

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv donoru oxidu uhelnatého CORM-A1 na stárnutí
prasečích oocytů**

Diplomová práce

**Bc. Kristýna Hejdánková
Reprodukční biotechnologie**

Vedoucí práce: Ing. David Němeček

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci "Vliv donoru oxidu uhelnatého CORM-A1 na stárnutí prasečích oocytů" vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Davidu Němečkovi, Ph.D. za odborné rady při vytváření této práce, dále velký dík patří mé rodině a mým přátelům, kteří mě po dobu studia podporovali a stáli při mně.

Vliv donoru oxidu uhelnatého CORM-A1 na stárnutí prasečích oocytů

Souhrn

Základem úspěchu v oblasti reprodukčních biotechnologií a asistované reprodukce je vysoká kvalita oocytů. Při práci v *in vitro* prostředí jsou oocyty vystavovány nepřírodným podmínkám, které na oocyty působí (např. stresové faktory) a snižují tak jejich kvalitu. V současné době není možné přesně napodobit přirozené prostředí *in vivo*, a proto se věda zabývá výzkumem metod, díky kterým by mohla být kvalita oocytů zachována nebo zpětně obnovena. Mezi nejvýznamnější stresové činitele při manipulaci s oocyty v *in vitro* podmínkách patří zvýšená produkce reaktivních kyslíkových sloučenin a s ní spojený oxidativní stres. Přidání antioxidantů do kultivačního média by mohlo omezit působení oxidativního stresu a zabránit snížení kvality.

V somatických buňkách se enzym hemoxygenáza (HO) vyskytuje ve dvou izoformách, HO-1 a HO-2. Hemoxygenáza je zodpovědná za katabolický rozklad hemu na biliverdin a oxid uhelnatý, které jsou známé pro své antioxidační a antiapoptotické vlastnosti. Hlavní úlohou HO-1 je cytoprotekce buněk jako reakce na vystavení stresovým faktorům. HO-2 je zodpovědná za udržení bazální enzymatické aktivity. Naším experimentem jsme potvrdili přítomnost obou izoform v cytoplazmě stárnoucích prasečích oocytů a také jsme prokázali zvyšující se expresi obou izoform v průběhu stárnutí. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že zvyšující se exprese HO-1 a HO-2 může souviset s postupně se zvyšující snahou chránit buňku před účinky stárnutí oocytů a současnou potřebou produkce CO při ochraně buňky před buněčnou smrtí.

Kvalita oocytů může také být pozitivně ovlivněna úpravou signálních drah za použití gasotransmíterů. Jednou z takových látek je oxid uhelnatý, který svými antioxidačními a antiapoptotickými účinky dokáže řídit kvalitu somatických buněk. Z těchto důvodů jsme se v našem experimentu zaměřili na vliv donoru oxidu uhelnatého (CORM-A1) na proces stárnutí prasečích oocytů. Během *in vitro* stárnutí jsme posuzovali morfologické změny oocytů a míru aktivace kaspázy-3 jako markeru zahájení apoptózy. Zjistili jsme, že při kultivaci stárnoucích oocytů v kultivačním médiu obsahujícím CORM-A1 dochází ke snížení počtu apoptotických oocytů a k současnému zvýšení počtu intaktních oocytů. Také jsme prokázali schopnost CORM-A1 snižovat míru aktivace kaspázy-3. Z výsledků tohoto experimentu usuzujeme,

že použitím CORM-A1 jako přídavku do kultivačního média stárnoucích oocytů mohou být následky stárnutí oocytů zmírněny a být tak zvýšena jejich kvalita a potažmo životaschopnost.

Klíčová slova: apoptóza, oxid uhelnatý, stárnutí oocytů, hemoxygenáza, CORM-A1

Effect of carbon monoxide donor CORM-A1 on the porcine oocyte aging

Summary

The key to success in the reproduction biotechnology and assisted reproductive technology field is having high-quality oocytes. During the manipulation in the *in vitro* environment oocytes face unnatural conditions, which act as stress factors and decrease the oocytes quality. At this time, it is not possible to precisely simulate the natural *in vivo* environment, and thus the science focuses on the research of methods that would keep or restore the quality of the oocytes. One of the most significant stressors during the manipulation of the oocytes in *in vitro* conditions is higher reactive oxygen species production and related oxidative stress. The oxidative stress could be reduced, and the quality of the oocytes could be restored by adding the antioxidants to the culture medium.

The heme oxygenase enzyme occurs in somatic cells in two isoforms, HO-1 and HO-2. Heme oxygenase is responsible for the catabolic decomposition of heme into biliverdin and carbon monoxide, which are known for their antioxidant and antiapoptotic features. The main role of HO-1 is protection of the cell as a reaction to stress factor exposure. In our experiment we confirmed that both isoforms are present in the cytoplasm of the porcine aging oocytes and we also proved the increasing HO-1 and HO-2 expression during the aging process. Based on these results we assume that the raising HO-1 and HO-2 expression can reflect the gradually increasing cell protection potential against the aging effects and the increasing need of CO production for the antiapoptotic cell protection.

The quality of the oocytes can be positively affected by changing the signal pathways with the use of gasotransmitters. One of such substances is carbon monoxide which can by its antioxidant and antiapoptotic effects control the quality of somatic cells. For these reasons, in our experiment, we focused on the effect of the carbon monoxide donor (CORM-A1) on the aging process of porcine oocytes. During the *in vitro* aging we evaluated the morphological changes of the oocytes and the level of caspase-3 activation as a marker of the apoptosis initiation. We found that when the porcine aging oocytes are cultivated in the culture medium containing the CORM-A1, it leads to a decrease in the number of apoptotic oocytes and to an increase in the number of intact oocytes. We also proved the ability of CORM-A1 to decrease the capacity of the caspase-3 activation. From the results of this experiment we assume that by using CORM-A1 as a culture medium supplement for the aging oocytes,

the after-effects of the oocyte aging can be reduced, and their quality and viability can be increased.

Keywords: apoptosis, carbon monoxide, oocyte aging, heme oxygenase, CORM-A1

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Oogeneze a folikulogeneze	12
3.1.1	Vznik zárodečných buněk, fáze množení	12
3.1.2	Meiotické dělení a vývin samičích pohlavních buněk	12
3.1.3	Formace primordiálních folikulů	14
3.1.4	Fáze folikulárního růstu a vývoje.....	14
3.1.5	Růst antrálních folikulů	16
3.2	Zrání oocytů	18
3.2.1	Jaderné zrání	18
3.2.1.1	Získání meiotické kompetence a znovuzahájení meiotické aktivity	19
3.2.1.2	Utvoření meiotického aparátu.....	20
3.2.2	Cytoplazmatické zrání	22
3.2.2.1	Úloha mitochondrií při cytoplazmatickém zrání	22
3.2.2.2	Migrace mitochondrií v prasečích oocytech.....	23
3.2.2.3	Vývojová kompetence oocytů	24
3.3	Kvalita oocytů	24
3.3.1	Vnitřní vlivy.....	24
3.3.2	Vnější vlivy.....	26
3.4	Ovulace oocytů	27
3.4.1	Preovulační expanze kumulárního obalu.....	27
3.4.2	Ovulace oocytů	28
3.5	Oplození oocytů	29
3.6	Stárnutí oocytů	31
3.6.1	Funkční příčiny stárnutí oocytů	35
3.6.1.1	Kumulární buňky	35
3.6.1.2	Mitochondriální dysfunkce.....	35
3.6.2	Molekulární příčiny stárnutí oocytů	36
3.6.2.1	MPF, MAP kináza	36
3.6.2.2	Oxidativní stres.....	37
3.7	Hemoxygenáza	38
3.8	Oxid uhelnatý, signální dráha HO/CO	41
3.8.1	CORM-A1	42
4	Metodika	45
4.1	Odběr, kultivace a stárnutí prasečích oocytů v <i>in vitro</i> podmínkách	45

4.2	Sledování míry exprese a buněčná lokalizace enzymů HO-1 a HO-2 a aktivované kaspázy-3 v prasečích oocytech	45
4.3	Hodnocení <i>in vitro</i> stárnutí prasečích oocytů v přítomnosti donoru oxidu uhelnatého CORM-A1	46
4.4	Statistické hodnocení.....	46
4.5	Experimentální schéma.....	46
5	Výsledky.....	48
5.1	Míra exprese a buněčná lokalizace enzymů HO-1 a HO-2 v prasečích oocytech	48
5.2	Vliv donoru CO na morfologické znaky stárnutí prasečích oocytů stárnoucích po dobu 24, 48 a 72 hodin	50
5.3	Vliv donoru CO na aktivaci kaspázy-3 během stárnutí prasečích oocytů po dobu 24, 48 a 72 hodin	52
6	Diskuze	54
7	Závěr	58
8	Literatura.....	59
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie zvířat byly v posledních několika desítkách let velmi důležité a vývoj efektivních procedur pro asistovanou reprodukci u hospodářských zvířat vytvořil mnoho příležitostí pro komercializaci. Vývoj efektivních reprodukčních biotechnologií je ve zvyšující se míře požadován u prasat, jelikož je to nejen důležité hospodářské zvíře, ale také modelový živočich pro výzkum lidských onemocnění, produkci léčiv a xenotransplantaci orgánů. Před téměř 20 lety se podařilo vytvořit první klony ze somatických buněk prasat a první geneticky modifikované prase metodou *gene knock out*. Nicméně úspěšnost těchto metod je stále velmi nízká. Přestože jsou některé z těchto reprodukčních metod používány k produkci embryí v podmínkách *in vitro*, kvalita těchto embryí je nižší než kvalita embryí vytvořených v *in vivo* podmínkách. Při manipulaci s oocyty v *in vitro* podmínkách jsou buňky oproti přirozenému prostředí samičího reprodukčního traktu vystaveny nepříznivým podmínkám, jako je například odlišná teplota, světlo či přístup kyslíku. Tyto faktory mohou v oocytech vyvolávat změny ovlivňující jejich kvalitu a budoucí vývoj či způsobit buněčnou smrt oocytů – apoptózu. Mezi hlavní problémy při produkci embryí v *in vitro* podmínkách patří například abnormální zrání oocytů či postovulační stárnutí oocytů, ke kterému zpravidla dochází následkem nesprávně načasovaného oplození. Oocyty, které nejsou oplozeny, nebo jsou např. v případě prasnice oplozeny po více než 10 hodinách po ovulaci, začnou procházet buněčnými, biochemickými a molekulárními změnami a dochází tak ke zhoršení jejich kvality a snížení vývojového potenciálu. Mezi klinické následky stárnutí oocytů patří produkce embryí nízké kvality, zvýšení pravděpodobnosti embryonální úmrtí a abnormality potomků. I přes značný pokrok ve vývoji dosavadních reprodukčních biotechnologií je kvalita oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách stále neuspokojivá a omezuje možné zlepšení dalších reprodukčních biotechnologií prasat. Vývoj a stanovení konkrétních *in vitro* podmínek vhodných pro optimální zrání a správné načasování oplození oocytu by tudíž neměly být podceňované, jelikož většina reprodukčních technologií na těchto podmínkách závisí. Když dochází k manipulaci s prasečími oocyty při přenosu jader, jsou obvykle od dárkyň chirurgicky odebrány neoplozené, ale dozrálé oocyty. Tato metoda je poměrně pracná a finančně náročná. Kdyby byla vyvinuta spolehlivá metoda přenosu jader za použití *in vitro* zralých oocytů, byl by tento proces mnohem efektivnější, levnější a časově méně náročný. Bohužel manipulace s *in vitro* zralými oocyty je časově omezená a použití metod umožňujících zbavit se tohoto limitu by zajistilo dostatek času na vylepšení kvality oocytu pro příjemkyně. Jednou z metod redukce časového omezení při současném zajištění vysoké kvality oocytů by mohlo být ošetření stárnoucích prasečích oocytů látkami, které by zastavily kaskádu změn vedoucích k nízkému vývojovému potenciálu a apoptóze těchto buněk. Tímto způsobem by mohly být pro přenos jader použity neoplozené stárnoucí oocyty, avšak s kvalitou blízkou se kvalitě *in vivo* zralých oocytů. Tím by se vylepšily podmínky pro přenos jader za použití *in vitro* kultivovaných oocytů a současně by se našlo využití pro neoplozené stárnoucí oocyty, které by jinak s nejvyšší pravděpodobností podstoupily apoptózu a byly zlikvidovány. V praxi bychom touto metodou mohli zajistit velké množství kvalitních prasečích embryí potřebných v oblasti hospodářství i vědy. Zlepšení podmínek vhodných pro manipulaci se stárnoucími oocyty by jistě napomohlo vývoji současných i nových metod reprodukčních biotechnologií.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že donor oxidu uhelnatého (CO) ovlivňuje proces stárnutí prasečích oocytů a může zlepšovat jejich životaschopnost. Za účelem ověření hypotézy jsou stanoveny dílčí cíle:

Sledovat míru exprese a buněčnou lokalizaci enzymů hemoxygenáza-1 a hemoxygenáza-2 a aktivované kaspázy-3 během stárnutí prasečích oocytů po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Sledovat vliv donoru CO na morfologické znaky stárnutí prasečích oocytů po dobu 24, 48 a 72 hodin.

Sledovat vliv donoru CO na aktivaci kaspázy-3 během stárnutí prasečích oocytů po dobu 24, 48 a 72 hodin.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

3.1.1 Vznik zárodečných buněk, fáze množení

Vývoj oocytů neboli oogeneze začíná u prasat, podobně jako u skotu či primátů, velmi brzy, a to v raném stádiu embryonálního vývoje. Přestože jsou prasečí gonády pozorovatelné až kolem 24. – 26. dne po oplození, primordiální zárodečné buňky (PGCs – *primordial germ cells*) mohou být zpozorovány už 18. den po oplození (Hunter 2000).

Důležitým začátkem oogeneze je formování PGCs. PGCs vznikají v endodermu žlutkového vřívku, který se nachází v kaudální oblasti vznikajícího embrya. Tyto buňky během počátku oogeneze migrují mezodermem a ektodermem směrem k budoucím pohlavním žlázám vznikajícího embrya. Tento pohyb začíná přibližně 18. den po oplození a je zpočátku pasivní, později nabývá améboidního rázu, jenž je podněcován chemotaxí k látkám podmiňujících růst buněk, jako je například růstový faktor β . Kolem 26. dne po oplození se PGCs dostanou do genitální lišty, místa vznikajících gonád a tím je migrace zakončena. Během migrace se PGCs mitoticky dělí a jejich počet se několikrát znásobí (Kanitz et al. 2001).

Mitóza probíhá již od 13. dne po oplození a trvá až do 7. dne po narození. Počet PGCs například 20. den po oplození čítá 5000 buněk a kolem 50. dne po oplození naroste na 1 100 000 buněk. Poté mitotická aktivita ustává a dochází k zániku (atrézii) části populace pohlavních buněk (Hunter 2000).

Kolem 26. dne, kdy PGCs vstoupí do genitální lišty, dochází v závislosti na pohlaví embrya k jejich diferenciaci. U budoucích samců se namnožené buňky nazývají spermatogonie, u samic oogonie. Tyto buňky se opět několikrát dělí a přibližně 40. den po oplození zahájí meiotické dělení a oogonie se diferencují v primární oocyty, které dosahují průměru přibližně 44 μm . Mitotická aktivita oogonií končí 7. den po porodu (Hunter 2000, Van den Hurk & Zhao 2004).

3.1.2 Meiotické dělení a vývin samičích pohlavních buněk

U všech organismů, které se pohlavně rozmnožují, je meióza nezbytně nutnou fází formování gamet. Studie vlivu mutací u modelových organismů vedly k bližšímu porozumění vývoje a průběhu meiotického zrání u jednobuněčných mikroorganismů – kvasinek až po nejvyspělejší živočišný druh – lidí, a pochopení toho, jak je meióza spojena s budoucími funkcemi gamet. Poškození genetické informace a chyby v průběhu meiózy hrají důležitou roli pro vznik neplodnosti a vývojových vad, zvláště aneuploidie (Handel & Schimenti 2010).

U většiny organismů je nezbytnou součástí meiózy proces meiotické rekombinace zvaný *crossing-over*, díky němuž je vytvářena genetická variabilita v populaci. Současně je procesem *crossing-over* zajištěno správné rozdělení chromozomů v prvním meiotickém dělení – meióze I. Absence tohoto jevu může vést k náhodnému rozdělení chromozomů, či ke zmíněné aneuploidii, které mohou mít za následek úmrtí embrya či vývojové abnormality (Handel & Schimenti 2010).

Při aneuploidii dochází ke změně počtu chromozomů. Počet se může zvýšit nebo snížit, může také docházet k nesprávnému rozdělení chromozomů, čímž vznikají delecce, znásobení či translokace určité části genomu. Pokud tyto změny nevedou přímo k zániku buňky, mohou způsobit vznik funkčních a vývojových abnormalit (Orr et al. 2016).

Většina případů aneuploidie gamet vzniká během oogeneze, zvláště během prvního meiotického dělení a s rostoucím věkem samic a žen se zvyšuje frekvence chyb vzniklých aneuploidii (Handel & Schimenti 2010).

Přestože mezi průběhem meiózy napříč různými živočišnými druhy existují určité rozdíly, hlavní společné znaky meiózy zůstávají stejné. Meiotické dělení u savců začíná prodlouženou profází (profáze meiózy I), po které následují dvě dělení vedoucí k vytvoření gamet. Profáze meiózy I se dělí na další fáze – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze (Handel & Schimenti 2010; Picton et al. 1998).

Premeiotická replikace DNA vede k vývoji oogonií v primární oocyty. Ve fázi leptotene jsou vlákna DNA tenká a od sebe oddělená. Na pohled se sada chromozomů jeví jako hustá spleť vláken, ale již v této fázi se může objevit jakási základní podoba budoucího uspořádání chromozomů v jádře. Další fází je zygotene, kdy se vlákna spiralizují a opticky ztlušňují a zkracují. V pachytene vznikají dvě homologní sesterské chromatidy, které se k sobě přibližují a pevně se společně vážou, čímž se vytváří chromozomální bivalenty. Dva bivalenty se k sobě připojí a vznikne tak tetráda chromozomů, na které dochází k výměně úseků chromozomální DNA – jevu zvanému *crossing-over* (Zickler & Kleckner 1998). Během *crossing-over* dochází k vytvoření chiasmat – vazeb spojujících homologní chromozomy, které trvají do konce profáze I (Handel & Schimenti 2010).

Výměna genetického materiálu mezi homologními chromozomy pomocí *crossing-over* je typickým znakem meiózy savců. Fyzické spojení dvou chromozomů pomocí chiasmat působí proti polarizačním silám dělicího vřeténka a tím zabraňuje předčasnému oddělení homologních chromozomů během meiózy I. Snížená míra *crossing-overů* a jejich nesprávný průběh jsou u mnoha organismů spojeny s neplodností. *Crossing-over* také může pomáhat při opravě DNA vzájemnou výměnou heterozygotních úseků v místě poškození. V takovém případě dojde k výměně alel do nových multilokusových kombinací, čímž dojde ke vzniku genetické diverzity v populaci. Tímto procesem může dojít k oddělení vysoce kvalitních alel od navázaných škodlivých a napomocť tak přírodnímu výběru (Dumont 2017).

Pokud by v páru chromozomů neproběhl alespoň jeden *crossing-over*, mohlo by dojít při redukčním dělení k vydělení obou homologních chromozomů do jedné dceřiné buňky, což by vedlo k aneuploidii (Handel & Schimenti 2010).

Ve fázi diplotene dochází k uvolnění vazeb mezi homologními chromozomy a tetráda se rozděluje na dva samostatné chromozomy. Tyto chromozomy se od sebe oddalují a v poslední fázi meiózy I se bivalenty ještě více zkracují a chovají se jako samostatné jednotky. Chiasmata se přesouvají ke koncům bivalentů, kde zanikají (Zickler & Kleckner 1998).

U samic se meiotické dělení zastavuje v profázi meiózy I krátce před porodem. Všechny primární oocyty se kolem 35. den po porodu nachází v profázi prvního meiotického dělení (Hunter 2000).

U malého souboru populace oocytů pokračuje meiotické dělení v periodických intervalech po pubertě. Naproti tomu samci se rodí s populací spermatogonií, meióza

je iniciována u skupin dozrávajících spermatogonií a vede ke kontinuální produkci spermií po celou dobu života (Handel & Schimenti 2010).

První meiotické dělení je redukční a jeho výsledkem jsou sekundární oocyty. Během druhého meiotického dělení dochází k oddělení sesterských chromatid a jeho průběh se také liší v závislosti na budoucím pohlaví. U samic se nachází v rostoucích a dominantních folikulech primární oocyty zadržené v profázi prvního meiotického dělení, tzv. prvním meiotickým bloku. V období puberty je meióza obnovena a oocyty z tohoto bloku vystupují. K obnovení dochází ještě před ovulací a vede ke změnám jádra i cytoplazmy oocytu, tzv. meiotickému zrání oocytů. Při meiotickém zrání dochází k vyloučení prvního pólového tělíška. Oocyty se mění z primárních na sekundární a přecházejí do druhého meiotického zrání, kde jsou opět zadrženy v druhém meiotickém bloku v metafázi II až do oplození, kdy je aktivační stimul pro znovuobnovení vyvolán proniknutím spermie. Oplození vede u oocytu k dokončení meiózy, vyloučení druhého pólového tělíška a následnému zahájení embryonálního vývoje. U samců meióza II nastupuje okamžitě po prvním dělení a jejím výsledkem je produkce čtyř haploidních spermatid (Van Den Hurk & Zhao 2004; Handel & Schimenti 2010).

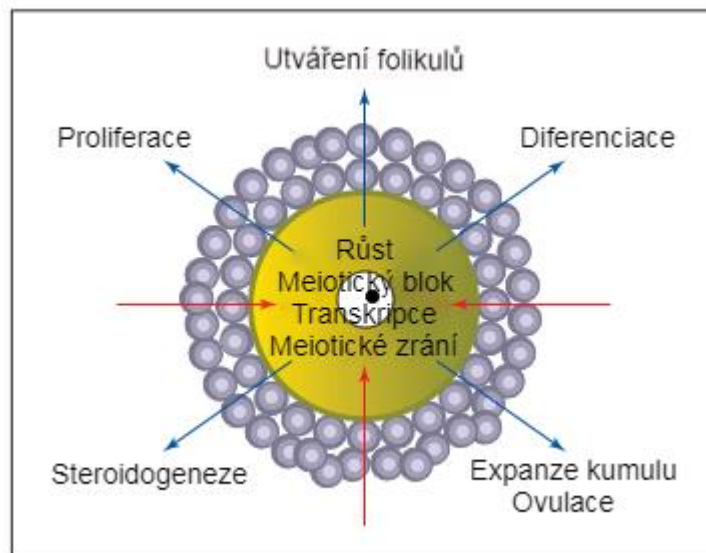
3.1.3 Formace primordiálních folikulů

Estrální cyklus u prasnice trvá přibližně 21 dní, z čehož 6 dní představuje folikulární fázi (Hunter 1977).

Na začátku meiózy se kolem primárních oocytů vytváří vrstva plochých somatických pregranulózniích buněk, které jsou obklopeny bazální membránou. V této rané fázi se jedná o uskupení velké 30 – 100 μm , nazývané primordiální folikuly. Tyto útvary vytváří populaci nerostoucích folikulů čítající při narození jedince přibližně 500 000 folikulů. Velikost souboru primordiálních folikulů je předurčena počtem namnožených oogonií, časem počátku meiotického dělení a mírou ztráty pohlavních buněk. Tato ztráta je z velké části způsobena apoptózou, ke které dochází zejména u primordiálních folikulů a způsobuje zánik oocytů (Kanitz et al. 2001).

3.1.4 Fáze folikulárního růstu a vývoje

V populaci folikulů, které nepodlehly apoptóze, dochází u vybrané skupiny folikulů k iniciačnímu *recruitmentu*, což znamená, že jsou předurčeny k růstu. Vrstva pregranulózniích buněk se mění ve vrstvu buněk granulózniích, které mají kubický tvar. V této fázi se folikul nazývá primární. Mezi granulózniimi buňkami a oocytem se vytváří mezerové spoje (*gap junctions*). Tyto spoje jsou vytvářeny proteiny konexiny, z nichž konexin-37 je v oocytu exprimován ve všech stádiích folikulogeneze. Mezerové spoje umožňují obousměrnou komunikaci a přenos živin, prekurzorů metabolitů (jako jsou aminokyseliny a nukleotidy), informační molekuly (hormony, neurotropiny a růstové faktory) a inhibiční a stimulační meiotické signály. Tímto způsobem nebo přímým kontaktem povrchů dvou buněk může rostoucí oocyt aktivně podněcovat proliferaci, morfogenezi a diferenciaci granulózniích buněk, zatímco granulóznií buňky jsou schopné zajistit růst a diferenciaci oocytu (viz Obrázek 1) (Van Den Hurk & Zhao 2004, Kanitz et al. 2001).



