reproductive biomedicine online*, 15(1), 106 – 119.
- Eppig, J. J. (1991): Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells, *Bioessays*, 13, 569 – 574.
- Eppig, J. J. (2001): Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals, *Reproduction*, 122, 829 – 838.
- Eppig, K. J., O'Brien, M. (1996): Mammalian oocyte growth and development on vitro, *Molecular reproduction and development*, 44, 260 – 273.
- Fagbohun, C. F., Downs, S. M. (1991): Metabolic coupling and ligand-stimulated meiotic maturation in the mouse oocyte-cumulus cell complex, *Biology of reproduction*, 45, 851 – 859.
- Familiari, G., Relucenti, H., Heyn, R., Micara, G., Correr, S. (2006): Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation, *Microscopy research and technique*, 69, 415 – 426.
- Feng, J. M., Tian, H. F., Hu, Q. M., Meng, Y., Xiao, H. B. (2018): Evolution and multiple origins of zona pellucida genes in vertebrates, *The company of biologists*, 7, 1 – 10.
- Fléchon, J., Kopečný, V., Pivko, J., Pavlok, A., Motlik, J. (2004): Texture of the zona pellucida of the mature pig oocyte. The mammalian egg envelope revisited, *Reproduction nutrition development*, 44, 207 – 218.
- Florman, H. M., Ducibella, T. (2006): Chapter 2: Fertilization in Mammals, Knobil and Neill's *Physiology of reproduction*, 55 – 94.
- Friedman, M., Brazeau, M. D. (2010): A reappraisal of the origin and basal radiation of the Osteichthyes, *Journal of vertebrate paleontology*, 30, 36 – 56.
- Fusco, G., Minelli, A. (2019): *The Biology of Reproduction*, Cambridge University Press, ISBN: 978-1-108-73171-3.
- Galíndez, E. J., Díaz Andrade, M., Estecondo, S. (2014): Morphological indicators of initial reproductive commitment in *Mustelus schmitti* (Springer 1939) (*Chondrichthyes, Triakidae*):

folliculogenesis and ovarian structure over the life cycle, *Brazilian journal of biology*, 74, 154 – 163.

Ganguly, A., Sharma, S. K., Gupta, S. K. (2008): Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins, *Molecular reproduction and development*, 75, 156 – 166.

Geisler, J., Zima, J. (2018): *Zoologie obratlovců*, 3. vydání, Praha: Academia, 216 – 228, ISBN: 978-80-200-2702-3.

Geneser, F. (1986): *Textbook of Histology*, Copenhagen, Munksgaard, ISBN: 87-16-09696-7.

Green, D. P. (1997): Three-dimensional structure of the zona pellucida, *Reviews of reproduction*, 2, 147 – 156.

Gupta, S. K. (2023): Zona pellucida glycoproteins: Relevance in fertility and development of contraceptive vaccines, *American journal of reproductive immunology*, 89, 1 – 11.

Gupta, S. K. (2015): Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans, *Journal of reproductive immunology*, 108, 90 – 97.

Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S., Gupta, N. (2012): Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization, *Cell and tissue research*, 349, 665 – 678.

Hammadeh, M. E., Fischer-Hammadeh, C., Ali, K. R. (2011): Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28, 119 – 128.

Hamlett, W. C. (2005): *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids, and Chimaeras*, CRC press, 3. vydání.

Hasegawa, A., Kanazawa, N., Sawai, H., Komori, S., Koyama, K. (2006): Pig zona pellucida 2 (pZP2) protein does not participate in zona pellucida formation in transgenic mice, *Society for reproduction and fertility*, 132, 455 – 464.

Hastings, R. A., Enders, A. C., Schlafke, S. (1972): Permeability of the zona pellucida to rprotein tracers, *Biology of reproduction*, 7, 299 – 296.

Hedrick, J. L. (2008): *Anura* and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development, *The International Journal of developmental biology*, 52, 683 – 701.

Heinicke, M. P., Naylor, J. P., Hedges, S. B. (2009): *The Timetree of Life: Cartilaginous fishes (Chondrichthyes)*, Oxford university press, 320 – 327.

Hoodbhoy, T., Joshi, S., Boja, E. S., Williams, A., Stanley, P., Dean, J. (2005): Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins, *The journal of biological chemistry*, 280(13), 12721 – 12731.

Izquierdo-Rico M. J., Jimenez-Movilla M., Llop, E., Perez-Oliva A. B., Ballesta, J., Gutierrez-Gallego, R., Jimenez-Cervantes, C., Aviles, M. (2009): Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4, *Journal of proteome research*, 8, 926 – 941.

Jean, C., Haghghirad, F., Zhu, Y., Chalbi, M., Ziyat, A., Rubinstein, E., Gourier, C., Yip, P., Wolf, J. P., Lee, J. E., Boucheix, C., Barraud-Lange, V. (2018): JUNO, the receptor of sperm

IZUMO1, is expressed by the human oocyte and is essential for human fertilisation, *Human reproduction*, 1 – 9.

Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (2005): Zona Pellucida Domain Proteins, *Annual review of biochemistry*, 74, 83 – 114.

Jovine, L., Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (2002): Egg zona pellucida, egg vitelline envelope, and related extracellular glycoproteins, *Advances in developmental biology and biochemistry*, 12, 31 – 54.

Jørgen M. J., Lomholt, J. P., Weber, R. E., Malte, H. (2012): *The Biology of Hagfishes*, Springer dordrecht, ISBN: 978-94-010-5834-3.

Kidder, G., Mhawi, A. A. (2002): Gap junctions and ovarian folliculogenesis, *Reproduction*, 123, 613 – 320.

Kim, E., Yamashite, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S. I., Baba, T. (2008): Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida, *The International Journal of developmental biology*, 52, 677 – 682.

Korwin-Kossakowski, M. (2011): Fish hatching strategies: a review, *Reviews in fish biology and fisheries*, 22, 225 – 240.

Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (2020): Zona Pellucida Proteins, Fibrils, and Matrix. *Annual review of biochemistry*, 89, 695 – 715.

Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (2018): The Fish Egg's Zona Pellucida, *Current Topics in Developmental biology*, 130, 275 – 305.

Liu, D. Y., Baker, H. W. G. (2000): Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization, *Human reproduction*, 15 (3), 702 – 708.

Mann, K. (2008): Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane, *Proteomics*, 8(11), 2322 – 2332.

Marco-Jiménez, F., Naturil-Alfonso, C., Jiménez-Trigos, E., Lavara, R., Vicente, J. S. (2012): Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth, *Animal reproduction science*, 132, 96 – 100.

Martin, K. L. M. (1999): Ready and waiting: Delayed hatching and extended incubation of anamniotic vertebrate terrestrial eggs, *American zoologist*, 39, 279 – 288.

McLaren, A. (1969): Transfer of zona-free mouse eggs to uterine foster mothers, *Journal of reproduction and fertility*, 19, 341 – 346.

Modliński, J. A. (1970): The role of the zona pellucida in the development of mouse egg in vivo, *Journal of embryology and experimental morphology*, 23, 539 – 547.

Moros-Nicolás, C., Chevret, P., Jiménez-Movilla, M., Algarra, B., Cots-Rodríguez, P., González-Brusi, L., Avilés, M., Izquierdo-Rico, J. M. (2021): New Insights into the Mammalian Egg Zona Pellucida, *International journal of molecular sciences*, 22, 1 – 20.

Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., Holstein-Rathlou, N. H. (2012): Gap Junctions, *Comprehensive physiology*, 2, 1 – 105.

- Nokhbatolfoghahai, M., Downie, J. R. (2007): Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans, *Tissue and cell*, 39, 225 – 240.
- Oielska, M. (2009): *Reproduction of Amphibians*, USA: Science Publisher, ISBN: 978-1-57808-307-7.
- Orsini, M. W., McLaren, A. (1967): Loss of the zona pellucida in mice, and the effect of tubal ligation and ovariectomy, *Journal of reproduction and fertility*, 13, 485 – 499.
- Quesada, V., Sánchez, L. M., Álvarez, J., López-Otín, C. (2019): Withdrawal: Identification and characterization of human and mouse ovastacin: A novel metalloproteinase similar to hatching enzymes from arthropods, birds, amphibians, and fish, *Journal of biological chemistry*, 294, 26627 – 26634.
- Papi, M., Brunelli, R., Sylla, L., Parasassi, T., Monaci, M., Maulucci, G., Missori, M., Arcovito, G., Ursini, F., De Spirito, M. (2010): Mechanical properties of zona pellucida hardening, *European biophysics journal*, 39, 987 – 992.
- Parrish, J. J. (2014): Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin, *Theriogenology*, 67 – 73.
- Rahman, M. A. (2013): An introduction to morphology of the reproductive system and anatomy of hen's egg, *Journal of life and earth science*, 8, 1 – 10.
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R. D., Sutovsky, P., Chan, A. W. S., Hewitson, L., Wessel, G. M., Simerly, C. R., Schatten, G. (2000): SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization, *Developmental biology*, 223, 54 – 69.
- Sano, K., Shimada, S., Mibu, H., Taguchi, M., Ohsawa, T., Kawaguchi, M., Yasumasu, S. (2022): Lineage-specific evolution of zona pellucida genes in fish, *Journal of experimental zoology. Part B. Molecular and developmental evolution*, 338, 181 – 191.
- Schreier, A. D., Van Eenennaam, J. P., Anders, P., Young, S., Crossman, J. (2021): Spontaneous autopolyploidy in the Acipenseriformes, with recommendation for management, *Reviews in fish biology and fisheries*, 31, 159 – 180.
- Sito, H., Saito, T., Kaneko, T., Sasagawa, I., Kuramoto, T., Hiroi, M. (2000): relatively poor oocyte quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection, *Fertility and sterility*, 73, 465 – 469.
- Smith, J., Paton, I. R., Hughes, D. C., Burt, D. W. (2005): Isolation and mapping the chicken zona pellucida genes: An insight into the evolution of orthologous genes in different species, *Molecular reproduction and development*, 70, 133 – 145.
- Spargo, S. C., Hope, R. M. (2003): Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family, *Biology of reproduction*, 68, 358 – 362.
- Stevenson, T. L., Lashen, H. (2008): Empty follicle syndrome: the reality of a controversial syndrome, a systematic review, *Fertility and sterility*, 90, 691 – 698.
- Sutovsky, P. (2009): Sperm-egg adhesion and fusion in mammals, *Expert reviews in molecular medicine*, 1 – 12.
- Tarkowski, A. K. (1961): Mouse chimaeras developed from fused eggs, *Nature*, 190, 857 – 860.