Obrázek 1: Vliv obousměrné komunikace oocyty a granulózních buněk na proces folikulogeneze, oogeneze a zrání oocytů. Oocyt je označen žlutě, obklopující granulózní buňky šedě, červené šipky označují vliv granulózních buněk na oocyt, modré šipky značí vliv oocyty na granulózní buňky. Upraveno podle: Eppig (2001)

Přestože je například u myši prokázán gen, jehož exprese je zodpovědná za iniciaci růstu oocytů a folikulů, u prasečích oocytů není přesný signál podněcující zahájení růstu znám (Hunter 2000).

U myši hraje klíčovou roli při iniciaci růstu folikulů a oocytů tyrozinkinázový receptor KIT a jeho ligand (KIT ligand – KL), což by mohlo naznačovat o jejich stejném účinku u prasečích folikulů a oocytů. Přestože v granulózních buňkách prasečích primordiálních folikulů dochází k expresi mRNA kódující KIT a současně je v prasečích oocytech exprimována KL mRNA, aktivaci KIT a KL nedochází k zahájení růstu folikulů ani oocytů. KIT a KL jsou zodpovědné za přežití prasečích oocytů a granulózních buněk folikulů, nicméně signál podněcující zahájení jejich růstu je stále neznámý (Moniruzzaman & Miyano 2010).

Primární oocyty začínají růst a tím zvětšovat svůj průměr v profázi prvního meiotického dělení. Pouze oocyty, které plně dokončily svůj růst mohou pokračovat v meióze a následně zrát a ovulovat (Hirao et al. 1994).

Růst savčích oocytů může být rozdělen na dvě fáze (viz Obrázek 2). První fáze zahrnuje současný růst oocyty a folikulu, který ho obklopuje. Tato fáze má v souvislosti s postupem času kontinuální lineární charakter. Ve druhé fázi zůstává velikost oocyty konstantní, přesto však růst folikulu stále pokračuje. Na začátku růstové fáze měří prasečí oocyty přibližně 30 μm a při dokončení růstu jejich velikost naroste na přibližně 120 μm . V době, kdy dochází k ukončení růstu oocytů, dosahuje průměr folikulů kolem 1,8 mm (Hunter 2000).

Jednou z nejnápadnějších změn během fáze růstu oocyty je sekrece nebuněčné glykoproteinové membrány – *zony pellucidy* (ZP), která vytváří ochranný obal kolem oocyty. ZP je nepropustná pro molekuly větší než 170 kDa. Po zahájení folikulárního růstu je ZP vylučována oocytem do perivitelinního prostoru primárního folikulu. U prasnice ZP sestává ze čtyř glykoproteinů – ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Tyto čtyři proteiny se spojují do vrstvy silné až 15 μm . Napříč různými živočišnými druhy včetně člověka jsou proteiny vysoce homologní. Například homologie ZP proteinů myši a člověka se udává kolem 60 a 74 %. Přestože hrají všechny tyto tři proteiny důležitou roli při udržení strukturální integrity ZP, existuje mezi nimi s ohledem na jejich biologické funkce jistá diferenciace. Nejméně je prozkoumaná úloha ZP1

a jedinou jeho známou funkcí je spojování ZP2 a ZP3. Naopak ZP3 je známý jako primární receptor pro navázání spermií a také díky němu dochází k iniciaci akrozomální reakce. ZP2 slouží jako sekundární receptor umožňující penetraci spermií skrz *zonu pellucidu* (Picton et al. 1998; Sun et Nagai 2003).

Na rozdíl od ZP1 a ZP3 se exprese ZP2 objevuje již u primordiálních folikulů. Proteiny ZP jsou esenciální pro normální vývoj folikulu a jejich exprese vyžaduje transkripční faktor Fig- α (Van Den Hurk & Zhao 2004).

Granulózní buňky folikulu se mitoticky množí a ze začátku vytváří dvě vrstvy. Postupem času se počet vrstev zvětšuje. Pokud má folikul více než jednu vrstvu granulóznic buněk, nazývá se sekundární či preantrální. Přestože se primární a sekundární folikuly mohou vyvíjet bez přítomnosti gonadotropinů, jsou vůči gonadotropinům vnímavé, a pro následný vývoj je jejich účinek tudíž nezbytný (Eppig 2001).

Sekundární folikuly prasnic přímo neprodukují estrogény, jelikož neexprimují enzym aromatázu, který konvertuje androgeny v estrogény. V *in vitro* podmínkách dochází k synergii FSH a estradiolu, což způsobuje proliferaci granulóznic buněk sekundárních oocytů (Van Den Hurk & Zhao 2004).

V průběhu dalšího vývoje se uvnitř sekundárních folikulů obsahujících primární oocyt začíná vytvářet dutina – *antrum*, která je postupně naplňována antrální tekutinou tvořenou granulóznicí buněk. Do této tekutiny se z granulóznic buněk a z krve dostávají látky důležité pro regulaci oogeneze. Takovými látkami jsou například gonadotropiny, steroidní hormony, růstové faktory, enzymy a lipoproteiny. Během folikulárního růstu a vývoje dochází ke zvyšování vaskularizace folikulů a permeability folikulárních cév, díky čemuž je tvorba antrální tekutiny čím dál více intenzivnější. Kolem granulóznic buněk se vytváří vrstva buněk nazývaná *theca folliculi*. Její buňky během vývoje antrálního folikulu zvyšují expresi enzymů zahrnutých v biosyntéze steroidů. Granulózní buňky sekundárních oocytů však ještě neexprimují aromatázu, účastní se syntézy estrogenů. To může svědčit o tom, že progesteron, androgeny a další steroidní hormony vyjma estrogenů jsou hlavními hormony produkovanými ranými antrálními folikuly. Výše zmíněné látky jsou do vývoje antrálních folikulů zapojeny a mohou také být zodpovědné za iniciaci jejich růstu v rané fázi (Van Den Hurk & Zhao 2004).

3.1.5 Růst antrálních folikulů

Antrální folikuly s plně vyvinutou dutinou se někdy označují jako terciální folikuly. Vytvořením antrální dutiny a jejím naplněním tekutinou se od sebe oddělily dvě skupiny buněk, z nichž jedna vytváří kumulární vrstvu granulóznic buněk kolem oocytu a druhá obklopuje stěnu folikulu. Buňky, které vytvářejí vrstvu nejbližší antru, se nazývají periantrální granulózní buňky (Eppig 2001).

U dospělé prasnice začínají být antrální folikuly velikosti okolo 1 mm závislé na stimulaci gonadotropiny a po mírném vzestupu FSH u nich dochází k cyklickému *recruitmentu* a následnému růstu (Van Den Hurk & Zhao 2004).

V této fázi jsou změny průměru oocytu v antrálním folikulu minimální, kdežto změny z pohledu objemu či hmotnosti oocytu jsou znatelné (Eppig 2001).

Počet folikulů procházejících *recruitmentem* se napříč různými živočišnými druhy a jednotlivci liší. U klisen je těchto folikulů 1 – 4, u krav 5 – 10 a u prasnic jich může být

až přes 50. U folikulů dosahujících velikosti okolo 5 – 6 mm se začínají granulózní buňky vytvářet LH receptory. Navzdory klesajícím koncentracím FSH budou folikuly pod vlivem LH po dobu několika dnů rapidně růst a začnou být znatelně větší než ostatní folikuly. LH u rekrutovaných antrálních folikulů stimuluje syntézu androgenů, které enzym aromatáza konvertuje na estrogény. Jedním z estrogénů je estradiol, který v antrálních folikulech slouží jako antiapoptotický faktor. Pro další růst jsou procesem selekce vybrány antrální folikuly, které jsou následně označovány jako dominantní folikuly a dosahují u prasnice velikosti 8 – 10 mm (viz Obrázek 2). Dominantní folikuly produkují velké množství estradiolu a inhibinu a mohou se vyvíjet v ovulační folikuly. Ostatní folikuly přecházejí do fáze atrezie (Eppig 2001, Van Den Hurk & Zhao 2004).

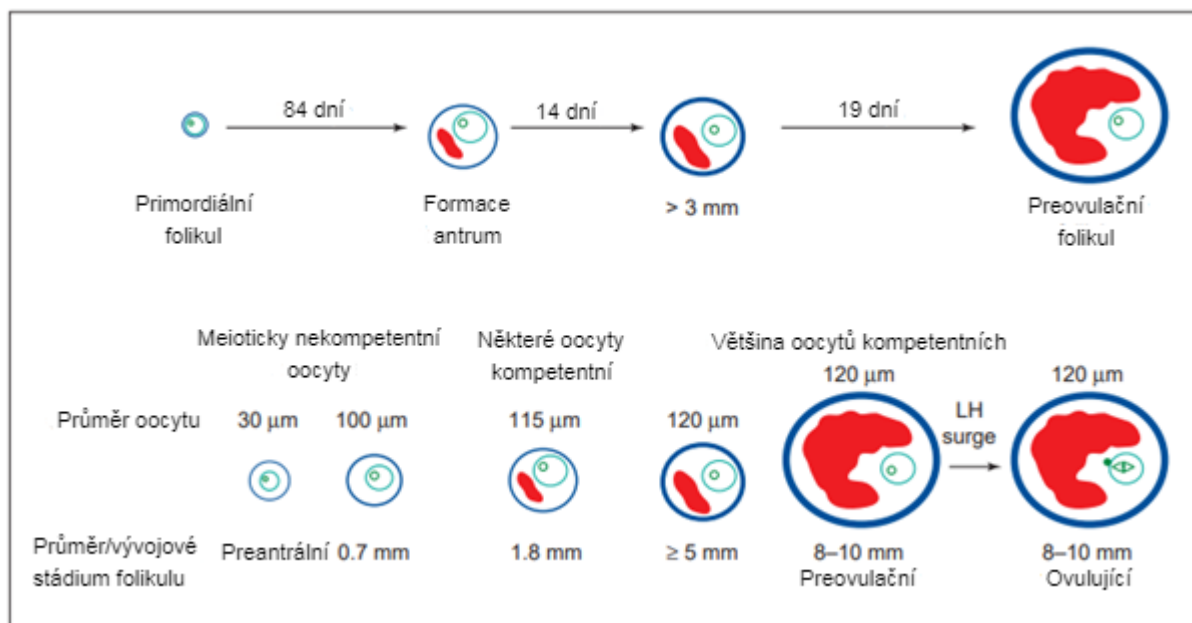
Stejně jako v předchozích stádiích, i v antrální fázi oocyty aktivně řídí funkci somatických buněk. Oocyty pokračují v produkci ZP proteinů a konexinu-37 potřebných pro optimální komunikaci oocyty a granulózních buněk, čímž dochází k jejich proliferaci a diferenciaci za působení parakrinních faktorů, které pravděpodobně vytvářejí koncentrační gradient a které ovlivňují kumulární a granulózní buňky. Odběr nebo ztráta oocyty vede k předčasné luteinizaci a zvýšené produkci progesteronu granulózními buňkami, zatímco je stimulována produkce estrogénů. To ukazuje, že jeden nebo více faktorů odvozených od oocyty řídí steroidogenní funkci granulózních buněk (Van Den Hurk & Zhao 2004).

Steroidní pohlavní hormony hrají důležitou roli při růstu a diferenciaci tkání pohlavního ústrojí a udržení plodnosti. Tyto hormony vznikají *de novo* z cholesterolu a patří mezi ně progestiny androgeny a estrogény. Biosyntéza steroidů začíná v thekálních buňkách, kde pod vlivem LH dochází ke konverzi cholesterolu na pregnenolon a následně na progesteron. Oba tyto hormony jsou několikrát enzymaticky modifikovány, čímž dochází k produkci testosteronu. Testosteron přechází do granulózních buněk oocyty, kde pod účinkem FSH opět dochází k jeho modifikaci a kde současně dochází k produkci estronu. Metabolismem testosteronu na dihydrotestosteron a estronu vzniká estradiol. Estrogény jsou zodpovědné za stimulaci proliferace granulózních buněk a vytvoření receptorů pro navázání FSH a LH na povrchu thekálních a granulózních buněk. Progestiny pomocí zpětné vazby řídí aktivitu steroidogenních enzymů v granulózních buňkách (Drummond 2006).

Oocyty v rostoucích a dominantních folikulech jsou zastaveny ve fázi diplotene první meiotické profáze a nejsou meioticky kompetentní. Tyto oocyty nemají dostatek regulačních molekul nezbytných k řízení obnovy meiotické aktivity. Ta je iniciována jen u plně vyvinutých, meioticky kompetentních oocytů preovulační vlnou LH. V *in vitro* podmínkách je spuštěna přenosem oocytů mimo prostředí jejich folikulu (Eppig 2001).

Odstraněním oocyty z folikulu před ovulací je vyvolána obnova meiotické aktivity, která se projevuje rozpadem zárodečného váčku (GVBD), utvořením dělicího vřetenka, oddělením chromozomů a vydělením prvního pólového tělíska (Sun et al. 2001a).

Před preovulační LH vlnou a během ní je oocyt obklopen kumulární vrstvou granulózních buněk, a tak spolu vytváří komplex *COC – cumulus-oocyte complex*. Nejvnitřnější buňky tohoto komplexu penetrují svými výběžky skrz *zona pellucida* a kontaktují oolemu, což má za následek vytvoření mezerových spojů (*gap junctions*). Jejich rozpad představuje zánik vysoce koordinované obousměrné komunikace mezi oocyttem a obklopujícími somatickými buňkami. Těsně před LH vlnou a ovulací podstupuje cytoplazma i jádro oocytů několik změn, dochází k procesu zvanému zrání oocyty (Van Den Hurk & Zhao 2004).



Obrázek 2: Časové schéma zobrazující růst folikulů a oocytů a nabytí meiotické kompetence prasečích oocytů. Upraveno podle: Hunter (2000)

3.2 Zrání oocytů

Zrání oocytů trvá u prasnice přibližně 44 hodin a zahrnuje dva základní kroky, jaderné a cytoplazmatické zrání. Za dozralé se obecně považují oocyty, které mají po dokončení jaderného zrání vydělené první pólové tělísko a následně jsou zastavené v MII fázi. U prasnice dosahují folikuly obsahující plně meioticky kompetentní oocyt průměru nad 3 mm. V *in vitro* podmínkách dochází k obnovení meiotické aktivity po vynětí oocytu z prostředí folikulu a kultivaci po dobu 20 – 24 hodin. Přestože jaderně zralé oocyty mohou být oplodněné, jejich vývoj nemusí být úplný kvůli nedostatku cytoplazmatických faktorů nezbytných k plnému dokončení cytoplazmatického zrání. Rozvoj plného vývojového potenciálu vyžaduje synchronizaci jaderného a cytoplazmatického zrání (Sun & Nagai 2003).

3.2.1 Jaderné zrání

Jaderné zrání se skládá ze dvou po sobě jdoucích cyklů dělení jádra (MI a MII-fáze). Navzdory druhovým rozdílům jsou některé znaky základního mechanismu řídicího zrání oocytu mezidruhově shodné, jako je například změna fosforylace proteinů nebo hladiny cAMP (*cyclin adenosine-monophosphate*) a vápníku. Kaskáda událostí během fosforylace a defosforylace je zahrnuta v regulaci meiózy. Protein zvaný MPF (*maturation promoting factor*) je zodpovědný za zahájení zrání oocytu, přičemž jeho aktivace předchází rozpadu zárodečného váčku (procesu označovanému GVBD – *germinal vesicle breakdown*), nebo probíhá současně s ním (Van Den Hurk & Zhao 2004).

Vápník má důležitou úlohu v reprodukci všech živočišných druhů, zvláště během jaderného zrání oocytů. Konkrétně u prasnice hraje důležitou roli při GVBD, který je spuštěn nárůstem vápníkových iontů přibližně 2 hodiny před zahájením GVBD. Vápníkové ionty potřebné pro GVBD pravděpodobně pocházejí z intracelulárních zásob. Při *in vitro* experimentech, kdy oocytům nebyl dodáván extracelulární vápník, nebyla prokázána závislost

průběhu GVBD na přítomnosti exogenního zdroje vápníku. Následující průběh meiotického zrání po metafázi I je v porovnání s GVBD pravděpodobně závislý na exogenním zdroji vápníku (Kaufman & Homa 1993).

Vápník se také podílí na životaschopnosti oocyty a má pozitivní efekt na počet utvářených pólových tělísek (Bae & Channing 1985).

3.2.1.1 Získání meiotické kompetence a znovuzahájení meiotické aktivity

Na rozdíl od myších oocytů je u prasečích oocytů aktivní transkripce a translace nezbytná pro kondenzaci chromatinu a rozpad zárodečného vajíčku. Znovuobnovení meiotické aktivity je doprovázeno a regulováno nárůstem kinázové aktivity v cytosolu oocyty (Hunter 2000).

MPF je komplex tvořený dvěma podjednotkami – cyklinem B (regulační podjednotkou) a p34Cdc2 kinázou (katalytickou podjednotkou). Aktivní MPF je schopen fosforylovat proteiny, které vytvářejí obal jádra, a proteiny zahrnuté v kondenzačních procesech chromatinu a v reorganizaci cytoskeletu (Van Den Hurk & Zhao 2004).

Rostoucí prasečí oocyty dosahující průměru 90 μm nejsou schopné pokračovat v meióze v podmínkách *in vitro*. Tato neschopnost však není způsobena nedostatkem MPF a/nebo MAP (*mitogen-activated protein*) kinázou, dvěma důležitými signálními molekulami řídícími obnovu meiotické aktivity. Rostoucí oocyty obsahují fosforylovanou p34Cdc2 kinázu a nejsou schopné aktivovat MPF, dokud není růst oocyty zcela dokončen. Aktivace MPF je obvykle spuštěna defosforylací p34Cdc2 a syntézou cyklinu B. Přestože se v plně dorostlých prasečích oocytech cyklin B i p34Cdc2 vyskytují sdružené do jednoho komplexu, nárůst MPF do koncentrace, kdy bude MPF účinný, vyžaduje aktivní syntézu dalších proteinů (Sun & Nagai 2003).

Tato aktivace spouští sérii reakcí vedoucích k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a vytvoření dělicího vřeténka. Tyto události jsou klíčové pro úspěšné oplození a raný embryonální vývoj. Nedostatek koncentrace těchto molekul, převážně p34Cdc2, je u malých oocytů v preantrálních folikulech limitujícím faktorem, kdežto u rostoucích oocytů je rozhodujícím bodem spíše aktivace MPF než celková koncentrace p34Cdc2. Aktivita MPF zůstává v metafázi II vysoká (Hunter 2000).

U oocytů zadržovaných v MII fázi hladina MPF aktivity dosahuje maxima a zvýšená schopnost aktivace oocyty se odvíjí od snížené aktivity MPF. Inaktivace MPF a degradace cyklinu B korespondují s přechodem oocyty zadržovaného v MII fázi do anafáze II či telofáze II (Sun & Nagai 2003).

Přestože je jisté, že MPF hraje důležitou roli v řízení obnovy meiotické aktivity, další kinázy jsou aktivovány před nebo souběžně se zahájením aktivity MPF. Jednou z těchto kináz je MAP kináza (Hunter 2000).

MAP kináza se v oocytech vyskytuje ve dvou izoformách s různou molekulovou hmotností – p44 ERK1 a p42 ERK2. V rostoucích prasečích oocytech se MAP kináza nachází v inaktivní formě. Meioticky nekompetentní oocyty obsahují stejné množství této kinázy jako plně dorostlé oocyty, ale v meioticky nekompetentních oocytech není MAP kináza aktivní. Tento jev byl prokázán sledováním aktivity MAP kinázy po kultivaci nezralých oocytů po dobu 44 hodin v *in vitro* podmínkách. Tímto se prokazuje, že získání meiotické aktivity rostoucích oocytů koreluje s jejich schopností aktivovat MPF a MAP kinázu (Sun & Nagai 2003).

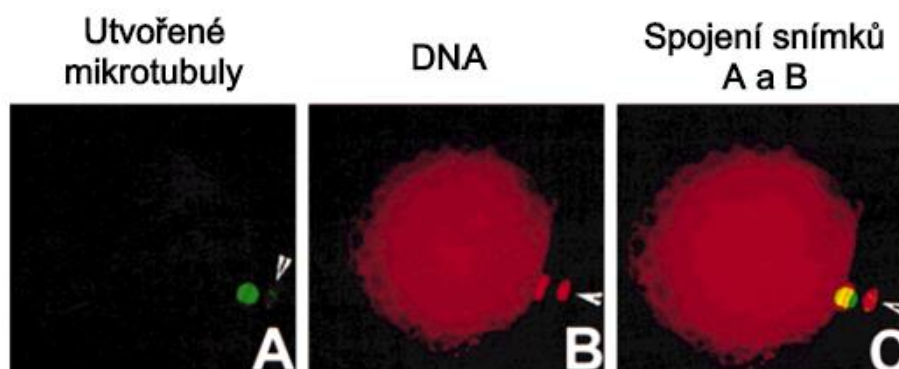
MAP kináza je aktivována MEK, specifickou MAP kinázou, jejíž aktivita je stimulována kinázou MOS, která je typická pro pohlavní buňky. Na rozdíl od MPF se načasování aktivace MAP kinázy během zrání oocyty u různých druhů liší. V oocytech u větších domácích zvířat je MAP kináza aktivována souběžně s nebo těsně po zahájení GVBD, kdežto například u myši je aktivována až po GVBD. Aktivita MAP kinázy je během jaderného zrání důležitá pro udržení aktivity MPF, vytvoření dělicího vřeténka a udržení oocyty v MII fázi, na kterém se spoluúčastní s p90rsk, označovanou také jako MAPK-AP-K1 (*MAPK-activated protein kinase-1*) (Van Den Hurk & Zhao 2004).

Další látkou, která hraje zásadní roli v meiotickém zrání je cAMP (*cyclic adenosine-monophosphate*), který se do oocyty dostává z kumulárních buněk pomocí mezerových spojů. V *in vitro* podmínkách dosahuje cAMP v prasečích oocytech nejvyšší hladiny 8 hodin po začátku kultivace a po 12 hodinách kultivace rapidně klesá. Je pravděpodobné, že cAMP inhibuje proces rozpadu zárodečného váčku prostřednictvím inhibice aktivace MAP kinázy. Když je MAP kináza nebo p90rsk inaktivován pomocí MEK inhibitoru U0126, oocyt z MII bloku vystupuje a přechází do interfáze (Sun & Nagai 2003).

Bylo potvrzeno, že hladina cAMP v oocytech má na meiotické zrání vliv. V savčích oocytech je možné farmakologicky zvýšit hladinu cAMP do kritické hladiny, čímž dojde k zástavě meiózy. Vysoká hladina cAMP udržuje oocyt v meiotickém bloku, pravděpodobně díky dráze protein kinázy A (PKA). To bylo u myši prokázáno injekcí PKA inhibiční nebo regulační a PKA katalyzační podjednotky do oocyty. Ztráta intercelulární komunikace přes mezerové spoje při preovulační LH vlně je jedním z faktorů zodpovědných za obnovu meiotické aktivity. Narušením této komunikace dochází k zabránění transportu cAMP z granulózniích buněk, což má za následek redukci hladiny cAMP v oocyty a následnou inaktivaci dráhy PKA. Na druhou stranu i při přítomnosti mezerových spojů mohou, co se týče produkce cAMP, oocyt a granulóznií buňky na LH vlnu reagovat samostatně (Ven Den Hurk & Zhao 2004).

3.2.1.2 Utvoření meiotického aparátu

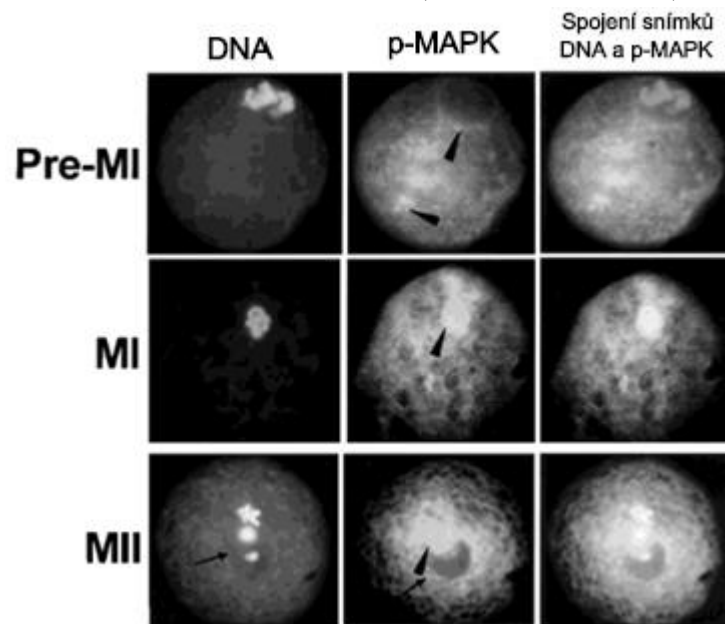
Pro správné dokončení jaderného zrání je potřeba vytvoření, správné fungování a následný rozklad meiotického aparátu neboli dělicího vřeténka oocyty složeného z mikrotubulů a mikrofilament (viz Obrázek 3). Jednou z látek, která se v jádře podílí na tvorbě mikrotubulů a utvoření dělicího vřeténka, je fosforylovaná MAP kináza (Sun et al. 2001a).



Obrázek 3: Zobrazení utvořených mikrotubulů (A – znázorněno zeleně) a DNA (B – znázorněno červeně) v prasečím oocyty v MII fázi. Překrytí míst výskytu mikrotubulů a DNA je zobrazeno žlutě. Šípka na obrázcích A, B, C označuje první pólové tělísko. Upraveno podle: Sun et al. (2001a)

Fosforylovaná MAP kináza se nachází v místech, kde dochází k tvorbě mikrotubulů. Po rozpadu zárodečného váčku je fosforylovaná MAP kináza spolu s p90rsk lokalizována v několika oblastech: kolem kondenzovaných chromozomů, v místě vytvoření dělicího vřeténka v MI fázi, na pólech oocyty v rané anafázi I, v centrální části prodlouženého vřeténka ve fázích od anafáze I po telofázi I a ve vřeténku v MII fázi (viz Obrázek 4). MAP kináza a p90rsk zůstávají fosforylované v období přechodu z MI fáze do MII, kdy se mikrotubuly začínají shlukovat a vytvářet dělicí vřeténko, kdežto aktivita MPF od anafáze I do telofáze I klesá. Inhibice aktivace MAP kinázy během přechodu z MI do MII vede k selhání vydělení prvního polárního tělíska a vytvoření dělicího vřeténka v MII (Sun & Nagai 2003).

MPF je zodpovědný za fosforylaci proteinu p220, který váže tubulin a ovlivňuje tak proces formace mikrotubulů dělicího vřeténka (Kikuchi et al. 2002).



Obrázek 4: Umístění DNA a fosforylované MAP kinázy (p-MAPK) ve fázi před meiotickým zráním (Pre-MI), v meióze I (MI) a v meióze II (MII). Trojúhelníky označují shluky fosforylované MAP kinázy, šipkou je označeno první pól tělíska. Upraveno podle: Sun et al. (2001a)

Dalšími klíčovými molekulami v utváření meiotického aparátu jsou NuMA (*nuclear mitotic apparatus protein*) a γ -tubulin. Na začátku meiózy se γ -tubulin nachází rozptýlený v zárodečném váčku plně dorostlého oocyty a může se také objevovat v podobě cytoplazmatických shluků. NuMA protein je rovnoměrně lokalizován v nukleoplazmě oocyty. Toto uspořádání, kdy ani jedna ze zmíněných látek není zformována do žádného konkrétního tvaru či uskupení, označujeme jako amorfní. V rané diakinezi, kdy se začínají vytvářet jednotlivé bivalenty sesterských chromatid, a těsně před GVBD se mikrotubuly začínají vytvářet na periferii zárodečného váčku. V této fázi byly zaznamenány silné signály γ -tubulinu v zárodečném váčku, zvláště v blízkosti jádřka. Současně je v této fázi NuMA protein poprvé lokalizován na chromozomech nebo v jejich blízkosti, nicméně současně s tím je stále rozptýlen v jádře. Po GVBD ve fázi pozdní diakineze jsou kolem chromozomů viditelné mikrotubuly shlukující se do svazků. γ -tubulin je stále v amorfním uspořádání a začíná se objevovat ve vyšších koncentracích v okolí chromatinových svazků. NuMA protein se v této době pevně napojuje na svazky chromozomů. V metafázi I se γ -tubulin přesouvá podél

mikrotubulů vřeténka a v rané anafázi I se začíná shlukovat kolem pólů vřeténka. V pozdní anafázi I a telofázi I, kdy se od sebe chromozomy oddělují, se výrazněji objevuje kolem středu dělicího vřeténka, ale přímo ve středu vřeténka jako takovém se nevyskytuje. V metafázi II se γ -tubulin opět přesouvá podél mikrotubulů vřeténka podobným způsobem jako v metafázi I. Kromě blízkosti vřeténka se také vyskytuje v kůře oocytu. NuMA se v metafázi I i metafázi II vyskytuje ve formě oddělených teček na pólech dělicího vřeténka. V anafázi a telofázi se NuMA přesouvá do centrální části mikrotubulů vřeténka (Lee et al. 2000).

Aby mohl být zajištěn správný embryonální vývoj, jsou změny v jádře během zrání oocytu a oplození spojené s pohyby genetického materiálu a organel a s biochemickými změnami v cytoplazmě. Správný průběh rané embryogeneze přímo souvisí s přesně řízenou expresí těchto událostí (Sun et al. 2001b).

3.2.2 Cytoplazmatické zrání

Přestože může být meióza či jaderné zrání úspěšně dokončeno, je zde mnoho dalších procesů probíhajících v cytoplazmě oocytu, které jsou nezbytné pro plnohodnotnou vývojovou kompetenci a následné oplození. Úspěšné dokončení těchto událostí je nezávislé na jaderném zrání a je označováno jako cytoplazmatické zrání. Oocyt, který nemá cytoplazmatické zrání zcela dokončené, má nízkou kvalitu, a tudíž je neschopný úspěšně dokončit normální vývoj (Krisher 2004).

Průběh meiózy je provázen výraznými změnami v ooplazmě, které hrají klíčovou roli při dokončení koordinovaného jaderného a cytoplazmatického zrání. Schopnost oocytů podstoupit oplození a následný embryonální vývoj zahrnuje řadu událostí probíhajících v cytoplazmě. Jak již bylo zmíněno výše, hlavní roli ve zrání oocytu hraje zrání jádra, ale opětovné zahájení meiózy může spontánně probíhat i bez dosažení kompetence pro embryonální vývoj. Na druhou stranu zahrnuje průběh meiózy mnoho změn v cytoplazmě, které jsou nezbytné pro zrání oocytu. Oocyt je komplexní buňka, ve které musí jeho organely mezi sebou udržovat určité prostorové uspořádání a vztahy. U mnoha živočišných druhů bylo dokázáno, že během dozrávání dochází k dramatickým strukturálním změnám ooplazmy (Brevini et al. 2007).

Zrání cytoplazmy je nutné k získání vhodných podmínek pro úspěšné zamezení polyspermie v případě oplození, dekonenzaci spermií, které pronikly do oocytu, a k vytvoření prvojader po oplození. Tato fáze zahrnuje redistribuci organel v buňce, migraci mitochondrií do oblasti jádra a k nahromadění granul kolem oolemy (Van Den Hurk & Zhao 2004).

3.2.2.1 Úloha mitochondrií při cytoplazmatickém zrání

Mitochondrie jsou hlavním generátorem energie v ooplazmě. U několika živočišných druhů ovlivňují změny v metabolické aktivitě těchto organel zrání cytoplazmy, meiózu a embryonální vývoj po oplození. Snížená účinnost buněčného dýchání v oocytu, které po poškození mitochondrií probíhá, má negativní vliv na embryonální vývoj. Rozmístění mitochondrií během zrání je v tomto procesu také klíčovým faktorem. Migrace mitochondrií cytoplazmou závisí na tzv. remodelaci cytoskeletu a je zprostředkována mikrotubuly, jejichž přeuspořádání silně ovlivňuje rozmístění mitochondrií a následnou produkci energie v buňce (Brevini et al. 2007).

Dalším aspektem, proč je pozice mitochondrií v oocytu pro správný vývoj důležitá, je souvislost s distribucí energie (ATP) a vápníku do specifických oblastí oocytu či oplodněného vajíčka. Migrace mitochondrií tudíž může poukazovat na potřebu energie nebo iontů pro průběh klíčových událostí během zrání oocytu, oplození a raný embryonální vývoj (Sun et al. 2001b).

ATP je důležitou látkou související s motilitou, homeostázou a přežitím buňky. Role ATP při získávání meiotické kompetence byla u mnoha druhů zkoumána, ale není do detailu známá. Obsah ATP v oocytu u savců obecně může souviset s životností buňky, zvláště u preimplantačních embryí. Vyšší vývojový a implantační potenciál je např. u člověka spojován s koncentrací ATP v oocytu vyšší než 2 pmoly. U skotu a myši bylo prokázáno, že vyšší koncentrace ATP zajišťuje vyšší míru embryonálního vývoje. U prasečích oocytů byla při zrání v *in vivo* podmínkách potvrzena vyšší oxidativní aktivita mitochondrií a při *in vitro* zrání byl během meiózy zaznamenán postupný nárůst hladiny ATP, GV fázi počínaje a metafází I či II konče. U skotu byla při horší morfologii COC prokázána snížená hladina ATP jak v GV, tak v MII fázi, což poukazuje na souvislost obsahu ATP a vývojové kompetence. Při výzkumech na prasečích oocytech se však takový vztah neobjevil, hodnoty ATP v oocytech při *in vivo* i *in vitro* podmínkách byly téměř totožné. U prasat tudíž snížení hladiny ATP během zrání oocytu nebylo různými podmínkami experimentu ovlivněno a s nejvyšší pravděpodobností nemá na získání vývojové kompetence vliv. Důvod této druhové rozdílnosti mezi prasečími a ostatními oocyty a embryi zatím nebyl objasněn (Brevini et al. 2007).

3.2.2.2 Migrace mitochondrií v prasečích oocytech

Mitochondrie jsou organely umístěné v cytoplazmě eukaryotických buněk a jejich počet je často spojován s množstvím potřebné energie v buňce. Protože mitochondrie produkují energii ve formě ATP, existuje přímá spojitost cytoplazmatického ATP s distribucí aktivních mitochondrií v buňce. Aktivita a uspořádání mitochondrií jsou nezbytnými znaky různých událostí zahrnutých v cytoplazmatickém zrání (Brevini et al. 2007).

U oocytů v GV fázi vytvářejí aktivní mitochondrie shluky homogenně rozmístěné po kůře oocytů. U oocytů pocházejících z menších folikulů (0,5 – 2,0 mm v průměru) se mitochondrie mohou vyskytovat v podobě pásu na periferii oocytu nebo se mohou nacházet kromě shluků v kůře i v oblasti těsně pod kůrou, kolem zárodečného váčku či uprostřed cytoplazmy. U GV oocytů z větších folikulů (3 – 6 mm v průměru) jsou mitochondrie z velké části nahloučené kolem jádra, pod plazmatickou membránou a rozptýlené v cytoplazmě. Oocyty v metafázi I či anafázi I mají mitochondrie uspořádané kolem jádra. U MII *in vitro* zralých oocytů se mitochondrie vyskytují převážně rozptýlené v cytoplazmě vyjma jejího středu, v prvním pólovém tělísku, a některé mitochondrie se nacházejí ve středu oocytu. Výrazné shluky pod plazmatickou membránou se u těchto oocytů už nevyskytují. V GV oocytech *in vivo* jsou mitochondrie na rozdíl od *in vitro* GV oocytů rozptýlené po celé cytoplazmě, avšak na periferii cytoplazmy je jejich výskyt hojnější. Lokalizace v prvním pólovém tělísku je totožná (Sun et al. 2001b).

3.2.2.3 Vývojová kompetence oocytů

Kromě mitochondrií dochází také k přesunu dalších organel, proteinových komplexů a mRNA do specifických oblastí kolem mikrotubulů. Tento proces je nezbytný pro správnou morfologii a fungování buňky a pravděpodobně k němu dochází díky molekulám patřícím do rodiny kinezinů. Jednou z takových látek je molekula *Staufen* cílená na RNA (Brevini et al. 2007).

Mnoho oocytů dozrálých v *in vitro* podmínkách může mít nedostatek některých prozatím neznámých cytoplazmatických faktorů a mohou být tudíž vývojově nekompetentní. Tyto podmínky mohou způsobit neúplnou migraci mitochondrií a tím ovlivnit cytoplazmatické zrání. To může být vylepšeno dodáním určitého počtu kumulárních buněk či přidavkem folikulární tekutiny či různých látek do kultivačního média. Takovými látkami mohou být gonadotropiny, epidermální růstový faktor, cystein, cysteamin či glutamin. Intracelulární hladina glutationu (GSH) a schopnost cytoplazmy dekonenzovat jádro spermie či samčí prvojádro jsou znaky charakterizující míru cytoplazmatického zrání. Přídavek gonadotropinů, epidermálního růstového faktoru, cysteinu, cysteaminu či glutaminu může způsobit zvýšení koncentrace GSH či míry vytvoření samčího prvojádra. Komunikace kumulárních buněk a oocytu přes mezerové spoje je důležitá pro regulaci koncentrace cytoplazmatických faktorů zodpovědných za cytoplazmatické zrání. Pokud je tato komunikace zastavena, dochází ke snížení hladiny GSH (Sun & Nagai 2003).

Inhibice sekrece LH nebo inaktivace jeho receptorů vede k zabránění oocytu dozrát a ovulovat. V oocytech se nenacházejí žádné LH receptory, je tudíž pravděpodobné, že zrání oocytu probíhá díky signálům vycházejícím z obklopujících folikulárních buněk. Folikuly reagují na nárůst LH změnou produkce steroidů granulózními buňkami z estrogenů na progesteron a produkcí hyaluronanu kumulárními buňkami. To má za následek zvětšení kumulárních buněk a navození jejich schopnosti sekrece hlenovité extracelulární matrix. Tento jev je označován jako expanze kumulu nebo mucifikace (Van Den Hurk & Zhao 2004).

V porovnání vývojové schopnosti prasečích oocytů zralých a oplozených v podmínkách *in vivo* jsou tyto znaky oocytů z *in vitro* experimentů výrazně nižší. Neadekvátní *in vitro* cytoplazmatické zrání zhoršuje embryonální vývoj (Sun et al. 2001b).

3.3 Kvalita oocytů

Jedním z klíčových faktorů ovlivňujících embryonální vývoj je kvalita oocytů. Její podstata je však ne zcela pochopená a zahrnuje mnoho aspektů (Brevini et al. 2007).

Kvalita oocytů ovlivňuje přežití raného embrya, započetí a udržení březosti, fetální vývoj a také nemocnost v dospělosti. Kvalita a vývojová kompetence oocytů jsou získávány již během folikulogeneze, kdy oocyt roste, a během období meiotického zrání. Technologie asistované reprodukce zahrnující hyperstimulaci vaječníků či odběr nezralých oocytů následovaný zráním v *in vitro* podmínkách inhibují tento proces a oocyty mají tudíž sníženou kvalitu (Krisher 2004).

3.3.1 Vnitřní vlivy

V *in vivo* podmínkách je v každém cyklu pouze malá část kompetentních oocytů schopna pokračovat v meióze. U prasat přežije až do ovulace asi 14 – 20 rostoucích folikulů. Bylo však

prokázáno, že tato populace folikulů je jak morfoloicky, tak biochemicky heterogenní, a že i folikuly podobné velikosti mohou vykazovat značné rozdíly v počtu granulózniých buněk, hladině steroidních hormonů ve folikulární tekutině a počtu LH receptorů. Tato asynchronnost přetrvává od doby *recruitmentu* folikulů až do období po ovulaci. U oocytů, které jsou ve fázi mezi preovulační LH vlnou a ovulací, se objevují rozdíly v odpovědi na luteinizaci folikulu a v meiotickém zrání. V pokusech měla úroveň vývinu folikulů přidaných v *in vitro* podmínkách do kultivačního média s prasečími oocyty zásadní vliv na jejich cytoplazmatické zrání. Větší a více zralé folikuly zvyšovaly kvalitu oocytů, a to bylo prokázáno větší mírou penetrace oocytu spermií a utvoření samčího prvojádra. Tento poznatek dokládá zásadní vliv folikulu na zrání oocytů a má tudíž využití při zlepšení podmínek meiotického zrání *in vitro*. Mnohé studie také potvrdily, že mezi důsledky správného preovulačního vývoje prasečích oocytů patří normální embryonální vývoj a vysoká míra přežití embryí. Úroveň zrání oocytů v období těsně před ovulací je spojena s jejich vývojem v rané zygoty. Později ovulované oocyty se v *in utero* podmínkách vyvíjejí ve velmi malá embrya a jsou náchylnější ke změnám děložního prostředí. To ukazuje, že u prasnic průběh folikulogeneze společně s kvalitou oocytu částečně řídí následnou embryogenezi (Hunter 2000).

Dalším aspektem ovlivňujícím kvalitu oocytu je meiotická kompetence, definovaná jako schopnost pokračovat v meióze a dokončit ji. Meiotická kompetence se s rostoucí velikostí folikulu zvyšuje, zatímco přímo nekoreluje s průměrem oocytu. Na těchto dvou faktorech je však závislá. U všech druhů hospodářských zvířat je schopnost oocytů pokračovat v meióze dosažena v době, kdy je dokončen růst oocytu neboli když průměr folikulu dosahuje 9 – 13 % ovulačního průměru – fáze, ve které oocyty dosahují velikostního maxima. U skotu mají oocyty ve folikulech větších než 6 mm přibližně 2x větší vývojový potenciál než oocyty v menších antrálních folikulech a než oocyty dosahující plné meiotické a vývojové kompetence o průměru 115 a 120 μm . U monoovulárních druhů výrazně svou velikost zvětšují pouze jeden nebo dva folikuly a v poslední růstové fázi dochází k jejich selekci a dominanci. To vede ke zvýšení poměru estrogenů:androgenů dominantních folikulů. Nicméně velikost dominantního folikulu neovlivňuje velikost ostatních folikulů v kohortě s ohledem na jejich míru oplození a následný embryonální vývoj (Gilchrist et al. 1995; Van Den Hurk et al. 2004).

Prasečí oocyty v porovnání s oocyty jiných savčích druhů obsahují vysokou hladinu lipidů, které se v oocytu vyskytují v podobě malých tukových kapének v cytoplazmě. Tukové kapénky obsahují směs několika typů lipidů a jsou ohraničené jednou vrstvou fosfolipidů různého složení. Tyto lipidy jsou stavební složkou membrány oocytu a také slouží jako zdroj energie nutný pro normální vývoj budoucího vajíčka. Zvýšená hladina lipidů mimoto také ovlivňuje kvalitu embryí a *in vitro* manipulaci s nimi, s ohledem na jejich fázi embryonálního vývoje. Zatímco zygoty a moruly jsou při kryokonzervaci k chladu intolerantní, blastocysty jsou díky lipidům odolnější. Je tudíž jisté, že lipidy jsou zodpovědné za většinou negativní změny odolnosti oocytů a embryí vůči různým biotechnologickým manipulacím, jako je jejich kryokonzervace, mikrochirurgické dělení, rozpoznání pohlaví, genový transfer či klonování (Schreuerer Gajda 2009).

3.3.2 Vnější vlivy

Vlivy vnějšího prostředí, jako je například okolní teplota nebo roční období, a stejně tak věk zvířete či výživa mohou ovlivňovat kvalitu folikulů a oocytů a následně i životnost embryí (viz Obrázek 5) (Hunter 2000).

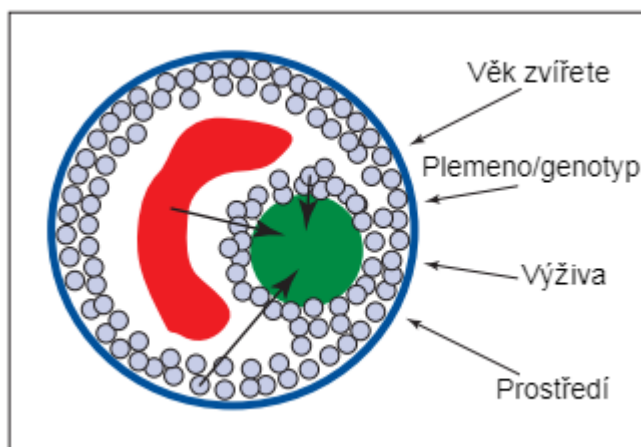
Samice prasete domácího obvykle plodí potomky dvakrát za rok bez ohledu na období roku. Během pozdního léta a na začátku podzimu je ale v mnoha zemích u prasnic pozorována nižší plodnost. Tento jev se označuje jako sezónní neplodnost a jeho typickým projevem je zvýšená míra potratů v rané fázi březosti. Mechanismy, které toto způsobují, jsou velmi komplikované a nejsou zcela pochopené. Jistou roli hraje ve snížení plodnosti prasnic vývoj folikulů a hladina ovariálního progesteronu a bylo potvrzeno, že vývojová kompetence oocytu je během období sezónní neplodnosti snížena. Oocyty vyjmuté v létě z velkých folikulů (5 – 8 mm v průměru) měly ve srovnání s oocyty vyjmutými v zimě z malých folikulů (3 – 4 mm v průměru) značně sníženou kapacitu pro vývin v blastocysty. Je tudíž prokazatelné, že rozdíly ve velikosti oocytů a v ročním období, ve kterém se oocyty vyvíjejí, souvisejí se změnami ve složení folikulární tekutiny, která podporuje získání vývojové kompetence oocytu (Bertoldo et al. 2013).

Jedním z následků klimatických změn je zvýšení průměrné teploty ovzduší v mnoha oblastech světa. Studie zabývající se faktory spojenými se sezónní neplodností v tropických a subtropických regionech odhalily, že embryonální vývoj je citlivý na krátkodobá zvýšení tělesné teploty vznikající nárůstem teploty ovzduší. U skotu byl potvrzen negativní vliv zvýšené teploty během jevu El Niño na počet, proporce a kvalitu embryí. Teplotní stres ovlivňuje mnoho složek rozmnožování, jako jsou hladiny gonadotropinů, folikulární růst, syntéza steroidních hormonů a embryonální vývoj (Ashworth et al. 2009).

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím kvalitu oocytů a potažmo vývoj embryí je výživa. Obzvláště u prasnic a skotu má výživa matky před zapuštěním a početím na březost a přežití embrya větší vliv než výživa po spáření. Prasničky, které byly krmeny během estrálního cyklu před pářením 2,8x větším objemem krmné dávky než ostatní samice, měly vyšší procento přeživších embryí a jejich blastocysty byly větší a při pozorování v *in vitro* podmínkách měly zvýšenou metabolickou a sekreční aktivitu. U potomků těchto samic také byla nižší variabilita v jejich vývinu, porodní váze a životaschopnosti. Přestože přesné mechanismy těchto účinků nejsou známy, bylo potvrzeno, že prasnice, které byly během 4. týdne laktace krmeny dle jejich libosti, měly větší folikuly, větší počet oocytů dosahujících MII fáze a vyšší míru embryonálního přežití než samice, které ve stejném období konzumovaly pouze 50 % krmné dávky. Folikulární tekutina adlibitně krmených samic lépe podpořila zrání oocytu. Je tudíž jisté, že pozitivní vliv výživy na zrání oocytu a jeho kvalitu je základním klíčem pro embryonální přežití a fetální růst (Hunter 2000).

Vliv výživy na kvalitu oocytů začíná v době, kdy jsou vybrané primordiální folikuly předurčeny k růstu. Nedostatečná výživa v tomto období způsobuje snížení počtu rekrutovaných folikulů, a tudíž i počet ovulace schopných oocytů. Relativně krátkodobé změny v množství či složení stravy prasnic v klíčových stádiích v procesu reprodukce poskytují prostředky pro zlepšení reprodukční schopnosti při minimalizování vlivu prostředí. Je vhodné používat doplňky stravy vyrobené na míru k použití v konkrétních fázích reprodukčního cyklu, čímž dojde ke zlepšení reprodukční schopnosti jak u generace zvířat konzumujících toto krmivo

díky zlepšení kvality jejich gamet a vývojové kompetence, tak u jejich potomků zlepšením vývoje jejich fetálních gonád (Ashworth et al. 2009).