- Thompson, A. W., Furness, A. I., Stone, C., Rade, C. M., Ortí, G. (2017): Microanatomical diversification of the zona pellucida in aplochelioid killifishes, *Journal of fish biology*, 91, 126 – 143.
- Ulčová-Gallová, Z., Madar, J., Coufal, Š., Drahošová, M., Holáň, V., Kestlerová, A., Kokešová, A., Kverka, M., Malíčková, K., Městecký, J., Nováková, D., Novotná, B., Pěknicová, J., Tlaskalová-Hogenová, H. (2020): *Imunologie a imunopatologie lidské reprodukce: vybrané kapitoly, 2. přepracované a doplněné vydání*, Maxford, Jessenius, ISBN: 978-80-7345-648-1.
- Vieira, S., de Pérez, G. R., Ramírez-Pinilla, M. P. (2010): Ultrastructure of the ovarian follicles in the placentotrophic Andean lizard of the genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae), *Journal of morphology*, 271, 738 – 749.
- Vondrakova, J., Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., Simonik, O., Nahacka, Z., Basus, K., Valaskova, E., Machan, R., Pacey, A., Holubcova, Z., Koubek, P., Ezrova, Z., Park, S., Liu, R., Partha, R., Clark, N., Neuzil, J., Ikawa, M., Erickson, K., Lam, K., S., Moore, H., Komrskova, K. (2022): MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization, *Science advances*, 8 (36), 1 – 16.
- Wang, Y., Chen, F. He. J., Xue, G., Chen, J., Xie, P. (2021): Cellular and molecular modification of egg envelope hardening in fertilization, *Biochimie*, 181, 134 – 144.
- Wassarman, P. M., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E. S., Liu, Ch. Qi H., Williams, Z. (1999): Structure and Function of the Mammalian Egg Zona Pellucida, *Journal of experimental zoology*, 285, 251 – 258.
- Wassarman, P. M., Josefowicz W. J. (1978): Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *Journal of morphology*, 156, 209 – 235.
- Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S. (2001): A profile of fertilization in mammals, *Nature cell biology*, 3, 56 – 64.
- Wassarman, P. M. Jovine, L., Litscher, E., S. (2004): Mouse zona pellucida genes and glycoproteins, *Genome in development and cloning*, 105, 228 – 234.
- Wassarman, P. M., Litscher, E. S. (2022): Female fertility and the zona pellucida, *Cell biology*, 1 – 10.
- Wassarman, P. M., Litscher, E. S. (2018): The Mouse Egg's Zona Pellucida, *Current topics in developmental biology*, 130, 331 – 356.
- Wassarman, P. M., Litscher, E. S. (2012): Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility, *The internal journal of developmental biology*, 56, 833 – 839.
- Xia, P., Chan, C. L. K. (2018): Cumulus cells and their associations with immune functions, *Reproductive and developmental medicine*, 2, 59 – 63.
- Yamagami, K. (1981): Mechanisms of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzyme choriolysis, *American zoologist*, 21, 459 – 471.
- Yanagimachi, R. (2012): Fertilization Studies and Assisted Fertilization in Mammals: Their Development and Future, *Journal of reproduction and development*, 58(1), 25 – 32.

Young., J. Z. (1962): The life of vertebrates, 2. vydání New York: Oxford University Press, 81 – 84.

Zhao, W., Zhang, X., Jia, G., Shen, Y., Zhu., M. (2021): The silurian-devonian boundary in East Yunnan (South China) and the minimum constraint for the lungfish-tetrapod split, Science china earth sciences, 64, 1784 – 1797.

Internetové zdroje:

Singh, R., P., Froning. G., W. (2023): Egg: Structure and composition, (online), (cit. 2023-03-23), dostupné z: <https://www.britannica.com/topic/egg-food>.