Obrázek 5: Vnější faktory ovlivňující kvalitu folikulu a oocytu a intrafolikulární komunikace ovlivňující kvalitu oocytu (označen zeleně). Nejkratší šipka značí kumulární buňky, středně dlouhá šipka folikulární tekutinu (označena červeně) a nejdelší šipka granulózní buňky. Upraveno podle: Hunter (2000)

3.4 Ovulace oocytů

3.4.1 Preovulační expanze kumulárního obalu

Preovulační nárůst gonadotropinů podněcuje produkci hyaluronové kyseliny kumulárními buňkami, která se váže na kumulární buňky, zvětšuje jejich mezibuněčné prostory a vytváří mucinózní matrix. Expanze kumulu u myši či potkanů probíhá po GVBD, kdežto u prasnic GVBD předchází. V *in vitro* podmínkách je expanze u myši stimulována FSH, kdežto u prasnic lze použít FSH i LH, které zvyšují hladinu cAMP nutnou pro expanzi kumulu (Procházka et al. 1991).

Expanze kumulu je založená na syntéze glykosaminoglykanu bohatého na kyselinu hyaluronovou do extracelulárního prostoru, kde působí jako strukturální složka expandovaného kumulu a jako signální molekula regulující meiotické zrání oocytů. Kyselina hyaluronová je nejhojněji zastoupeným proteoglykanem extracelulární matrix expandovaného kumulu. Dalšími strukturálními látkami podílejícími se na expanzi kumulu jsou například chondroitin sulfát, keratan sulfát či heparan sulfát (Nevoral et al. 2015).

Nárůst gonadotropinů a potažmo expanze kumulu jsou pro ovulaci důležité, protože inhibice syntézy kyseliny hyaluronové nebo její vazby na kumulární buňky v podmínkách *in vivo* výrazně snižuje míru ovulace. Vyjmutím oocytu z kumulárního obalu dochází u myši kvůli nepřítomnosti FSH k zabránění syntézy kyseliny hyaluronové kumulárními buňkami, avšak společná kultivace kumulů stimulovaných FSH s vyjmutými oocyty umožňuje expanzi kumulů. Plně dospělé oocyty produkují faktor umožňující expanzi kumulu (*cumulus expansion-enabling factor* – CEEF), díky kterému jsou myši granulózní buňky schopné reagovat na FSH produkcí kyseliny hyaluronové. CEEF produkovanými prasečími oocyty není nezbytnou látkou pro zahájení expanze. Přesto se ukázalo, že po kultivaci těchto oocytů s přidavkem myších FSH stimulovaných kumulů došlo k expanzi kumulu. Expanze kumulu po vyjmutí prasečího oocytu z jeho COC nenastala. CEEF

produkovaný prasečími oocyty je nezbytný pro zahájení určitých funkcí, ale syntéza kyseliny hyaluronové mezi ně nepatří (Eppig 2001).

3.4.2 Ovulace oocytů

U prasnice k ovulaci dochází v období estru a je vyvolána zvýšenou sekrecí LH. Hladina LH stoupá až na 4 – 5 ng/ml a ovulace přichází přibližně 40 – 48 hodin po tomto vzestupu. U hormonálně stimulovaných samic za účelem simulace endogenního nárůstu gonadotropinů nastává ovulace 40 – 42 hodin po injekci LH podané těsně po začátku estru. Mezi jednotlivými plemeny a chovnými liniemi se mohou objevovat drobné rozdíly v reakci na hormonální stimulaci. Při nesprávné detekci říje za nepřítomnosti prubíře může dojít ke zdánlivě rychlejšímu nástupu ovulace po začátku estru. Meiotické události v diakinezi, metafáze I a vydělení prvního pólového tělíska se však řídí přesným časovým rozvrhem a jsou následovány začátkem estru, není tudíž možné, aby byly urychleny (Hunter 1977).

LH spouští biochemickou kaskádu vedoucí k prasknutí preovulačních folikulů, vypuzení oocytů a vytvoření žlutého tělíska. V procesu ovulace jsou zahrnuty lokálně působící steroidy, prostaglandiny a peptidy. Ovulace u prasnice trvá v rozmezí 1,8 až 4,6 h a začíná v průměru 35 ± 8 h po začátku estru (Kanitz et al. 2001).

Aby mohlo dojít k vypuzení oocytu, musí dojít k roztržení husté kolagenní thekální tkáň folikulu a přilehlé *tunica albuginea* na povrchu vaječníku. Tento jev je způsoben narušením kolagenových vláken folikulární stěny (Espay & Rondell, 1968).

Před ovulací spouští LH vlna kaskádu proteolytických enzymů, mezi něž patří aktivátor plazminogenu (PA – *plasminogen activator*), plazmin a matrixové metaloproteinázy (MMPs – *matrix metalloproteinases*). Tyto enzymy způsobují degradaci folikulární matrix a rozklad sítě kolagenových vláken, které dodávají folikulární stěně pružnost. Inhibice některého z těchto enzymů vede ke snížení míry ovulací. Zvýšená ovariální proteolytická aktivita spojená s ovulací je řízena lokálně syntetizovanými inhibitory. Mezi ně patří inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) a inhibitor matrixových metaloproteináz 1 (TIMP-1). Zvýšená syntéza těchto inhibitorů v thekálních buňkách zajišťuje vývoj rostoucích folikulů a chrání je proti účinku proteolytických enzymů produkovaných ovulujícími folikuly (Tsafirri & Reich 2009).

Při ovulaci dochází k vypuzení poměrně velkého množství folikulární tekutiny, jejíž část je spolu s COC transportována do vejcovodu. Na základě měření obsahu progesteronu v tekutině vejcovodu bylo zjištěno, že po ovulaci ve vejcovodu zůstává méně než 1 % folikulární tekutiny. Úloha folikulární tekutiny během oplození ale nebyla objasněna (Brüssow et al. 1999).

Po ovulaci dochází k rychlému transportu oocytů z řasnaté části nálevky vejcovodu do místa oplození v ampulo-isthmickém spoji, což je z velké části umožněno peristaltickými vlnami vejcovodu v dané oblasti. U prasnice do tohoto místa doputují oocyty obklopené kumulárními buňkami přibližně 30 – 45 minut po začátku ovulace (Hunter 1977).

U některých druhů hospodářských zvířat, jako je ovce či skot, kumululus 3 – 6 hodin po ovulaci mizí, tudíž během oplození není přítomný. Nicméně biochemické reakce, které kumulární buňky spouští v těsné blízkosti oocytu, mohou pomoci vytvářet specifické prostředí kolem oocytu, které je vhodné pro oplození v podmínkách *in vivo*. Mezi funkce

kumulu během ovulace a těsně po ní pravděpodobně patří iniciace vypuzení oocyty, zachycení oocyty řasinkovými epiteliálními buňkami nálevky vejcovodu a zajištění jeho transportu do místa oplození (Tanghe et al. 2002).

3.5 Oplození oocytů

Folikulární tekutina má pravděpodobně i během oplození jistou roli, jelikož se těsně po ovulaci, kdy se oocyt přemísťuje do ampule vejcovodu, mění pH ovidukální tekutiny na mírně zásaditou (Brüssow et al. 1999)

Mezi možné úlohy kumulu při oplození patří zabránění změn oocyty, které jsou nevhodné pro následné oplození – například tvrdnutí ZP způsobené předčasnou exocytózou kortikálních granulí, dále vytvoření prostředí, které podporuje kapacitaci spermií, akrozomální reakci a proniknutí spermie do oocyty, a zvýšení množství oplození schopných spermií kolem oocyty (Tanghe et al. 2002).

Savčí kortikální granula jsou váčky specifické pro oocyty, které vytváří vrstvu v podkorové oblasti plně dorostlých oocytů a plní důležité funkce během oplození, mezi něž mimo jiné patří zabránění polyspermie. Správné fungování kortikálních granulí je často považováno za znak cytoplazmatického zrání oocyty (Miao et al. 2018).

Meioticky zralý oocyt, který má vydělené první pólóvé tělísko a vstupuje do MII bloku, čeká na oplození spermií. K oplození obvykle dochází, když je oocyt meioticky zralý a zahájení procesů spojených s oplozením je spuštěno v momentě, kdy spermie splyne s plazmatickou membránou oocyty. Následná aktivace zralého oocyty je charakterizována exocytózou kortikálních granulí, výstupem z MII bloku a vydělením druhého pólóvého tělíška, následovaným vytvořením prvojader. Přestože jsou zrání oocyty a jeho aktivace spuštěny jinými stimuly, existuje řada důkazů, že jsou oba tyto procesy regulovány hladinou volných intracelulárních vápníkových iontů. U prasečích oocytů spermie spouští sérii kolísání hladiny vápníkových iontů či repetitivní vlny jejich uvolňování, které se opakují po několik hodin. Studie zabývající se partenogenetickou aktivací oocytů ukázaly, že nárůst hladiny Ca^{2+} je dostačujícím spouštěčem raného embryonálního vývoje. Injekcí Ca^{2+} přímo do oocytů či přidáním ionoforů vápníku vede k spuštění exocytózy kortikálních granulí, dokončení meiózy a dosažení určitého stupně vývoje (Homa et al. 1993).

U prasnice je aktivace oocyty indukována průnikem spermie, který vyvolává sérii nárůstů Ca^{2+} trvající asi 3 hodiny. Při pokusech v *in vitro* podmínkách byl injekcí extraktu spermií vyvolán okamžitý nárůst Ca^{2+} následovaný jeho krátkými vlnami (Sun & Nagai 2003).

Uvolnění vápníkových iontů z intracelulárních zásob oocyty závisí na signální kaskádě fosfatidylinositolu. Oplozující spermie dodává faktor označovaný SOAF (*sperm-borne oocyte-activating factor*) nutný pro zahájení uvolnění intracelulárního vápníku. Při tomto procesu je pomocí fosfolipázy C (PLC – *phospholipase C*) štěpen fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP₂) na inositol 1,4,5-trisfosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG). IP₃ potom spouští uvolnění vápníkových iontů z endoplazmatického retikula (ER) pomocí navázání na IP₃ receptory lokalizované na membráně ER (Aarabi et al. 2014).

Transport samičích a samčích gamet vejcovodem v opačných směrech je částečně zprostředkovaný díky pohybu cílů vejcovodu a peristaltických stahů hladkého svalstva ampule a isthmu vejcovodu (Hunter 1977).

Aby mohlo dojít k oplození oocytu, musí se kapacitované spermie dostat skrz extracelulární matrix k COC. Například křeččí spermie rozrušují makromolekulární strukturu matrix COC. Lidské či myší spermie vykazují hyaluronidázovou aktivitu spermiového proteinu PH-20 na plazmatické membráně spermie. V *in vitro* podmínkách může být obal z kumulárních buněk odstraněn například mechanickým odpipetováním či použitím enzymu hyaluronidázy. Tato metoda však u skotu a prasnic vede ke snížené míře oplození. Kumulární buňky v *in vivo* prostředí jsou schopné zvýšit počet oplozeních schopných spermií kolem oocytu díky navádění hyperaktivovaných spermií k jeho povrchu procesem zvaným chemotaxe (Tanghe et al. 2002).

Rozpoznávání prasečích gamet a jejich splynutí zahrnuje rozpoznávací molekuly na spermii a vajíčku. Proteiny spermie interagují s proteiny *zony pellucidy* oocytů, což má za následek akrozomální reakci a penetraci oocyту spermii. Protein zodpovědný za primární rozpoznání a navázání spermie je ZP3. U prasnice je protein ZP1 schopen se navázat na proakrozin a protein spermie o molární hmotnosti 44 kDa. ZP1 je proto označován jako sekundární receptor pro navázání spermie na oocyt. Proakrozin je protein o molární hmotnosti 53 kDa a díky jeho afinitě ke glykoproteinům *zony pellucidy* hraje klíčovou roli v počátečních stádiích interakce oocytu a spermie. Jeho další funkcí je udržení navázané spermie na oocytu během akrozomální reakce. Dalšími proteiny zapojenými v procesu navázání spermie na oocyt jsou například zonaadheziny či spermadheziny, mezi něž patří AQN-1, AQN-3, AWN1 a AWN2. Spermadhezin AWN1 se váže na oligosacharidy *zony pellucidy* prasečích oocytů (Sun & Nagai 2003).

U prasnice je proces splynutí gamet závislý na utvoření mikrofilament v oocytu, která způsobí spojení plazmatické membrány spermie a oolemy oocytu. Použitím cytochalazinu B dochází k rozrušení aktinových mikrofilament a k následnému zabránění oplození. Použití tohoto disruptoru také způsobuje zabránění defosforylace MAP kinázy a průniku spermie do oocytu. Oocyty ošetřené cytochalazinem B mimo jiné vykazují sníženou míru utváření prvojader (Sun et al 2001c).

Normální oplození zahrnuje proniknutí jediné spermie do cytoplazmy oocytu a fúzi oocytu se spermii, která vyvolává sérii událostí vedoucích k aktivaci oocytu. Úspěšné oplození vede k vydělení druhého pólového tělíska, vytvoření samčího a samičího prvojádra, jejich migraci a splynutí v jedno prvojádro a k prvnímu mitotickému dělení. Blok zamezující proniknutí dalších spermií se nachází ve vnitřní části ZP a je vytvořen krátce po aktivaci oocytu. To však nezabraňuje proniknutí spermií do vnější části ZP již oplozených oocytů (Hunter 1977).

K abnormálnímu oplození dochází, pokud jsou mikrotubuly dělicího vřeténka neuspořádané, což bývá způsobeno postovulačním stárnutím oocytu. Důsledkem stárnutí může být zadržení druhého pólového tělíska, jehož důvodem je nejspíše narušení orientace mikrotubulů dělicího vřeténka (Hunter 1977).

Aby mohlo dojít k vydělení druhého pólového tělíska do perivitelinního prostoru, směřuje dělicí vřeténko během metafáze II kolmo k povrchu oocytu. Natočení dělicího vřeténka je řízeno stahy mikrotubulů vřeténka a může být inhibováno účinkem cytochalasinů. Při vystavení oocytu cytochalasinům může také namísto vydělení druhého pólového tělíska dojít k vytvoření druhého samičího prvojádra (Sun & Schatten 2006).

Nesprávné uspořádání mikrotubulů dělicího vřeténka následně vede k chromozomovým anomáliím, vzniku triploidie, fragmentaci cytoplazmy či degeneraci organel. Kvůli těmto abnormalitám je oocyt předurčen k rané embryonální smrti. Abnormální oplození také

následuje po průniku více spermií do oocyty, což může být částečně způsobeno i neefektivní regulací počtu spermií isthmem (Hunter 1977).

Během oplození homogenní rozmístění mitochondrií v cytoplazmě oocyty mizí a mitochondrie migrují do oblasti kolem jádra. Shlukování mitochondrií v okolí jádra poukazuje na možnost zvýšené potřeby ATP a volných vápníkových iontů během tvorby a syngamie prvojadra (Sun et al. 2001b).

3.6 Stárnutí oocytů

U savců jsou čerstvě ovulované oocyty zadrženy ve druhém meiotickém bloku a mají vydělené první pólóvé tělísko. Pokud brzy po ovulaci nedojde k oplození, neoplozené oocyty zůstávají ve vejcovodu či podmínkách *in vitro* a dochází ke zhoršení jejich kvality a vývojového potenciálu procesem zvaným postovulační stárnutí oocytů. K oplození by mělo u prasnice dojít ideálně do 10 hodin po ovulaci (Takahashi et al. 2013).

Manipulace s tímto přirozeným časovým limitem se zejména u druhů, u nichž lidé mohou řídit počet ovulací nebo genetické složení potomstva, objevují čím dál častěji. Výsledkem takovýchto zásahů pak bývá oplození stárnoucích oocytů (Fissore et al. 2002).

Postovulační stárnutí oocytů způsobuje podobné chyby funkce oocytů a embryonálního vývoje jako stárnutí vaječníků způsobené rostoucím věkem samice (Takahashi et al. 2013).

Postovulační stárnutí je doprovázeno různými molekulárními, buněčnými a biochemickými změnami. Mezi následky stárnutí oocytů patří například snížená míra oplození a tvorby blastocyst, polyspermie, digynie (stav, při kterém dojde k oplození diploidního oocyty haploidní spermií, jehož následkem je triploidní zygota), partenogeneze, chromozomální anomálie, apoptóza, zvýšená citlivost vůči aktivačním stimulům, začátek anafáze II, částečná exocytóza kortikálních granulí, změna struktury a ztvrdnutí *zony pellucidy* (*zona pellucida hardening*), snížení aktivity MPF a MAP kinázy, epigenetické změny a abnormální či postižený vývoj embryí či plodů. Mezi morfologické změny ve stárnoucím oocyty patří zvětšení perivitelinního prostoru a degenerace prvního pólóvého tělíska (Miao et al. 2009).

Jedním z negativních důsledků postovulačního stárnutí oocytů je navození partenogenetické aktivity. Během ní dochází k výstupu neoplozeného oocyty z druhého meiotického bloku, vydělení druhého pólóvého tělíska a následnému vzniku prvojadra. Dalším důsledkem stárnutí oocytů může být abortivní spontánní aktivace oocyty (SEA – *spontaneous egg activation*). Chromozomy jsou ve spontánně aktivovaném oocyty roztroušené v jeho cytoplazmě. Takové oocyty jsou zastaveny v meiotickém bloku připomínající metafázi dalšího neboli třetího meiotického zrání. Brzy po ovulaci, kdy se začíná vydělovat druhé pólóvé tělísko, se začne přesouvat velké množství cytoplazmy do oblasti v okolí druhého pólóvého tělíska, ale úplné dokončení jeho vydělení nikdy nenastává (Prasad et al. 2015).

Kortikální granula se v stárnoucích oocytech přesouvají ze subkortikální oblasti, čímž dochází k narušení cytoplazmatického zrání oocytů. Dalším následkem stárnutí je předčasná exocytóza ovastacinu, složky obsažené v kortikálních granulách zodpovědné za štěpení ZP2 po oplození. Předčasné uvolnění ovastacinu z kortikálních granul do extracelulárního prostoru způsobuje zánik míst pro navázání spermie na *zону pellucidu* neoplozeného oocyty. Tento jev

byl prokázán navázáním menšího počtu spermií na *zonu pellucidu* stárnoucích oocytů a vede ke snížení oplozeníschopnosti (Miao et al. 2018).

Dalším osudem oocytů, které nebyly oplozeny ve vhodnou dobu, může být buněčná smrt, neboli apoptóza. Apoptóza je proces buněčné selekce vyskytující se u všech organismů, který umožňuje eliminaci porušených buněk. Chyby způsobené stárnutím oocytů jsou jednou z nejčastějších příčin apoptózy oocytů po ovulaci (Fissore et al. 2002).

Jedním z mechanismů, kterým během stárnutí oocytů dochází ke snížení jejich kvality a následné apoptóze, je narušení struktury organel, včetně chybného utvoření dělicího vřeténka a polymerizace aktinu a narušení celistvosti mitochondrií (viz Obrázek 6). Aktinová filamenta jsou nezbytnou součástí cytoskeletu zodpovědnou za intracelulární transport, utváření dělicího vřeténka a průběh meiózy. Polymerizace a distribuce aktinu v oocytu může být důležitým mechanismem, jehož změna vede ke snížení kvality oocytů. Mitochondrie jsou jako primární zdroj ATP důležitou součástí normálního vývoje oocytů a raných embryí. Integrita mitochondrií je oxidativním stresem značně snižena, což potvrzuje negativní vliv stárnutí na funkčnost mitochondrií (Miao et al. 2018).

Vzhledem k vyčerpání zásob energie oocytu dochází k produkci reaktivních kyslíkových sloučenin a následné apoptóze. Při ní se oocyt smršťuje, jeho membrána se začíná rozpouštět a cytoplazma je fragmentována, vytváří granula a degeneruje (Prasad et al. 2015).

Další chybou vedoucí k apoptóze je snížení exprese antiapoptotického faktoru Bcl2 a zvýšení aktivity kaspáz. I v případě, že průběh navázání spermie na *zonu pellucidu* a splynutí s oolemou není narušen, normální aktivace stárnoucího oocytu a zahájení embryonálního vývoje mohou být ohroženy. Během oplození spermie produkují inositol 1,4,5-trifosfát (IP₃), který se váže na IP₃ receptory umístěné na endoplazmatickém retikulu oocytu. Navázání IP₃ na receptory vyvolává vlny Ca²⁺. U stárnoucích oocytů však dochází k poklesu funkčnosti IP₃ receptorů a následnému vyčerpání zásob Ca²⁺ v endoplazmatickém retikulu. V důsledku narušení homeostázy vápníku vykazují stárnoucí oocyty při oplození abnormální vlny Ca²⁺, jejichž frekvence je výrazně vyšší a amplituda nižší než u oplozených oocytů, u kterých ještě nedošlo k negativním změnám spojených s postovulačním stárnutím. Tyto abnormální výkyvy hladiny vápníkových iontů jsou další příčinou apoptózy stárnoucích oplozených oocytů (Lord & Aitken 2013).

Tyto změny společně s nepříznivými účinky reaktivních oxidativních sloučenin a metabolitů stárnoucích oocytů mohou kromě apoptotického rozpadu nebo partenogenetické aktivace vést k neregulovanému rozkladu a následnému zániku oocytu procesem zvaným lýza oocytů (Petrová et al. 2004).

Mezi hlavní vlastnosti lytického oocytu patří natržení plazmatické membrány a ztráta celistvosti oocytu samotného. Jednou z látek zabraňující lýze oocytu je p38 MAP kináza, která hraje roli při meiotickém zrání prasečích oocytů. Pokud je p38 MAP kináza fosforylována, dochází k její aktivaci. Po znovuoobnovení meiotické aktivity je p38 MAP kináza aktivována až do MII bloku. Inhibicí p38 MAP kinázy je zastaven buněčný cyklus oocytu. Použití inhibitoru p38 MAP kinázy o koncentraci nižší než 5 μm nemá na stárnutí oocytu žádný vliv, avšak pokud množství použitého inhibitoru p38 MAP kinázy přesáhne 5 μm, dochází k lytickému rozpadu oocytu (Petrová et al. 2009).

Zhoršení kvality oocytů způsobené postovulačním stárnutím může silně ovlivnit výsledek *in vivo* i *in vitro* oplození, jelikož oocyt poskytuje faktory, kterými jsou řízeny rané události

embryogeneze, remodelace genomu a opravy poškozené DNA u samičího i samčího prvojádra. Výskyt stárnutí oocytů bohužel není neobvyklý. U většiny savčích druhů se páření objevuje pouze v době ovulace, která je určena estrálním chováním. To má za následek určitou synchronizaci uvolnění oocytů a dopravení spermií do reprodukčního traktu samice. U některých živočišných druhů však vizuální příznaky ovulace chybí, a nemůže tudíž být zajištěna synchronizace páření s ovulací a oocyty následně stárnou. Postovulační stárnutí značně ovlivňuje plodnost, nicméně molekulární mechanismy řídící tento proces nejsou dobře objasněné. Není jisté, zdali jedna událost spouští kaskádu dalších faktorů, nebo zda dochází k několika jednotlivým biochemickým a funkčním změnám, které společně způsobí stárnutí oocytů (Lord & Aitken 2013).

Kontrola nad stárnutím oocytů při manipulaci se zralými oocyty by měla přinést výhody pro reprodukční biotechnologie, jako je například klonování přenosem jader. Mezi takové výhody patří například odbourání omezení limitu doby potřebné pro manipulaci s oocyty, což by umožnilo mít dostatek času na vylepšení kvality oocytu pro příjemkyni. Zlepšení kritérií potřebných pro řízení stárnutí oocytů by jistě napomohlo vývoji současných i nových metod reprodukčních biotechnologií. Jednou z metod umožňující kultivaci oocytů po delší dobu je například použití přídavku kofeinu. Tato metoda je velice jednoduchá, efektivní a pro vývoj reprodukčních biotechnologií nápomocná, přesto je nutné zvážit veškeré aspekty bezpečnosti jejího použití (Kikuchi et al. 2002).

Zvýšením koncentrace pyruvátu v kultivačním médiu oocytů dochází k oddálení nástupu stárnutí. Přídavek pyruvátu zajišťuje udržení integrity kortikálních granul, snížení citlivosti oocytů vůči aktivačním stimulům, zabránění poklesu hladiny MPF a GSH spojeného s procesem stárnutí a oddálení nástupu apoptózy oocytů. Dodáním pyruvátu dochází k oddálení stárnutí díky prodloužené produkci ATP v oocytech a současnému udržování intracelulárního redoxního potenciálu (Lord & Aitken 2013).

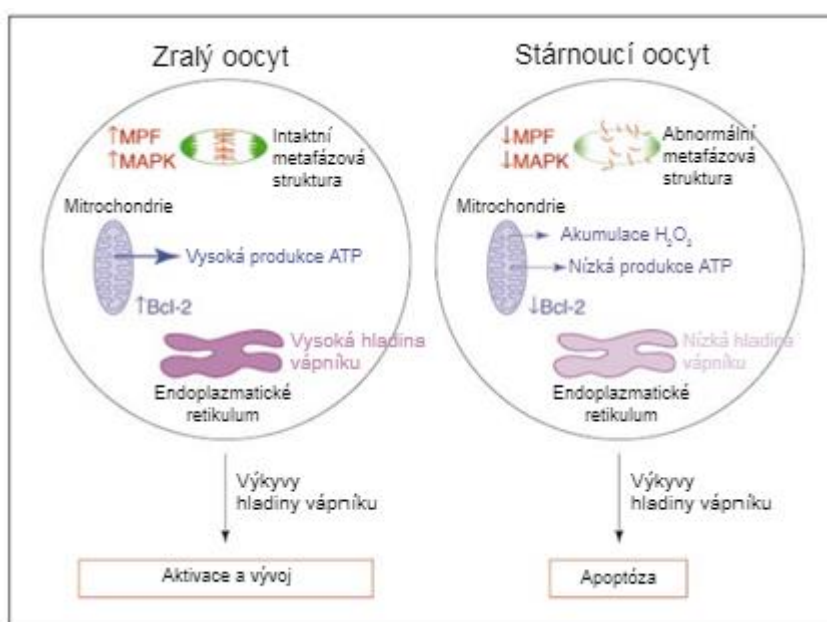
Dalšími molekulami schopnými oocytům poskytovat ochranu před stárnutím jsou gasotransmitery. Jednou z takových molekul je sulfan (H_2S), který se u prasnic podílí během meiotického zrání oocytů na řízení MAP kinázové aktivity a expanzi kumulu. Snížená produkce H_2S je pravděpodobně jedním z biochemických markerů stárnutí oocytů a inhibice produkce endogenního H_2S vede k apoptóze oocytu. Hydrogensulfid sodný (NaHS) je exogenním donorem H_2S , který může pomoci zmírnit mitochondriální dysfunkce a potlačit signální kaskádu kaspázy-3 a zabránit apoptóze oocytu (Krejčová et al. 2015).

Mezi další gasotransmitery ovlivňující stárnutí oocytů patří oxid dusnatý (NO) a oxid uhelnatý (CO). Produkce NO probíhá díky syntáze oxidu dusnatého (NOS – *nitric oxide synthase*), enzymu vyskytujícímu se ve třech izoformách – endoteliální (eNOS), neuronální (nNOS) a indukovatelná (iNOS). Oxid dusnatý slouží v buňkách kardiovaskulárního systému a nervových tkáních jako buněčný přenašeč a podílí se na ochraně neuronů před jejich apoptózou. NOS se vyskytuje ve všech třech izoformách i ve vaječnicích, kde se účastní folikulogeneze, meiotického zrání a ovulace (Nevoral et al. 2013; Nevoral et al. 2016).

Správný průběh meiotického zrání je klíčový pro vytvoření oplozeních schopných a vývojově kompetentních oocytů. Nízké hladiny NO stimulují meiotické zrání a vysoké hladiny naopak udržují oocyt v meiotickém bloku a způsobují jeho vývojové vady (Němeček et al. 2017b).

Přítomnost NO ve vaječnýchích je nezbytná pro rozpad zárodečného vaku a přechod z metafáze I do metafáze II. U prasnic má NO schopnost vyvolat aktivaci oocyty. Relokalizace izoform NOS ve stárnoucích oocytech společně s přítomností NO svědčí o jejich schopnosti oddálit stárnutí oocyty. Účinek inhibice NOS ve stárnoucích oocytech pravděpodobně spočívá v zabránění apoptózy a potlačení lýzy oocytů (Nevoral et al. 2013; Nevoral et al. 2016).

Sirtuiny jsou deacetylázy, u kterých byla potvrzena schopnost zmírňovat vliv stresových faktorů na stárnoucí buňky a které mají pozitivní vliv na závažná onemocnění, jako je snížení výskytu rakoviny, kardiovaskulárních chorob či smrti nervových buněk. Sirtuin1 (sirt1) je známý jako regulátor redoxní rovnováhy při meiotickém zrání oocytů, čímž zajišťuje normální uspořádání dělicího vřeténka. U prasečích oocytů stárnoucích v *in vitro* podmínkách je hladina sirt1 nižší, což má za následek jeho nižší expresi a aktivitu. Resveratrol je schopen aktivovat sirt1, což má za následek opravu uspořádání dělicího vřeténka, redistribuci kortikálních granulí a mitochondrií a následné zvýšení kvality stárnoucích oocytů. Uvolnění obsahu kortikální granulí do perivitelinního prostoru může zabránit polyspermii. Při předčasné exocytóze granulí dochází ke zvětšení perivitelinního prostoru, což umožňuje více spermii proniknout do stárnoucího oocyty. Ztráta aktivity sirt1 vede k zabránění komunikace mezi jádrem a mitochondriemi během stárnutí oocytů. Při obnově této komunikace a správného fungování mitochondrií díky účinkům resveratrolu dochází ke zvýšení oplození schopnosti a vývojového potenciálu oocytů (Ma et al. 2015).



Obrázek 6: Schématické srovnání buněčných a molekulárních změn u zralého (vlevo) a stárnoucího (vpravo) oocyty. U stárnoucích oocytů dochází ke snížení hladiny MAP kináz, maturation-promoting factor (MPF), antiapoptotických proteinů (Bcl-2) a vápníku. Dalším příznakem stárnutí oocytů je snížená mitochondriální funkce, která může vést k akumulaci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS) a uvolnění proapoptotických faktorů. Následkem těchto dějů je fragmentace cytoplazmy vedoucí k apoptóze či zástavu vývoje buňky. Upraveno podle: Fissore et al. (2002)

3.6.1 Funkční příčiny stárnutí oocytů

3.6.1.1 Kumulární buňky

Kumulární buňky obklopují a vyživují oocyt během jeho zrání. Oocyty jsou po ovulaci obklopeny komplexem kumulárních buněk, a většina oddělených kumulárních buněk od jejich komplexu zůstává ve vejcovodu v blízkosti oocytu, což značí určitou roli kumulárních buněk při stárnutí oocytů. V přítomnosti kumulárních buněk oocyty ve fázi MII stárnou rychleji. U oocytů obklopených kumulárním obalem stárnoucích v podmínkách *in vivo* i *in vitro* se projevuje vyšší míra jejich spontánní aktivace, fragmentace a degenerace, zrychlený úpadek hladiny MPF a MAP kinázy a nižší počet vytvořených blastocyst než u oocytů tzv. holých – vyjmutých z kumulárního komplexu (Lord & Aitken 2013).

U oocytů stárnoucích v *in vitro* podmínkách byla prokázána snížená vývojová kompetence po aktivaci vývoje. Stárnoucí oocyty netransportují přes mezerové spoje dostatek růstových faktorů kumulárním buňkám. Tato chyba způsobuje apoptózu kumulárních buněk a vede k nízké vývojové kompetenci oocytů. Obousměrnou komunikací přes mezerové spoje poskytují kumulární buňky živiny a ochranu oocytu, a naopak oocyt produkuje růstové faktory zajišťující diferenciaci a správné fungování kumulárních buněk. Když jsou kumulární buňky kultivovány v *in vitro* podmínkách bez přítomnosti oocytů, dochází kvůli nedostatku růstových faktorů odvozených od oocytů k výrazně zvýšenému výskytu jejich apoptózy (Wu et al. 2011).

Dalším vysvětlením urychleného stárnutí oocytů způsobeného kumulárními buňkami může být úloha ceramidu. Ceramid je jednou ze základních stavebních složek bioaktivních sfingolipidů a je produkován kumulárními buňkami. Pravděpodobně má zodpovědnost za dysfunkci mitochondrií a následné postovulační stárnutí a apoptózu oocytů (Lord & Aitken 2013).

Vzhledem k jistému pravděpodobnému vlivu mitochondrií na stárnutí oocytů se předpokládá, že při stárnutí oocytu dochází ke změnám regulace syntézy a transportu ceramidu, což má za následek zabránění ceramidu v dosažení normálních hladin v mitochondriích. Tato lipidová dysbalance vede ke snížené funkčnosti mitochondrií, a tudíž i k negativnímu vlivu na kvalitu oocytu. Ceramid a potažmo i mitochondrie hrají důležitou roli v metabolismu sfingolipidů. Signalizace ceramidu zahrnuje komplexní síť molekul a subcelulárních organel zodpovědných za různé buněčné procesy, jako je například přežití, nekróza, proliferace, diferenciaci či stárnutí, což dokazuje jistou spojitost genů zodpovědných za syntézu sfingolipidů s životností oocytů a dalších buněk (Kujjo & Perez 2011).

3.6.1.2 Mitochondriální dysfunkce

Dysfunkce mitochondrií může být dalším možným důvodem procesu postovulačního stárnutí. Správně fungující mitochondrie jakožto primární zdroj energie jsou nezbytné pro normální funkci oocytů a následně raných embryí. Čím déle oocyt po ovulaci stárne, tím se funkčnost jeho mitochondrií zhoršuje, což pravděpodobně negativně ovlivňuje kvalitu oocytů. Narušená celistvost mitochondrií stárnoucích oocytů pozorovaná v *in vitro* podmínkách byla prokázána ztrátou mitochondriálního membránového potenciálu a poklesem tvorby ATP. Poškozením mitochondrií dochází ke zvýšení produkce reaktivních kyslíkových sloučenin

a k uvolnění proapoptotických faktorů, jako je cytochrom c, který spolu s kaspázami a endonukleázami vedou k apoptóze oocyty. Je tudíž pravděpodobné, že dysfunkce mitochondrií je spojícím elementem mezi postovulačním stárnutím oocyty a apoptózou. Mimo to může ztráta mitochondriální celistvosti vyvolat abnormální syntézu proteinů a inaktivaci či ztrátu mitochondriální DNA (mtDNA) (Lord & Aitken 2013).

Přestože jsou mutace mtDNA oocytů způsobené postovulačním stárnutím zodpovědné za snížení kvality oocytů, vzhledem k zasažení pouze malé části mitochondrií se předpokládá, že tyto účinky nejsou příliš výrazné. Na druhou stranu je pravděpodobné, že změny mitochondriálních lipidů či jiná celková poškození struktury mitochondrií související se stárnutím oocytů mají výraznější dopad na celkovou aktivitu mitochondrií, jelikož zasahují všechny mitochondrie najednou (Kujjo & Perez 2011).

Postupná akumulace mutací v mitochondriích a následná dysfunkce vede k apoptóze oocytů. V *in vitro* podmínkách může být apoptóze stárnoucích oocytů zabráněno pomocí mikroinjekce mitochondrií izolovaných z neapoptotických granulárních kumulárních buněk. Po kultivaci takto modifikovaných oocytů po dobu 24 hodin dochází k nárůstu počtu funkčních mitochondrií o 5 % a snížení míry apoptózy těchto oocytů (Perez et al. 2000).

3.6.2 Molekulární příčiny stárnutí oocytů

3.6.2.1 MPF, MAP kináza

Kriticky důležité faktory buněčného cyklu MPF a MAP kináza řídí znovuoobnovení meiotické aktivity u oocytů ve fázi GV a poté zajišťují zadržení oocyty v bloku v MII fázi. U MII stárnoucích oocytů byl zaznamenán postupný pokles koncentrace těchto dvou faktorů a byl spojen se zvýšenou aktivací a fragmentací partenogenetických oocytů. Vysoká aktivita MPF může být zaznamenána u MI či MII savčích oocytů, ale oplozením či partenogenetickou aktivací se spouští její inaktivace, což má za následek výstup oocyty z MII bloku (Kikuchi et al. 2000).

MPF může být v oocytech stárnutých v *in vitro* podmínkách inaktivována fosforylací části katalytické podjednotky (p34Cdc2) či degenerací regulační podjednotky (cyklinu B) a v takovém stavu je označována jako pre-MPF. Akumulace pre-MPF je faktor, který v určité míře řídí stárnutí oocytů pomocí zvýšení náchylnosti oocytů k jejich fragmentaci, následně apoptóze a partenogenetické aktivaci. Snížení míry apoptózy a partenogenetické aktivace může být například dosaženo použitím přídatku kofeinu. Ošetřením oocytů kofeinem dochází ke zpomalení procesu stárnutí, čímž můžeme prodloužit období, ve kterém by mělo dojít k oplození. Defosforylací p34Cdc2 dochází k opětovné aktivaci MPF. Snížení aktivity MPF způsobuje abnormality objevující se během stárnutí oocytů (Kikuchi et al. 2002; Ono et al. 2011).

Během stárnutí oocytů v *in vitro* podmínkách po dobu 12 hodin dochází ke snížení stupně fosforylace MAP kinázy a oocyty mohou být partenogeneticky aktivované. Během prvních 12 hodin dochází podobně jako u MPF k postupnému snižování aktivity MAP kinázy. Hladina MAP kinázy je nejvyšší v MII fázi a poté se postupně během stárnutí oocyty snižuje. V porovnání s čerstvými oocyte jsou stárnoucí oocyty náchylnější k partenogenetické aktivaci, což má za následek oddálení nástupu raného embryonálního vývoje. MAP kináza je signální

molekula důležitá při procesu vytváření dělicího vřeténka. Hraje také pravděpodobně jistou roli v procesu stárnutí oocyty. U savců MAP kináza slouží jako faktor zabraňující apoptóze. V aktivním stavu inhibuje proapoptotické proteiny Bad a Bim. Pokud však inaktivovaná MAP kináza nezabraňuje inhibici těchto proteinů, dochází k následnému rozkladu antiapoptotických faktorů, jako je například Bcl-2. Souběžně s tím dochází k vzestupu hladiny cytochromu c a kyslíkových iontů, které spolu s kaspázami spouští programovanou buněčnou smrt. Tento jev prokazuje, že snížená aktivita MAP kinázy ve stárnoucích oocytech způsobuje fragmentaci jejich cytoplazmy a apoptózu oocytů (Ebeling et al. 2010).

3.6.2.2 Oxidativní stres

Bylo dokázáno, že reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS – *reactive oxygen species*), hlavně peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion (O_2^-) a peroxynitrit ($ONOO^-$) se s nabývajícím časem po ovulaci hromadí ve stárnoucích oocytech v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Produkce těchto sloučenin v MII oocytech probíhá jako vedlejší produkt oxidativní fosforylace, nicméně faktory, které na oocyty v *in vitro* podmínkách působí, jako je vystavení světlu, nedostatek folikulární tekutiny s antioxidanty a zvýšený tlak kyslíku, produkci ROS také nejspíše podporují (Lord & Aitken 2013).

Kumulace reaktivních kyslíkových sloučenin může způsobit narušení dynamické rovnováhy vápníku v oocyty a ovlivnit tak funkci mitochondrií. Přestože oocyty jsou schopné se díky intracelulárnímu glutationu (GSH) bránit poškození kyslíkovými sloučeninami, účinnost tohoto ochranného systému ve stárnoucích oocytech postupně klesá. Zvýšená produkce ROS a ztráta antioxidantní ochrany vede u stárnoucích oocytů ke vzniku oxidativního stresu, který přímo ovlivňuje zahájení jejich apoptózy. Použití antioxidantů může snížit oxidativní stres, tím oddálit proces apoptózy během stárnutí oocytů a zajistit tak delší dobu použití oocytů pro asistovanou reprodukci (Yao et al. 2018).

Oxidativní stres pravděpodobně spouští kaskádu dalších faktorů vedoucí ke stárnutí oocytů a zároveň ovlivňuje řadu biochemických pochodů v oocytech, což má vliv na jeho vitalitu. Spojitost oxidativního stresu s výše zmíněnými kritickými faktory buněčného cyklu, mitochondriální dysfunkcí, apoptózou, zhoršenou homeostázou vápníkových iontů, sníženou mírou oplození, špatným embryonálním vývojem a abnormalitami potomstva je více než pravděpodobná. Také pokles hladiny MPF může být příznakem oxidativního stresu MII oocytů. DNA, proteiny a lipidy v mitochondriích jsou náchylné k oxidativnímu stresu kvůli jejich výskytu blízko zdroje produkce ROS – elektronového transportního řetězce (ETC – *electron transport chain*). Mitochondriální DNA oxidativnímu stresu podléhá kvůli absenci histonů a mechanismů zajišťujících její ochranu a opravu. Oxidativní stres je spojován s poškozováním a delecí mtDNA, ztrátou mitochondriálního membránového potenciálu, zvýšením produkce ROS v ETC a poklesem produkce ATP (Lord & Aitken 2013).

Zvýšená hladina H_2O_2 způsobuje zvýšení exprese proapoptotických faktorů Bax, cytochromu c a zvyšuje aktivitu apoptotického faktoru kaspázy-3. Kaspáza-3 patří do skupiny kaspáz, jejichž postupná aktivace hraje hlavní roli v apoptóze buňky. Zvýšením koncentrace H_2O_2 také dochází ke zvýšení koncentrace volných vápníkových iontů v cytoplazmě oocyty. To má za následek destabilizaci MPF, která vede k výstupu oocyty z MII bloku a k průniku

vápníku do mitochondrií, kde podporuje produkci ROS, poškozují mtDNA a vyvolává tak stárnutí oocytů (Prasad et al. 2015; Yao et al. 2018).

Kultivace v médiu obsahujícím antioxidanty omezuje vznik negativních projevů stárnutí oocytů. Jedním z antioxidantů, který zabraňuje oxidativnímu stresu oocytů, je laminarin (LAM), hlavní zásobní polysacharid řas. Blastocysty pocházející ze stárnoucích oocytů mají oproti normálním blastocystám výrazně menší počet buněk. Použitím laminarinu může být dosaženo snížení produkce proapoptotických faktorů Bax a kaspázy-3, čímž dochází k zabránění apoptózy a k umožnění vytvoření většího počtu buněk blastocyst. Laminarin hraje důležitou roli při snižování hladiny ROS a zároveň zvyšuje koncentraci GSH v oocytu (Yao et al. 2018).

Melatonin je známý pro svou schopnost vychytávat volné radikály a napomáhat tak normálnímu embryonálnímu vývoji. Jedná se o lipofilní molekulu, která vychytává volné radikály. Metabolity melatoninu AFMK a AMK mají detoxikační účinky, čímž mohou eliminovat výskyt volných radikálů. Melatonin tímto mechanismem spolu se svými metabolity může oddalovat stárnutí oocytu, prodloužit tak období, během něhož může dojít k oplození, snižovat vliv oxidativního stresu na molekulární i buněčné úrovni a podporovat tak úspěšnou aktivaci oocytu po oplození a následný embryonální vývoj. I nízká hladina melatoninu může u stárnoucích oocytů vyvolat oproti kontrolním neošetřeným oocytům dramaticky sníženou míru jejich partenogenetické aktivace. U oocytů ošetřených melatoninem a kultivovaných po dobu 24 hodin v *in vitro* podmínkách dochází k tvorbě až dvojnásobného počtu blastocyst než u kontrolní skupiny. Kultivace po dobu 48 hodin však nevede ani u jedné skupiny oocytů k produkci blastocyst, naopak dochází k fragmentaci těchto oocytů a jejich zániku (Wang et al. 2017).

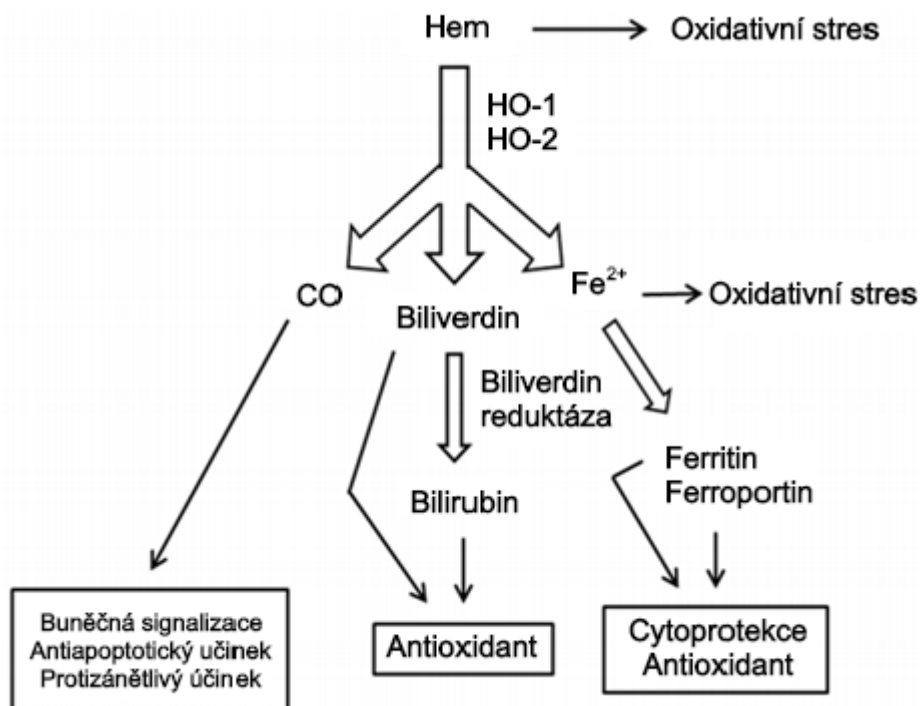
3.7 Hemoxygenáza

Hemoxygenáza (HO) je enzym zodpovědný za katabolismus hemu, který je rozkládán na železo, oxid uhelnatý a biliverdin. Biliverdin vytvořený touto reakcí je rychle přetvářen na bilirubin (viz Obrázek 7). Tímto způsobem buňka může regulovat hladiny hemu a také zpracovávat železo ze starých červených krvinek či jaterních buněk (Abraham & Kappas 2008).

Hemoxygenáza se vyskytuje v buňkách ve dvou aktivních izoformách. Jednou z nich je indukovatelná hemoxygenáza-1 (HO-1), která může být aktivována různými typy stresu, druhá izoforma je konstitutivní hemoxygenáza-2 (HO-2), jejíž úkolem je řídit bazální hladinu CO (Němeček et al. 2017a).

Oba tyto proteiny se skládají ze sekvence 24 aminokyselin, která je považována za vazebné místo pro hem. Součástí obou hemoxygenáz je hydrofobní oblast, jež slouží pro navázání na buněčnou membránu. Rozdíly mezi těmito izoformami spočívají v odlišné enzymatické kinetice, termostabilitě a imunoreaktivitě. HO-1 je protein navázaný na membráně endoplazmatického retikula. Při vystavení buňky stresu může být HO-1 transportován do kaveolů na plazmatické membráně, mitochondrií či jádra. Například v jádře působí HO-1 jako signální molekula při regulaci transkripčních faktorů či ochraně buňky proti stresu. HO-2 je také navázána na membránu endoplazmatického retikula, ale může se také vyskytovat ve vnějších membránách jádra či endozomech. Transkripce HO-2 není aktivována stresovými faktory. Jediným známým aktivátorem genové exprese HO-2 jsou glukokortikoidy.

Tato izoforma je zodpovědná za stabilní produkci CO a vytváří bariéru při ochraně buněk proti poškození (Němeček et al. 2017b).



Obrázek 7: Znárodnění katabolismu hemu pomocí hemoxygenázy (HO-1 a HO-2) na oxid uhelnatý (CO), biliverdin a železo (Fe^{2+}) a jejich účinky nebo účinky jejich metabolitů v buňce. Upraveno podle: Němeček et al. (2017b)

Syntéza HO-1 je vyvolána mnoha stimulanty, mezi něž patří například cytokiny, teplotní šok, těžké kovy, endotoxiny a oxidanty, které vyvolávají zánětlivou reakci. Naproti tomu HO-2 je exprimována neustále a je v největší míře lokalizovaná v mozku a varlatech. U prasat má HO-1 schopnost omezovat míru vazokonstrikce při cévních poraněních a inhibovat proliferaci buněk. HO-2 je ve velké míře exprimovaná v malých cévách v mozku novorozených selat a její produkt oxid uhelnatý způsobuje vazodilataci cév (Harada et al. 2004).

Mezi endogenními intracelulárními antioxidanty má hemoxygenáza-1 důležitou roli při ochraně tkání vůči oxidativnímu stresu (viz Obrázek 7). Tento redoxně-senzitivní indukovatelný enzym je schopný produkovat silný antioxidant biliverdin a oxid uhelnatý, který jako klíčový signální faktor vyvolává mnoho důležitých farmakologických účinků (Babu et al. 2015).

Přestože může konstitutivní hemoxygenáza-2 buňce poskytovat určitou ochranu proti vlivu volného hemu, není možné vyvolat její expresi jako odpověď na vliv stresu. Tento fakt zabraňuje označení HO-2 za hlavní faktor účastnící se ochrany buněk proti negativním účinkům přebytku hemu (Gozzelino et al. 2010).

Hemoxygenáza-1 je považována za zásadní ochranný systém nezbytný k obnovení redoxní rovnováhy způsobené různými formami oxidativního či nitrosativního stresu v buňkách a tkáních (Mottlerlini et al. 2005).

Hem funguje jako prostetická skupina hemoproteinů, díky čemuž může docházet k navázání volných železitých iontů do struktury proteinů. Když dojde v buňce k oxidativnímu stresu, mohou některé hemoproteiny uvolňovat své prostetické hemové skupiny. Tímto způsobem může volný hem v neomezeném rozsahu katalyzovat produkci volných radikálů.

Buňka se těmto pro-oxidačním účinkům může vyhnout různými mechanismy. Ty z velké části zahrnují indukci izoenzymu hemoxygenázy-1, který zvyšuje katabolismus volného hemu a zabraňuje tak vyvolání programované buněčné smrti (Gozzelino et al. 2010).

Hemoxygenáza-1 je kódovaná genem *Hmox1* a má u mnoha různých savců cytoprotektivní schopnost v široké škále buněk a tkání. Delece *Hmox1* u myši má za následek zhoršení experimentálně vyvolaných onemocnění. Výskyt a závažnost mnoha onemocnění u lidí jsou spojovány s polymorfismem *Hmox1* promotoru, který reguluje expresi HO-1. Mezi schopnosti hemoxygenázy-1 také patří zabránění zánětu, čímž chrání buňky a tkáně před poškozením. Farmakologické vyvolání exprese HO-1 nebo ošetření buněk konečnými produkty metabolismu hemu může mít terapeutické účinky na mnoho imunitně zprostředkovaných zánětlivých onemocnění. Je pravděpodobné, že inhibice exprese HO-1 je podstatou patogeneze některých onemocnění, kdy signalizací přes prozánětlivý receptor 4 dochází k podpoře průběhu těchto onemocnění. Ochrana buněk a tkání proti širokému spektru onemocnění je poskytována některými molekulami díky mechanismu závislém na indukci HO-1. Mezi takové molekuly patří například statiny, vaskulární endotelový růstový faktor či oxid dusnatý (Gozzelino et al. 2010).

U savců je rozklad hemu důležitou součástí ovulace oocyty. Po ovulaci se leukocyty, například makrofágy a eozinofily, přesouvají do místa prasknutí folikulu, kde vyvolávají zánětlivou reakci. Přítomnost HO-1 ve vaječniku během tohoto procesu je nutná pro poskytnutí ochrany buněk folikulu. Folikuly, které ovulovaly, v místě ovulace vytváří žluté tělísko, které produkcí steroidních hormonů zajišťuje nástup a udržení březosti. U potkanů byl prokázán vliv hemoxygenázy-1 na proces steroidogeneze ve vaječnících. HO-1 má také pozitivní vliv na uvolňování gonadotropinů hypofýzou (Zenclussen et al. 2011a; Zenclussen et al. 2011b).

Nedostatek hemoxygenázy-1 vyvolává smrt zralých folikulů, protože nejsou chráněny před účinkem zánětlivé reakce a nemohou tedy ovulovat. Pozitivní účinek HO-1 se projevuje i u oocytů, jelikož stejně jako u ostatních typů buněk zabraňuje jejich apoptóze. U zvířat, která mají nedostatek HO-1, dochází k produkci menšího počtu oocytů a přeživší oocyty mají nižší oplození schopnost, což má za následek zhoršení jejich kvality. Vaječnicky ovulující nižší počet oocytů mají méně vytvořených žlutých tělísek, než vaječnicky s dostatkem HO-1. Žlutá tělíska také častěji podléhají apoptóze, s čímž je spojené následné snížení produkce hormonů účastnících se udržení březosti. Inhibicí HO-1 dochází k opožděnému *hatchingu* blastocyst a k abnormální placentaci, což má za následek omezení intrauterinního růstu a následný zánik embrya (Zenclussen et al. 2011a).

Ve zralých i stárnoucích prasečích oocytech se hemoxygenáza vyskytuje v obou izoformách a se zvyšujícím se stářím oocytů se jejich hladina zvyšuje. HO-1 se u meioticky zralých a u stárnoucích oocytů vyskytuje převážně v okolí chromozomů. Během stárnutí oocytů v *in vitro* podmínkách však dochází ke zvýšené expresi HO-1 v cytoplazmě. HO-2 se vyskytuje hlavně v cytoplazmě. Při inhibici HO-1 v prasečích oocytech dochází ke zhoršení procesu stárnutí a ke zvýšení počtu apoptotických oocytů. Apoptóza je vyvolána inhibicí HO-1 po 24 – 48 hodinách stárnutí v *in vitro* podmínkách (Němeček et al. 2017a).

3.8 Oxid uhelnatý, signální dráha HO/CO

Oxid uhelnatý (CO) je bezbarvý hořlavý plyn s hustotou nižší než vzduch. Je to třetí nejznámější látka způsobující otravy organismů, jejíž toxický účinek je vyvolán jejím navázáním na krevní barvivo hemoglobin. CO má oproti kyslíku 200 – 300x vyšší afinitu k hemoglobinu a přibližně 80 – 90 % CO v krvi je navázáno na hemoglobin, čímž dochází k produkci karboxyhemoglobinu. Navázání CO na hemoglobin vedoucí k tvorbě karboxyhemoglobinu nejen snižuje možnost navázání kyslíku, ale také zabraňuje jeho transportu do tkání. Přítomnost karboxyhemoglobinu značí o přítomnosti CO v organismu (Adach & Olas 2018; Wu & Wang 2005).

Ve fyziologických koncentracích funguje CO v buňce jako *messenger* a zastává různé funkce. V některých orgánech má podobnou úlohu jako oxid dusnatý. Například v centrálním nervovém systému má stejně jako NO funkci gasotransmiteru a společně stimulují aktivitu rozpustné guanylátcyklázy, čímž dochází k relaxaci hladkého svalstva a vazodilataci cév v kardiovaskulárním systému (Harada et al. 2004).

CO se váže na cytochrom c oxidázu v mitochondriích nebo na NADPH oxidázu v plazmatické membráně, a tím mírně zvyšuje hladinu ROS v buňce. Nízká koncentrace produkovaných ROS tímto způsobem slouží jako sekundární *messenger* aktivující cytoprotektivní procesy (Němeček et al. 2017b).

Přestože je oxid uhelnatý notoricky známý pro své toxické účinky, jedná se o velice hojného buněčného zprostředkovatele schopného řídit základní fyziologické a signalizační procesy v savčích tkáních (viz Obrázek 7). Vzhledem k produkci oxidu uhelnatého v buňce by potencionální škodlivost této molekuly neměla být zanedbávána. Oxid uhelnatý je produkován endogenně při rozkladu hemu pomocí indukovatelné HO-1 a konstitutivní HO-2 nebo je exogenně dodaný pomocí molekul uvolňujících oxid uhelnatý (CORMs – *CO-releasing molecules*). Lokální produkce CO může být po aktivaci HO-1 značně navýšena, což může vést k přebytku CO v buňce (Motterlini et al. 2005).

Ve fyziologických koncentracích je CO jeden z nejznámějších faktorů zamezujících procesu apoptózy mnoha typů buněk. CO má antiapoptotické, cytoprotektivní a protizánětlivé účinky. U myších endotelových buněk má oxid uhelnatý schopnost zabránit apoptóze díky aktivaci MAP kinázového proteinu p38. V prasečích oocytech se protein p38 obecně účastní meiotického zrání, jeho inhibicí však k partenogenetické aktivaci či fragmentaci a následně apoptóze stárnoucích oocytů nedochází. V potkaních endotelových buňkách CO zvyšuje expresi antiapoptotického faktoru Bcl-2 a současně snižuje expresi proapoptotických faktorů Bid a Bax, což má za následek inhibici apoptózy těchto buněk. Mezi další vlastnosti oxidu uhelnatého patří schopnost snižovat aktivaci kaspáz (Němeček et al. 2017a; Petrová et al. 2009).

Pleiotropní účinky HO-1 v kardiovaskulárním, nervovém a imunitním systému se shodují s počtem aktivit, které byly doposud popsány u CO (Motterlini et al. 2005).

Oxid uhelnatý může vytvářet komplexy s redukovanými formami metaloproteinů, jako jsou například myoglobin, indukovatelná NO syntáza, cytochrom P450, oxidáza cytochromu c a další. Interakce CO s cytochromem P450 nebo oxidázou cytochromu c za účelem narušení redoxní rovnováhy vede k inhibici enzymatické aktivity. Tyto události mohou ve vysokých koncentracích představovat buněčné cíle toxicity CO, nebezpečí také představují vazebné vlastnosti CO na hemoglobin (Ryter et al. 2006; Wu & Wang 2005).

Interakce mezi NO a CO spočívá nejen v kompetitivní vazbě k efektorovým proteinům, ale také v přímé regulaci aktivity NOS a HO. Navázání CO na hemovou skupinu iNOS vede ke snížení aktivity iNOS a následnému omezení produkce NO. Bylo však dokázáno, že NO má schopnost zvyšování exprese hemoxygenáz. Vzhledem k interakcím mezi HO/CO a NOS/NO je oxid uhelnatý považován za inhibitor NOS, který redukuje nadbytečnou produkci NO a s tím spojený oxidativní stres (Němeček et al. 2017b).

Signální kaskáda HO/CO může tudíž být řídicím systémem hladiny NO v oocytu a potažmo i meiotického zrání (Němeček et al. 2017b).

Vzhledem k podobnosti účinků oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého v buňkách různých orgánů je pravděpodobné, že se signální kaskáda zahrnující HO-1 a CO účastní folikulárního vývoje. Během vývoje folikulů většina folikulů podstupuje atrezii, která probíhá na základě apoptózy. Tento proces je regulován různými látkami, jako je faktor nádorové nekrózy- α (TNF- α – *tumor necrosis factor- α*), interleukin-6 a GnRH. Exprese Bcl-2 ve folikulárních buňkách inhibuje apoptózu buněk. Vliv signální kaskády HO a CO na expresi antiapoptotického faktoru Bcl-2 společně se schopností TNF- α indukovat HO-1 by mohly nasvědčovat účasti signální kaskády HO a CO při regulaci apoptózy folikulárních buněk (Harada et al. 2004).

Zvýšená exprese HO-1 v buňkách srdeční svaloviny a pankreatických ostrůvků společně se zvýšenou produkcí CO způsobují snížení tvorby reaktivních kyslíkových sloučenin a zabraňují tak nástupu apoptózy těchto buněk. Tento fakt může nasvědčovat o stejném účinku HO-1 a CO v oocytech. U stárnoucích oocytů má za následek zvýšení hladiny HO-1 nejspíše vysoká produkce reaktivních kyslíkových sloučenin, která je považována za hlavní faktor způsobující negativní změny oocytů během jejich stárnutí. U stárnoucích oocytů také byla zaznamenána zvýšená exprese HO-2, mezi jejíž funkce obecně patří bazální produkce oxidu uhelnatého. Souvislost vysoké hladiny HO-2 ve stárnoucích oocytech s účinkem stresových faktorů není potvrzena, jelikož se výsledky u jiných typů buněk ve studiích na toto téma liší (Němeček et al. 2017a). Ding et al. (2011) potvrdili zvýšenou expresi HO-2 po vystavení kardiomyocytů stresovým faktorům, kdežto Muñoz Sánchez & Chánez-Cárdenas (2014) tuto souvislost u nervových buněk nepotvrdili.

3.8.1 CORM-A1

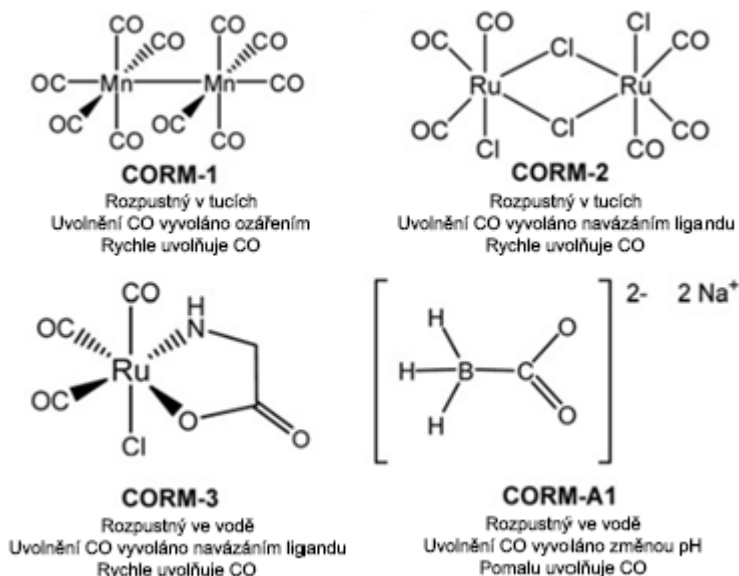
Vědci se s nástupem 21. století snažili vytvořit sloučeninu, která by sloužila jako vektor oxidu uhelnatého. Mezi látky, které by takto mohly oxid uhelnatý dopravovat na místo využití, byly například zařazeny aldehydy, oxaláty či organické kyseliny, ty však byly kvůli jejich toxickým účinkům brzy zamítnuty. Alternativou se tak staly anorganické komplexy obsahující kovový iont, na který by se CO mohl navázat, označované jako CORMs (Adach & Olas 2018).

CORMs je skupina organokovových sloučenin, která v buňkách kontrolovaně uvolňuje oxid uhelnatý. Tyto sloučeniny byly vytvořeny, aby napodobovaly antioxidační, protizánětlivé a cytoprotektivní účinky oxidu uhelnatého (Babu et al. 2015).

Oxid uhelnatý dodaný exogenně ve formě plynu či CORMs by měl zasahovat stejné biologické cíle jako endogenně produkováný CO. Nicméně skutečnost, že je endogenní CO produkován v blízkosti těchto cílů, může značit jisté rozdíly mezi CO endogenním a exogenně dodávaným. Vysoká afinita CO k hemoglobinu může poukazovat na krev jako možnou bariéru při dodávání CO do tkání. Pokud se zvíře nadýchá velkého množství CO nebo jsou mu injekčně

či orálně podány CORMs a hemoglobin bude prvním hemoproteinem, na který se CO naváže, dojde k vytvoření karboxyhemoglobinu a pouze malá část CO může být přenesena do tkáně. To může vysvětlovat, proč jsou vysoké hladiny nadýchaného CO nebo dávky CORMs uvolňující neobvyklé koncentrace CO požadovány k napodobení účinku malého množství endogenního CO (Motterlini & Foresti 2017).

Prvními vytvořenými CORMs byly karbonylové komplexy obsahující kovový iont mangan (CORM-1) či rhutenium (CORM-2), které jsou rozpustné pouze v organických sloučeninách, konkrétně v lipidech (viz Obrázek 8). Tyto dvě látky mohou být bezpečně používány v nízkých koncentracích k vyvolání relaxace cév a hladkého svalstva, zmírnění hypertenze a zabránění apoptóze buněk. Mezi jejich bioaktivní vlastnosti také patří protizánětlivé účinky či imunologická odpověď. CORM-3 byl první ve vodě rozpustný karbonylový komplex obsahující kov ruthenium, který například poskytuje ochranu srdečních buněk při infarktu myokardu. Vědci se snažili vytvořit novou molekulu bez obsahu kovového iontu, jejíž příprava by nezahrnovala nutnost použít plynný CO. Použití organokovových sloučenin v komerčních kitech při radioterapii by mohlo být nepraktické (Motterlini et al. 2005).



Obrázek 8: Srovnání složení jednotlivých CORMs. První řádek obsahuje schémata CORMs rozpustných v lipidech, ve spodním řádku jsou zobrazeny CORMs rozpustné ve vodě. Upraveno podle: Motterlini (2012).

Nekovové CORMs tvoří malou ale neméně důležitou skupinu, mezi jejichž výhody patří jejich jednoduché modifikace a nízká toxicita. Mechanismus uvolňování CO nekovovými CORMs závisí na vystavení krvi či jiným tělním tekutinám. Nekovové CORMs se od kovových CORMs také liší nižším obsahem CO (Adach & Olas 2018).

Molekulou rozpustnou ve vodě schopnou uvolňovat CO a zároveň vyvolávat stejné účinky jako plynný CO je boranokarbonát sodný (*sodium boranocarbonate*) neboli CORM-A1. Na rozdíl od CORM-3 neobsahuje CORM-A1 přechodný kov, ale atom bóru navázaný na karboxylovou skupinu (viz Obrázek 8). V pokojových teplotách jsou vodné roztoky CORM-A1 alkalické a velmi stabilní, nicméně v přítomnosti vodíkových iontů se začínají rozkládat a uvolňovat CO. Čím kyselější roztok je, tím vyšší je aktivita CORM-A1, a dochází tak k rychlejšímu uvolňování CO. Ve srovnání s CORM-3 však CORM-A1 uvolňuje CO pomaleji

a proto napodobuje přirozené účinky CO věrněji. To by mohlo vést k používání CORM-3 spíše při terapii akutních problémů, kde CO slouží jako okamžitá signalizační molekula a CORM-A1 při chronických onemocněních, při nichž je nutné dodávat CO kontrolovaně (Motterlini et al. 2005).

4 Metodika

4.1 Odběr, kultivace a stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách

Vaječníky prepubertálních prasniček byly získávány z místních jatek. Prasečí oocyty byly z vaječnicků získávány aspirací folikulární tekutiny z folikulů o velikosti 2 – 5 mm pomocí injekční stříkačky s jehlou 20G. Pod binokulární lupou byly vyselektovány oocyty s kompaktním kumulárním obalem a neporušenou cytoplazmou. Tyto oocyty byly 3x propláchnuty v kultivačním médiu a kultivovány v čtyřjamkové destičce 4-well multidish (Nunc, Denmark) naplněné 1 ml modifikovaného kultivačního média M199 obsahujícího hydrogenuhličitan sodný (32,5 mM), laktát vápenatý (2,75 mM), gentamicin (0,025 mg/ml), HEPES (6,3 mM), gonadotropní hormony eCG a hCG v poměru 13,5 IU : 6,6 IU/ml a 10% bovinní fetální sérum. Kultivace probíhala při teplotě 38 °C a ve směsi vzduchu a 5 % CO₂ po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách kultivace byly oocyty opakovanou aspirací média s oocyty denudovány a pro následnou kultivaci byly vybrány pouze oocyty s vyděleným prvním pólovým tělískem. Vybrané oocyty byly vystaveny prodloužené kultivaci v modifikovaném kultivačním médiu M199 bez obsahu gonadotropních hormonů při laboratorní teplotě 38 °C a 5 % CO₂ po dobu 24, 48 nebo 72 hodin v závislosti na experimentálním schématu.

4.2 Sledování míry exprese a buněčná lokalizace enzymů HO-1 a HO-2 a aktivované kaspázy-3 v prasečích oocytech

Po uplynutí kultivační doby byla pomocí 0,1% pronázy odstraněna z oocytů *zona pellucida*. Poté byly oocyty fixovány v roztoku 2,5% paraformaldehydu v PBS po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po 30 minutách fixace byl vyměněn fixační roztok za nový. Poté byla membrána oocytu permabilizována v roztoku složeném z 0,5% Tritonu X, fosfátového pufru PBS a přídatku 0,01% BSA. Po uplynutí 5 minut a po 1 hodině byl roztok vyměněn za nový. Poté byly oocyty opláchnuty ve směsi PBS a 0,1% Tween 20 a následně inkubovány s primární monoklonální protilátkou pro HO-1 a HO-2 (anti-heme oxygenase-1 a anti-heme oxygenase-2; ABNOVA, Taiwan; 1:200) nebo s monoklonální protilátkou pro aktivovanou kaspázu-3 (anti-cleaved caspase-3 – Asp175; Cell Signaling Technology, Danvers, USA; 1:400). Oocyty byly inkubovány ve vlhku při teplotě 4 °C přes noc (13 – 16 hodin) v médiu složeného z 0,1% BSA, 0,01 Tween 20 a PBS. Poté byly oocyty třikrát opláchnuty v roztoku 0,1% Tween 20 a PBS a při laboratorní teplotě byly po dobu 1 hodiny kultivovány v 0,1% roztoku BSA a 0,01 Tween 20 v PBS s přídatkem sekundární protilátky anti-mouse IgG konjugovanou s fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany; 1:100) nebo anti-rabbit IgG konjugovanou s fluorescein-5-isothiocyanate (FITC; ThermoFisher Scientific, Rockford, USA; 1:500). Po uplynutí inkubační doby byly oocyty 3x opláchnuty v PBS s 0,1% Tween 20.

Pomocí fluorescenčního barviva 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI; Sigma-Aldrich) byl barven chromatin oocytů. Aby mohla být vyloučena nespecifická vazba sekundární protilátky, byl ke každému z experimentů proveden stejný pokus na kontrolní skupině oocytů, které nebyly inkubovány s primární protilátkou. Po nabarvení byly oocyty pozorovány a snímány

pod konfokálním skenovacím mikroskopem (Zeiss, Germany). Buněčná lokalizace a distribuce proteinů byla vyhodnocena na základě stanovení intenzity signálu pomocí analýzy obrazu NIS Elements 3.4. (Nikon, Japonsko). Získaná data byla vyjádřena jako průměrná intenzita signálu FITC, jež byl snížen o intenzitu nespecifického signálu kontrolní skupiny. Každý experiment byl opakován alespoň třikrát s minimálním počtem 15 oocytů ve každé experimentální skupině.

4.3 Hodnocení *in vitro* stárnutí prasečích oocytů v přítomnosti donoru oxidu uhelnatého CORM-A1

Oocyty byly kultivovány v modifikovaném kultivačním médiu M199 obsahujícím donor CO CORM-A1 (sodium boranocarbonate; Sigma–Aldrich GmbH, Munich, Germany) o koncentracích 25, 50 nebo 100 μM po dobu 24, 48 nebo 72 hodin. Pro vyloučení vlivu nosiče CO (inaktivovaný CORM-A1; iCORM-A1) byla kontrolní skupina kultivována v kultivačním médiu obsahujícím iCORM-A1 o koncentraci 100 μM . Po uplynutí dané doby prodloužené kultivace byly oocyty morfologicky hodnoceny pod binokulární lupou. Poté byly oocyty fixovány v roztoku 2,5% paraformaldehydu v PBS a následně byl vizualizován chromatin prostřednictvím fluorescenčního barviva 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI). Stav chromatinu byl posuzován pod fluorescenčním mikroskopem. Na základě morfologických znaků stárnutí a stavu chromatinu byly oocyty rozděleny do následujících skupin: intaktní oocyty (oocyty ve stádiu metafáze II, anafáze II nebo telofáze II), partenogeneticky aktivované oocyty (oocyty a embrya obsahující prvojádru), fragmentované neboli apoptotické oocyty (oocyty, pod jejichž *zonou pellucidou* se nacházely apoptotické váčky) a lytické oocyty (oocyty, u nichž došlo k narušení integrity cytoplazmy či natržení cytoplazmatické membrány). Každý experiment bude minimálně 3x opakován s minimálním počtem 60 oocytů v každé experimentální skupině.

4.4 Statistické hodnocení

Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Hladina významnosti pro toho hodnocení byla stanovena jako $p < 0,05$.

4.5 Experimentální schéma

Cílem prvního experimentu bylo určit lokalizaci a míru exprese HO-1 a HO-2 v průběhu stárnutí prasečích oocytů. Exprese byla hodnocena u oocytů po 48 hodinách meiotického zrání a dále u oocytů stárnoucích 24, 48 a 72 hodin. Detekce HO-1 a HO-2 byla provedena pomocí imunolokalizace.

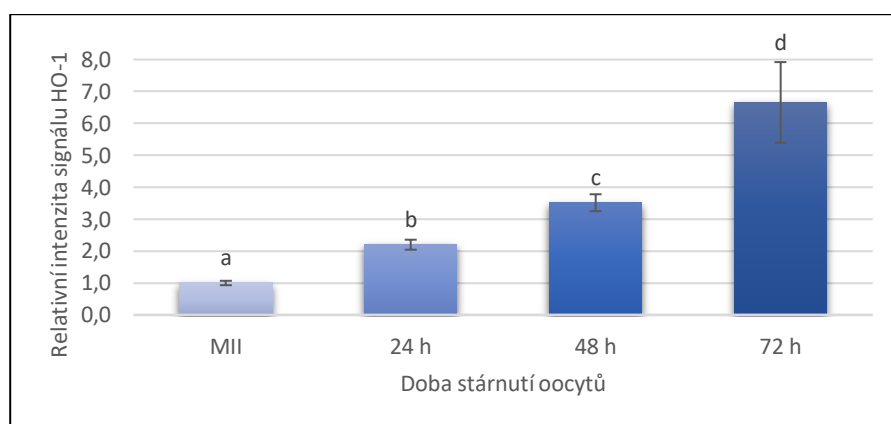
Cílem druhého experimentu bylo sledovat vliv donoru CO CORM-A1 na průběh stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly vystaveny prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 nebo 72 hodin v přítomnosti CORM-A1. Po uplynutí doby kultivace byly oocyty hodnoceny na základě morfologických znaků stárnutí.

Ve třetím experimentu jsme se zaměřili na vliv donoru CORM-A1 na aktivaci kaspázy-3 v průběhu stárnutí prasečích oocytů. Oocyty byly vystaveny prodloužené kultivaci po dobu 24, 48 nebo 72 hodin v přítomnosti CORM-A1. Po uplynutí dané doby kultivace byla pomocí imunolokalizace sledována míra exprese aktivní kaspázy-3.

5 Výsledky

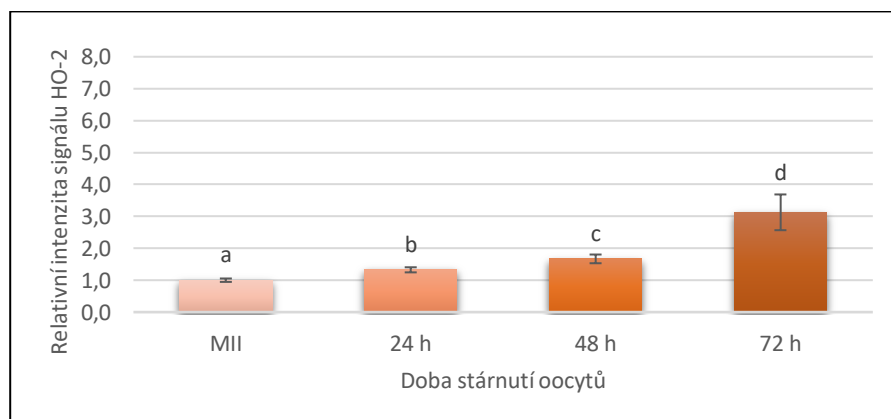
5.1 Míra exprese a buněčná lokalizace enzymů HO-1 a HO-2 v prasečích oocytech

Cílem tohoto experimentu bylo lokalizovat obě izoformy hemoxygenázy v meioticky zralých oocytech (MII) a v oocytech stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin. V prasečích oocytech jsme zjistili přítomnost HO-1 i HO-2 (viz Obrázek 9) a jejich exprese během procesu *in vitro* stárnutí oocytů postupně narůstala. Signál HO-1 byl nejsilnější v oblasti chromatinu, naproti tomu signál HO-2 byl nejsilnější v cytoplazmě oocytu. Během *in vitro* stárnutí docházelo ke zvýšení exprese obou izoform převážně v cytoplazmě oocytu.

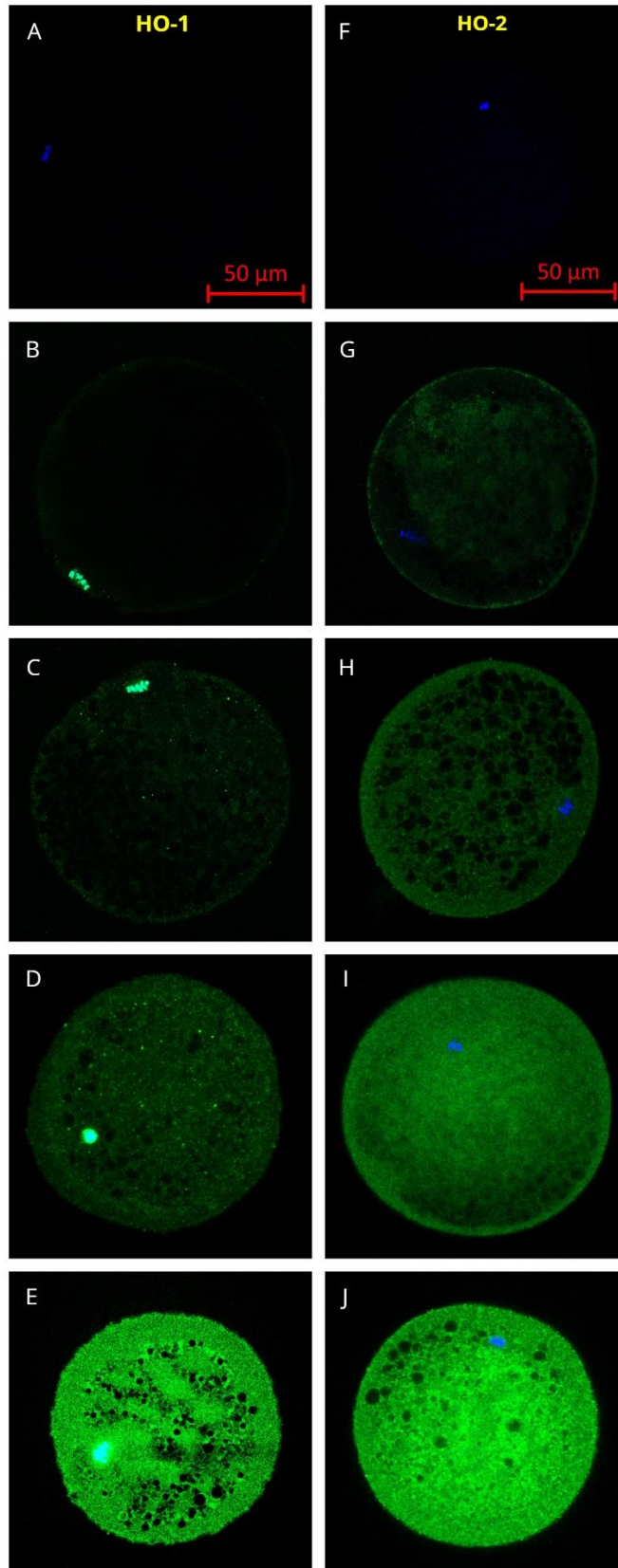


Graf 1: Míra exprese hemoxygenázy-1 ve zralých (MII) oocytech a v oocytech stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin. Superskripty *a, b, c, d* označují signifikantní rozdíly v expresi HO-1 ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 1 v kapitole Samostatné přílohy.

Při srovnání s kontrolní skupinou meioticky zralých oocytů se exprese HO-1 v oocytech stárnoucích po dobu 24 h zvýšila $2,2 \pm 0,2$ krát, v oocytech stárnoucích 48 h se zvýšila $3,5 \pm 0,3$ krát a v oocytech stárnoucích 72 hodin se exprese zvýšila $6,7 \pm 1,3$ krát (viz Graf 1). Exprese HO-2 se v oocytech stárnoucích po dobu 24 h se zvýšila $1,3 \pm 0,1$ krát, v oocytech stárnoucích 48 h se zvýšila $1,7 \pm 0,14$ krát a v oocytech stárnoucích 72 h se exprese zvýšila $3,1 \pm 0,6$ krát (viz Graf 2). Ve všech dnech stárnutí se exprese HO-1 i HO-2 signifikantně zvýšila.



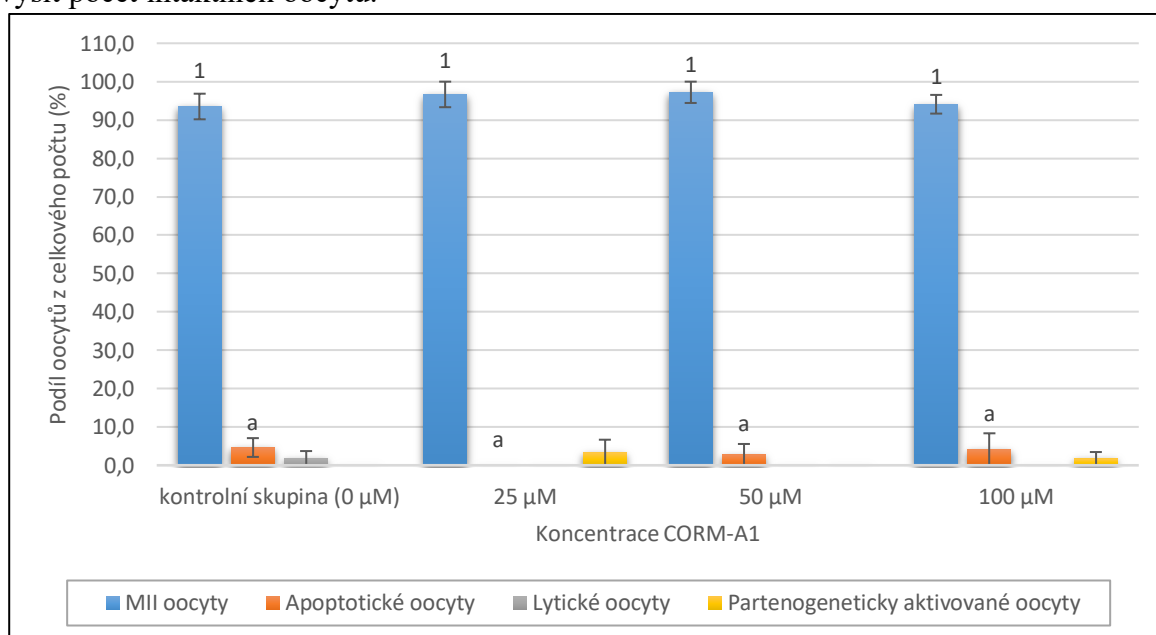
Graf 2: Míra exprese hemoxygenázy-2 ve zralých (MII) oocytech a v oocytech stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin. Superskripty *a, b, c, d* označují signifikantní rozdíly v expresi HO-2 ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 2 v kapitole Samostatné přílohy.



Obrázek 9: Lokalizace HO-1 a HO-2 v prasečích MII a stárnoucích oocytech po dobu 24, 48 a 72 hodin. Na snímcích je oocyt inkubovaný bez primární protilátky proti HO-1 (A), a dále oocyty inkubované v přítomnosti protilátky proti HO-1: MII oocyty (B), oocyty stárnoucí 24 hodin (C), 48 hodin (D) a 72 (E) hodin. Na snímcích je oocyt inkubovaný bez primární protilátky proti HO-2 (F), a dále oocyty inkubované v přítomnosti HO-2: MII oocyty (G), oocyty stárnoucí 24 hodin (H), 48 hodin (I) a 72 (J) hodin. HO-1 je zobrazena zeleně (FITC), chromatin je zobrazen modře (DAPI). Místa překrytí výskytu HO-1/HO-2 a chromatinu jsou zobrazena tyrkysově, zvětšeno 400×.

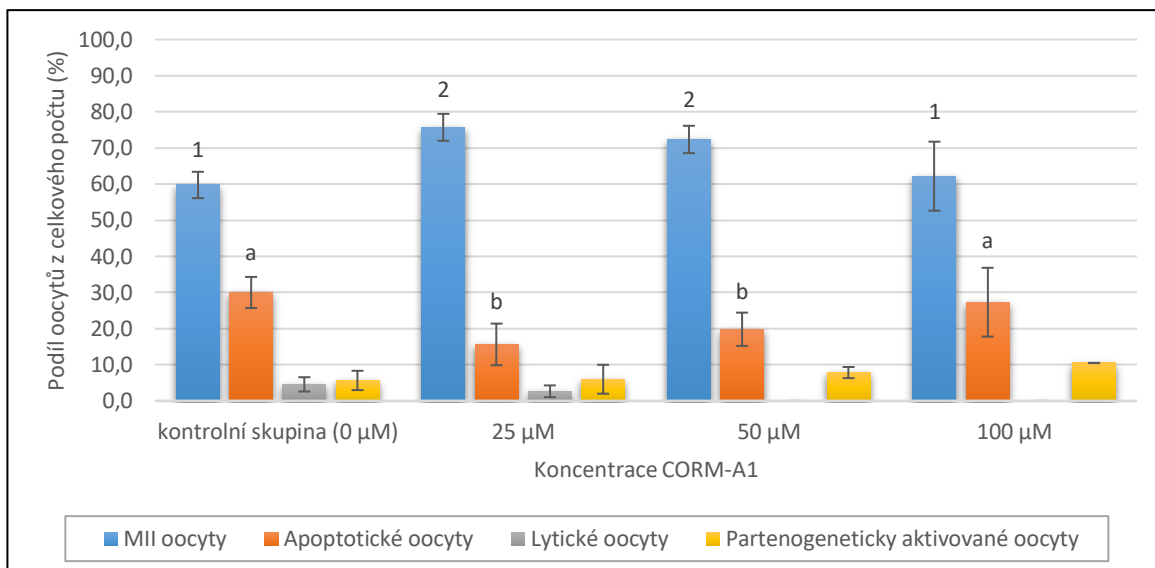
5.2 Vliv donoru CO na morfologické znaky stárnutí prasečích oocytů stárnoucích po dobu 24, 48 a 72 hodin

Cílem tohoto experimentu bylo identifikovat vliv donoru CO na morfologické znaky prasečích oocytů stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin. Pro tento experiment byl použit donor CO s pomalou kinetikou uvolňování CO (CORM-A1). Kontrolní skupina oocytů byla kvůli eliminaci vlivu nosiče molekuly CO kultivována v přítomnosti inaktivní formy tohoto donorů CO (iCORM-A1). Těmito experimenty byla prokázána schopnost CO dodaného do prasečích stárnoucích oocytů pomocí donoru CORM-A1 snížit počet apoptotických oocytů, neboli schopnost CO snížit apoptózu prasečích oocytů, a zároveň zvýšit počet intaktních oocytů.



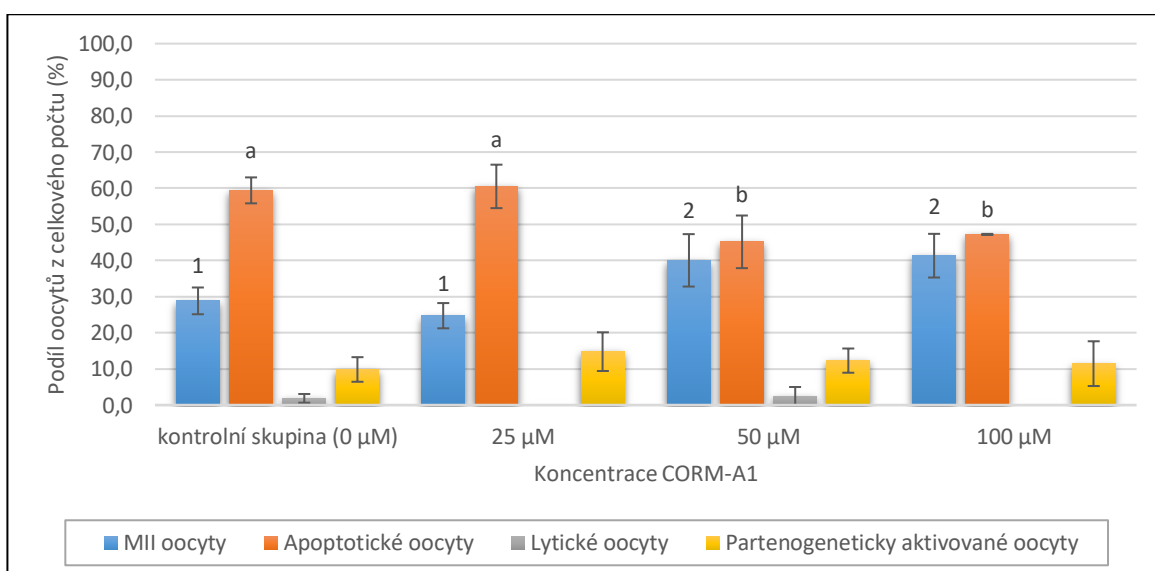
Graf 3: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 24 hodin za použití 25, 50 a 100 µM CORM-A1. Superskript ¹ označuje signifikantní rozdíly v podílu MII oocytů. Superskript ^a označuje signifikantní rozdíly v podílu apoptotických oocytů. Rozdíly v podílu lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů nebyly statisticky signifikantní ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 3 v kapitole Samostatné přílohy

Při *in vitro* stárnutí prasečích oocytů v přítomnosti CORM-A1 po dobu 24 hodin nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v podílu oocytů (viz Graf 3). Vliv CORM-A1 začal být patrný v prasečích oocytech po 48 hodinách stárnutí v *in vitro* podmínkách. Při srovnání s kontrolní skupinou oocytů obsahujících iCORM-A1 byl prokázán statisticky signifikantní vliv CORM-A1 v dávkách 25 µM a 50 µM, kdy se počet apoptotických oocytů snížil o 10,2 – 14,4 % (30,0±4,3 % kontrolní skupina oocytů vs. 15,6±5,8 – 19,8±4,6 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů) a zároveň se počet intaktních (MII) oocytů zvýšil o 12,6 – 16,0 % (59,8±3,6 % kontrolní skupina oocytů vs. 72,3±3,8 – 75,7±3,7 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů) (viz Graf 4). Rozdíl morfologických znaků mezi kontrolní skupinou oocytů a experimentální skupinou oocytů kultivovaných ve 100 µM CORM-A1 nebyl výrazný.



Graf 4: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 48 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Superskripty ^{1,2} označují signifikantní rozdíly v podílu MII oocytů. Superskripty ^{a,b} označují signifikantní rozdíly v podílu apoptotických oocytů. Rozdíly v podílu lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů nebyly statisticky signifikantní ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 4 v kapitole Samostatné přílohy.

Při stárnutí prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách po dobu 72 hodin byl vliv CORM-A1 v dávkách 50 μM a 100 μM taktéž výrazný. Při srovnání s kontrolní skupinou došlo ke snížení počtu apoptotických oocytů o 12,3 – 14,3 % (59,5±3,6 % kontrolní skupina oocytů vs. 45,2±7,3 – 47,2±3,2 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů) a současně ke zvýšení počtu intaktních (MII) oocytů o 11,2 – 12,5 % (28,8±3,7 % kontrolní skupina oocytů vs. 40,0±7,3 – 41,3±6,0 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů) (viz Graf 5). Rozdíl morfologických znaků mezi kontrolní skupinou oocytů a experimentální skupinou oocytů kultivovaných ve 25 μM CORM-A1 nebyl výrazný.

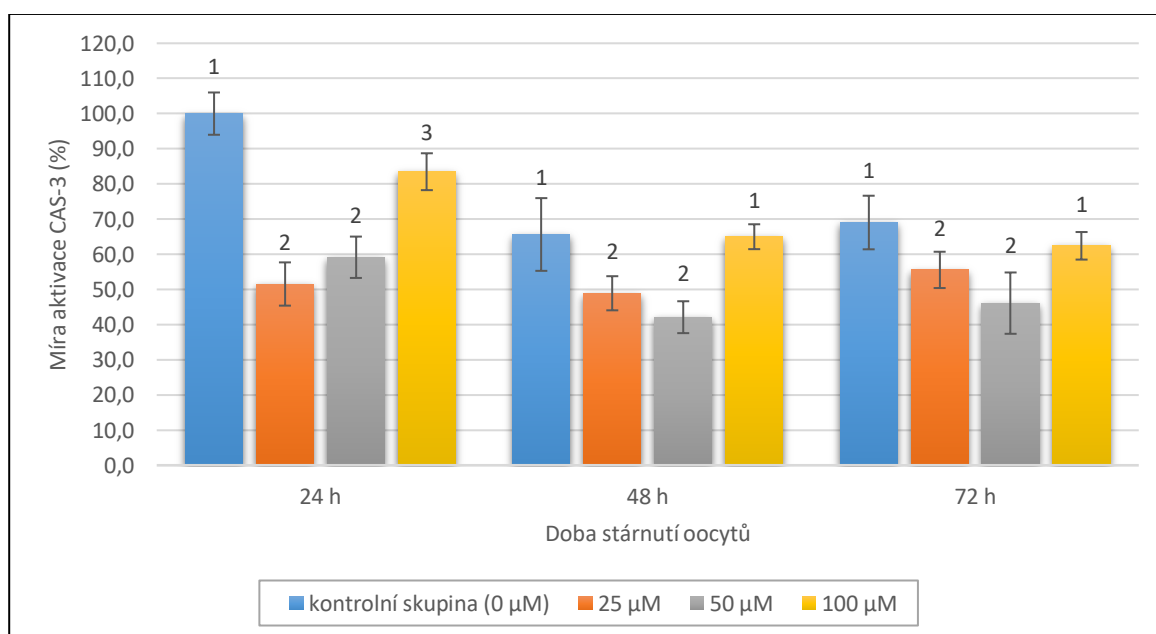


Graf 5: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 72 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Superskripty ^{1,2} označují signifikantní rozdíly v podílu MII oocytů. Superskripty ^{a,b} označují signifikantní rozdíly v podílu apoptotických oocytů. Rozdíly v podílu lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů nebyly statisticky signifikantní ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 5 v kapitole Samostatné přílohy.

5.3 Vliv donoru CO na aktivaci kaspázy-3 během stárnutí prasečích oocytů po dobu 24, 48 a 72 hodin

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv donoru CORM-A1 na míru aktivace kaspázy-3 (CAS-3) jako markeru apoptózy v prasečích oocytech stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24, 48 a 72 h (viz Graf 6). Tímto experimentem byla prokázána schopnost CORM-A1 snižovat míru aktivace CAS-3 během stárnutí prasečích oocytů. Vliv tohoto donoru CO na aktivaci kaspázy-3 (CAS-3) v prasečích oocytech byl významný při 24, 48 a 72 h procesu stárnutí a jeho efekt byl závislý na koncentraci CORM-A1 použité pro jednotlivé fáze tohoto experimentu.

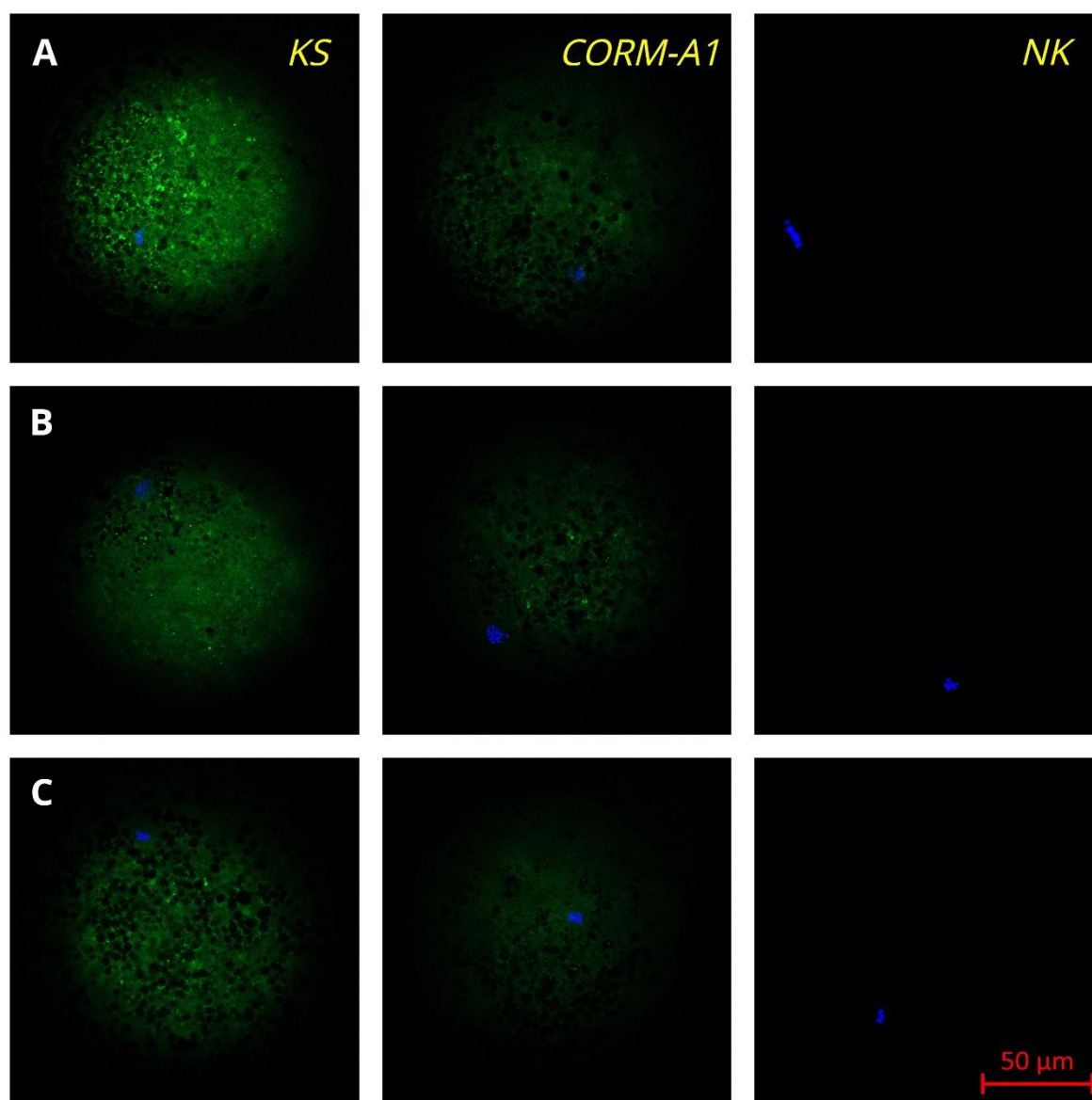
Největší vliv CORM-A1 byl zaznamenán u oocytů stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 24 h kultivovaných v 25 μM a 50 μM CORM-A1. Při srovnání s kontrolní skupinou oocytů došlo ke snížení míry aktivace CAS-3 o 40,9 – 48,5 % (100,0 \pm 6,0 % kontrolní skupina oocytů vs. 51,6 \pm 6,2 – 59,2 \pm 5,9 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů). Při kultivaci oocytů ve 100 μM CORM-A1 byl vliv méně výrazný a míra aktivace CAS-3 se snížila o 16,5 % (100,0 \pm 6,0 % kontrolní skupina oocytů vs. 83,5 \pm 5,2 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů).



Graf 6: Míra aktivace kaspázy-3 (CAS-3) v prasečích oocytech stárnoucích po dobu 24, 48 a 72 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Všechny hodnoty jsou relativně vztaženy ke kontrolní skupině oocytů stárnoucích 24 hodin. Superskripty ^{1, 2, 3} označují signifikantní rozdíly v expresi CAS-3 ($p < 0,05$). Naměřená data jsou zpracována v Tabulce 6 v kapitole Samostatné přílohy.

Vliv CORM-A1 na oocyty stárnoucí po dobu 48 h byl oproti oocytům stárnoucích 24 h slabší a opět byl výraznější při kultivaci oocytů v 25 μM a 50 μM CORM-A1. Při srovnání s kontrolní skupinou došlo ke snížení míry aktivace CAS-3 o 16,7 – 23,5 % (65,6 \pm 10,3 % kontrolní skupina oocytů vs. 42,1 \pm 4,5 – 48,9 \pm 4,9 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů). Rozdíl míry aktivace CAS-3 mezi kontrolní skupinou oocytů a experimentální skupinou oocytů kultivovaných ve 100 μM CORM-A1 nebyl výrazný.

Stejně tak i u oocytů stárnoucích v *in vitro* podmínkách po dobu 72 h byl vliv CORM-A1 oproti oocytům stárnoucích 24 h slabší. Významnější vliv CORM-A1 během stárnutí oocytů 72 h jsme pozorovali při použití koncentrace 25 μ M a 50 μ M CORM-A1. Při srovnání s kontrolní skupinou se míra aktivace CAS-3 snížila o 13,4 – 22,9 % (69,0 \pm 7,6 % kontrolní skupina oocytů vs. 46,1 \pm 8,7 – 55,6 \pm 5,2 % experimentální skupina CORM-A1 oocytů). Rozdíl míry aktivace CAS-3 mezi kontrolní skupinou oocytů a experimentální skupinou oocytů kultivovaných ve 100 μ M CORM-A1 nebyl výrazný.



Obrázek 10: Lokalizace aktivované kaspázy (cCAS-3) v prasečích oocytech stárnoucích 24 hodin (A), 48 hodin (B) a 72 hodin (C). Na snímcích jsou zobrazeny kontrolní oocyty inkubované s protilátkou pro cCAS-3 (KS), experimentálních oocytů inkubovaných v přítomnosti CORM-A1 a oocyty negativní kontroly (NK) inkubované bez protilátek pro cCAS-3 a bez CORM-A1. Aktivovaná kaspáza-3 je zobrazena zelenou barvou (FITC), chromatin je zobrazen modře (DAPI), zvětšeno 400 \times .

6 Diskuze

Oocyt je hlavní složkou plodnosti samic. Vysoká kvalita oplozených oocytů je důležitá pro normální embryonální vývoj a zdravé potomstvo. U savců je období vhodné pro oplození oocytu krátké a trvá 6 až 24 hodin. Pokud oplození v tomto časovém rozmezí nenastane, neoplozené oocyty vstoupí do časově závislého procesu snižujícího jejich kvalitu zvaného stárnutí oocytů. Neúspěšné a abnormální oplození je často pozorováno u stárnoucích oocytů a může mít za následek špatný embryonální vývoj a rané potraty (Ma et al. 2015).

Hemoxygenáza (HO) je enzym zodpovědný za rozklad hemu na oxid uhelnatý, železo a biliverdin. Oxid uhelnatý (CO) společně s dalšími gasotransmitery, jako je například oxid dusnatý (NO) či sulfan (H_2S), patří do skupiny endogenních signálních molekul. Díky produkci těchto látek je hemoxygenáza schopná poskytovat oocytům a dalším typům somatických buněk ochranu před účinky stárnutí, mezi které patří i programovaná buněčná smrt neboli apoptóza (Wu & Wang 2005).

Sulfan společně s oxidem dusnatým je přítomný v prasečích oocytech, kde se podílí na jejich meiotickém zrání. Inhibicí produkce sulfanu dochází k apoptóze oocytů, což naznačuje, že sulfan reguluje biochemické procesy v průběhu stárnutí oocytů (Krejčová et al. 2015).

Oxid dusnatý je produkován třemi izoformami NO syntázy (NOS) a v somatických buňkách se podílí na jejich ochraně před apoptózou. V čerstvých oocytech se oxid dusnatý účastní meiotického zrání a ve vysokých hladinách způsobuje vývojové vady oocytů. Přítomnost NO a všech izoform NOS ve stárnoucích oocytech spolu s pozorovanou relokací izoform NOS během procesu stárnutí dokazuje o jejich zapojení do procesu stárnutí oocytů. Efekt NOS pravděpodobně spočívá v zabránění apoptózy a potlačení rozpadu oocytů (Nevoral et al. 2013; Nevoral et al. 2016).

Hemoxygenáza se vyskytuje v buňkách ve dvou izoformách – v indukovatelné (HO-1) a konstitutivní (HO-2). Přesný mechanismus signální kaskády HO/CO v prasečích oocytech ještě nebyl přesně popsán. Našimi experimenty jsme dokázali, že se hemoxygenáza vyskytuje ve zralých i stárnoucích prasečích oocytech v obou izoformách (HO-1 a HO-2) a že se s narůstající dobou *in vitro* stárnutí jejich exprese postupně zvyšuje.

Hemoxygenáza-1 patří do skupiny stresových proteinů, které se vyznačují zvýšenou syntézou jako reakcí na vystavení oocytu či jiné buňky fyzickému nebo chemickému stresu. Mezi takové nepříznivé vlivy můžeme zahrnout například UV záření, teplotní šok či oxidativní stres (Ryter et al. 2006).

Hem slouží jako prostetická skupina hemoproteinů, na kterou se mohou navázat volné železitě ionty. Při oxidativním stresu mohou hemoproteiny uvolňovat tyto hemové prostetické skupiny a produkovat tak volné radikály. Při katabolismu hemu dochází díky HO-1 k produkci biliverdinu a oxidu uhelnatého, které mají silné antioxidační účinky a chrání tak buňky před jejich stárnutím (Gozzelino et al. 2010).

Hemoxygenáza-2 je konstitutivní izoformou HO a podobně jako hemoxygenáza-1 může poskytovat ochranu buněk proti vlivu volného hemu, avšak její exprese není zvyšována jako odpověď na stres (Gozzelino et al. 2010).

Ve stárnoucích prasečích oocytech jsme pozorovali zvýšenou expresi obou izoform hemoxygenázy. Během 24 hodin stárnutí se exprese HO-2 znásobila přibližně 1,3krát

a s přibývajícím dobou stárnutí oocytů se tento násobek exponenciálně zvětšoval. Přestože měl nárůst exprese hemoxygenázy-1 podobný charakter jako u HO-2, dosahoval téměř dvakrát vyšších hodnot. Zvyšující se produkce a exprese HO-1 v prasečích oocytech během procesu stárnutí by mohla být reakcí na postupně zhoršující se podmínky, kterým je oocyt během *in vitro* stárnutí vystaven. S rostoucí hladinou HO-1 i HO-2 v oocytech během stárnutí se může následně zvyšovat potenciál chránit buňku před negativními vlivy fyzického a chemického stresu. Zvyšující se exprese HO-1 pravděpodobně vede k čím dále větší produkci CO. Hlavní úlohou HO-2 je udržování kontinuální produkce CO (Němeček et al. 2017a). Narůstající potřeba CO jako ochrany stárnoucích oocytů může souviset s postupně se zvyšující hladinou HO-2 ve stárnoucích prasečích oocytech.

Obě izoformy hemoxygenázy se liší nejen v jejich enzymatické kinetice, ale také v místě jejich lokalizace v buňce. V našem experimentu jsme HO-1 v meioticky zralých a ve stárnoucích oocytech lokalizovali převážně v oblasti chromatinu, avšak exprese této izoformy se během *in vitro* stárnutí postupně zvyšovala hlavně v oblasti cytoplazmy. HO-2 jsme lokalizovali po celou dobu experimentu spíše v cytoplazmě. Při vystavení somatických buněk např. oxidativnímu stresu se HO-1 přesouvá z cytoplazmy do oblasti jádra, kde ovlivňuje transkripční procesy a poskytuje tak buňce ochranu proti účinkům stresu (Lin et al. 2007).

Podobný mechanismus by mohl fungovat i při ochraně prasečích oocytů během *in vitro* stárnutí. Vzhledem k přítomnosti HO-1 v oblasti chromatinu meioticky zralých oocytů mohlo během našeho experimentu dojít k vystavení oocytů stresu již během jejich zrání. Genová exprese HO-2 může být vyvolána glukokortikoidy (Němeček et al. 2017b). Výskyt HO-2 v cytoplazmě by mohl souviset s umístěním vazebných receptorů pro glukokortikoidy. Přestože u prasečích oocytů zatím nebyly vazebné receptory pro glukokortikoidy v cytoplazmě prokázány, u krys byly objeveny volné glukokortikoidové receptory v cytoplazmě somatických buněk (Bell & Munck 1973). Gong et al. (2017) prokázali přítomnost vazebných glukokortikoidových receptorů na membráně prasečích oocytů. Přesný mechanismus a konkrétní lokalizace receptorů pro vyvolání genové exprese HO-2 pomocí glukokortikoidů však vyžaduje podrobnější výzkum.

Po ovulaci dochází v oocytu k postupně se zvyšující produkci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), které v oocytu vyvolávají oxidativní stres a spouští kaskádu dalších faktorů vedoucí ke stárnutí oocytu a následnému zahájení jeho apoptózy (Yao et al. 2018). Úkolem obou izoform hemoxygenázy je účast při katabolismu hemu, jehož následkem je mimo jiné produkce oxidu uhelnatého či biliverdinu. Tyto metabolity mají během oxidativního stresu schopnost vychytávat volné radikály v buňce a zabránit tak buněčné smrti (Gozzelino et al. 2010). Signální kaskáda hemoxygenázy-1 a oxidu uhelnatého je považována za jeden z nejnámějších faktorů zamezující procesu apoptózy u somatických buněk (Abraham & Kappas 2008).

Inhibicí hemoxygenázy v prasečích oocytech během *in vitro* stárnutí bylo prokázáno snížení jejich kvality, zvýšení počtu apoptotických a lytických oocytů a současné snížení počtu intaktních oocytů (Němeček et al. 2017a). Tento efekt společně s námi prokázanou zvýšenou expesí obou izoform hemoxygenázy v prasečích oocytech během *in vitro* stárnutí dokazuje o důležitosti její role při ochraně oocytu proti procesu stárnutí.

Oxid uhelnatý je do prasečích oocytů exogenně dodáván pomocí vektorů, které se označují jako CORMs (*CO-releasing molecules*). Tyto organokovové sloučeniny jsou uměle

vytvořené a jejich úkolem je uvolňovat molekuly oxidu uhelnatého, který cytoprotektivně působí na stárnoucí prasečí oocyty (Babu et al. 2015). Skupina CORMs se dělí na CORMs rozpustné v lipidech, kam patří CORM-1 a CORM-2, a CORMs rozpustné ve vodě, kam řadíme CORM-3 a CORM-A1. Jedinou látkou, která je zároveň rozpustná ve vodě a neobsahuje kovový iont, je CORM-A1. Díky jednoduché modifikaci a nízké toxicitě je výroba a používání CORM-A1 z těchto látek nejjednodušší a nejpraktičtější (Adach & Olas 2018). Oproti CORM-3 uvolňuje CO pomaleji, avšak účinky hemoxygenáz, potažmo CO, napodobuje věrněji (Motterlini et al. 2005).

Uvolňování CO přes donor CORM-2 je oproti postupnému uvolňování přes donor CORM-A1 rychlé. Na stárnoucí prasečí oocyty má CORM-2 v různých koncentracích pozitivní účinek, čímž dochází k vyššímu výskytu intaktních oocytů a díky schopnosti snižování míry aktivace kaspázy-3 i k současnému snížení míry apoptózy stárnoucích oocytů. Ošetření oocytů stárnoucích 24 h v *in vitro* podmínkách molekulami CORM-2 vede ke zvýšení výskytu intaktních oocytů a k současnému snížení počtu apoptotických oocytů. U oocytů stárnoucích 48 a 72 hodin byl efekt CORM-2 silnější (Němeček et al. 2017a).

CORM-A1 má v somatických buňkách schopnost cytoprotekce. Například v prasečích endotelových buňkách nacházejících se v mozku dokáže CORM-A1 řídit produkci reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), snižovat tak oxidativní stres způsobující mitochondriální dysfunkci a zabránit tak apoptóze těchto buněk (Basuroy et al. 2013). V intestinálních epiteliálních buňkách myši CORM-A1 rovněž snižuje produkci ROS a současně s tím zvyšuje hladinu glutationu (GSH), který brání účinku ROS. Tímto způsobem dochází k zabránění oxidativního stresu a následné apoptóze či snížení kvality buněk. Mezi další schopnosti CORM-A1 v těchto buňkách patří schopnost snižovat míru aktivace kaspázy-3, která je markerem apoptózy (Babu et al. 2014). Tyto poznatky by mohly nasvědčovat o podobném účinku donoru oxidu uhelnatého CORM-A1 na následky stárnutí prasečích oocytů a zvyšovat tak jejich kvalitu.

V našem experimentu jsme prokázali signifikantní vliv CORM-A1 na morfologii stárnoucích oocytů. Tento účinek začal být patrný po 48 hodinách a jeho následkem bylo snížení počtu apoptotických oocytů a současně také zvýšení počtu intaktních oocytů.

Při stárnutí prasečích oocytů po 72 hodin byl účinek CORM-A1 na morfologii oocytů podobný, avšak byl výrazný pouze při vyšších dávkách. Stejně jako v předchozích částech experimentu dokázal CORM-A1 snížit podíl apoptotických oocytů vůči intaktním. Při použití nižší dávky CORM-A1 jsme tento jev nepozorovali. Všechny tyto výsledky jasně potvrzují hypotézu o schopnosti CO dodaného do prasečích stárnoucích oocytů pomocí donoru CORM-A1 zabránit apoptóze prasečích oocytů, ovlivňovat proces stárnutí a zlepšovat tak životaschopnost.

Jednou z příčin apoptózy prasečích oocytů je aktivace kaspázy-3 vyvolaná například přítomností peroxidu vodíku (H_2O_2) při oxidativním stresu. Během oxidativního stresu dochází následkem zvýšené koncentrace vápníkových iontů pronikajících do mitochondrií k poškození mtDNA a následnému stárnutí oocytů (Prasad et al. 2015). Míra aktivace kaspázy-3 v prasečích oocytech je během stárnutí nejvyšší prvních 24 hodin, poté se postupně snižuje. Jak již bylo v předchozích studiích (Němeček et al. 2017a) dokázáno, jednou z vlastností oxidu uhelnatého ve stárnoucích prasečích oocytech je schopnost snižovat aktivaci kaspáz a zabránit tak apoptóze. Ke stejnému účinku v prasečích stárnoucích oocytech dochází i v přítomnosti donoru

CO CORM-2. Použití této molekuly během stárnutí oocytů po dobu minimálně 24 hodin má za následek zvýšení počtu intaktních oocytů, snížení počtu apoptotických oocytů a současné snížení míry aktivace kaspázy-3. S postupující dobou stárnutí byl tento efekt méně výrazný (Němeček et al. 2017a).

Stejně jako CORM-2 má i CORM-A1 pozitivní vliv na míru aktivace kaspázy-3. Naším experimentem jsme prokázali schopnost CORM-A1 snižovat míru aktivace kaspázy-3 ve stárnoucích prasečích oocytech a zabráňovat tak apoptóze. Tento efekt se s postupující dobou stárnutí snižuje a je na rozdíl od účinku CORM-2 závislý na koncentraci použité dávky. Tento jev může být způsoben pomalejší kinetikou uvolňování CO molekulami CORM-A1 oproti CORM-2.

CORM-A1, potažmo oxid uhelnatý může ovlivňovat aktivaci kaspázy-3 a zabráňovat tak apoptóze prasečích oocytů pomocí různých mechanismů. Jak již bylo zmíněno výše, CO dokáže v prasečích oocytech ovlivňovat hladinu reaktivních kyslíkových sloučenin, omezovat tak průnik volných vápníkových iontů do mitochondrií a předejít tak nástupu stárnutí a následné apoptóze (Yao et al. 2018). V somatických buňkách má oxid uhelnatý schopnost zvyšovat expresi antiapoptotického faktoru Bcl-2 a současně snižovat expresi proapoptotických faktorů Bid a Bax, což má za následek inhibici apoptózy těchto buněk (Němeček et al. 2017a). Přestože byl tento účinek potvrzen pouze u myších endoteliálních buněk, mohl by podobný účinek fungovat i v prasečích oocytech. K potvrzení tohoto mechanismu inhibice apoptózy v prasečích oocytech však potřebuje další výzkum.

Dokázáním metody cytoprotekce prasečích oocytů pomocí schopnosti oxidu uhelnatého snižovat expresi Bcl-2 a zvyšovat expresi Bid a Bax bychom mohli zamezit zhoršení kvality oocytů a mít tak k dispozici dostatek kvalitních oocytů pro další výzkum v oboru reprodukčních biotechnologií. Výsledky výzkumu přesného důvodu nárůstu exprese HO-1 a HO-2 během procesu stárnutí a poznatky týkající se přesného mechanismu zabránění apoptózy pomocí regulace antiapoptotických a proapoptotických faktorů v prasečích stárnoucích oocytech by mohly být využity i v oboru lidské asistované reprodukce. Tímto způsobem bychom následně mohli dosáhnout zvýšení kvality genetické výbavy a následného vývoje budoucích potomků.

7 Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, zda lze ovlivnit stárnutí prasečích oocytů pomocí donoru oxidu uhelnatého CORM-A1. Při zkoumání vlivu CORM-A1 na prasečí oocyty jsme srovnávali stárnoucí oocyty se zralými MII oocyty a prokázali jsme, že CORM-A1 dokáže regulovat proces stárnutí a zachovávat tak kvalitu prasečích oocytů. Experimentem jsme zjistili, že se ve zralých i v *in vitro* stárnoucích prasečích oocytech exprimují obě formy enzymu hemoxygenázy, která je zodpovědná za produkci oxidu uhelnatého (CO).

Ve zralých prasečích oocytech byl signál HO-1 nejsilnější v oblasti chromatinu, kdežto HO-2 se spíše exprimovala v cytoplazmě. U somatických buněk se HO-1 vyskytuje v blízkosti jádra, kde ovlivňuje transkripci při vystavení buňky stresu. V našem případě by mohla přítomnost HO-1 v oblasti chromatinu souviset s vystavením oocytů stresovým faktorům již během procesu zrání. Expres HO-1 i HO-2 během *in vitro* stárnutí probíhala převážně v cytoplazmě prasečích oocytů a postupně narůstala. Mezi následky stárnutí patří mimo jiné snížení účinnosti různých antiapoptotických faktorů. Signální kaskáda HO-1/CO má schopnost zajišťovat ochranu buňky a zabraňovat tak apoptóze. Hlavní úlohou HO-2 je řídit hladinu CO. Zvyšující se exprese HO-2 ve stárnoucích prasečích oocytech může značit o postupně se zvyšující potřebě CO při ochraně buňky před buněčnou smrtí.

Dále jsme sledovali vliv CORM-A1 na morfologii stárnoucích prasečích oocytů, který začal být patrný po 48 hodinách a byl zřetelný i při 72 hodinách *in vitro* stárnutí. Při ošetření prasečích oocytů molekulami CORM-A1 se zvýšil počet intaktních oocytů a současně se snížil počet apoptotických oocytů. Tato skutečnost společně s již dříve prokázanými účinky signální kaskády HO/CO na stárnutí prasečích oocytů jasně svědčí o schopnosti CORM-A1 zabraňovat apoptóze prasečích oocytů.

Jedním z markerů apoptózy prasečích oocytů je kromě jejich morfologických změn přítomnost aktivované kaspázy-3 (cCAS-3). Při našem experimentu CORM-A1 výrazně snížil míru aktivace kaspázy-3 (CAS-3) a částečně tak zabránil jejich apoptóze. Síla účinku CORM-A1 na míru aktivace CAS-3 byla závislá na koncentraci použité dávky CORM-A1 a s postupem času se během *in vitro* stárnutí snižovala. Z výsledků tohoto experimentu lze opět usuzovat, že je CORM-A1 molekula schopná zabraňovat apoptóze, pozitivně tak ovlivňovat kvalitu a životaschopnost prasečích oocytů a zlepšovat následný embryonální vývoj.

Další metodou, jak zabraňovat apoptotickému rozpadu prasečích stárnoucích oocytů je schopnost CO zvýšit expresi antiapoptotických faktorů a současně snížit expresi proapoptotických faktorů. Přesný mechanismus tohoto způsobu cytoprotekce byl však prozatím prokázán na somatických buňkách. V budoucnu by bylo dobré se zaměřit na podrobný výzkum účinku CO, případně jeho donoru CORM-A1, na expresi antiapoptotických a proapoptotických faktorů v prasečích oocytech během stárnutí. Hlubším výzkumem by také měla být prokázána či vyvrácena a vysvětlena přítomnost HO-1 v oblasti chromatinu u zralých prasečích oocytů. Současně s tím by bylo vhodné dalšími experimenty potvrdit či vyvrátit souvislost mezi zvyšující se hladinou HO-2 v prasečích oocytech během *in vitro* stárnutí a zvyšující se potřebou CO pro ochranu buňky před apoptózou.

8 Literatura

- Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, Oko R. 2014. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *The FASEB Journal* **28(10)**: 4434–4440.
- Abraham NG, Kappas A. 2008. Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase. *Pharmacological Reviews* **60(1)**: 79–127.
- Adach W, Olas B. 2018. Carbon monoxide and its donors – their implications for medicine. *Future Medicinal Chemistry* **11(1)**: 60-73.
- Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG. 2009. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364(1534)**: 3351-3361.
- Babu D, Leclercq G, Goossens V, Remijsen Q, Vandenabeele P, Motterlini R, Lefebvre RA. 2015. Antioxidant potential of CORM-A1 and resveratrol during TNF- α /cycloheximide-induced oxidative stress and apoptosis in murine intestinal epithelial MODE-K cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **288(2)**: 161–178.
- Babu D, Motterlini R, Lefebvre RA. 2014. CO and CO-releasing molecules (CO-RMs) in acute gastrointestinal inflammation. *British Journal of Pharmacology* **172(6)**: 1557–1573.
- Bae IH, Channing CP. 1985. Effect of calcium ion on the maturation of cumulus-enclosed pig follicular oocytes isolated from medium-sized Graafian follicles. *Biology of reproduction* **33(1)**: 79-87.
- Basuroy S, Leffler CW, Parfenova H. 2013. CORM-A1 prevents blood-brain barrier dysfunction caused by ionotropic glutamate receptor-mediated endothelial oxidative stress and apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **304(11)**: C1105–C1115.
- Bell PA, Munck A. 1973. Steroid-binding properties and stabilization of cytoplasmic glucocorticoid receptors from rat thymus cells. *Biochemical Journal* **136(1)**: 97–107.
- Bertoldo MJ, Nadal-Desbarats L, Gérard N, Dubois A, Holyoake PK, Grupen CG. 2013. Differences in the metabolomic signatures of porcine follicular fluid collected from environments associated with good and poor oocyte quality. *Reproduction* **146(3)**: 221-231.
- Brevini TAL, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal reproduction science* **98(1-2)**: 23-38.

Brüssow KP, Rátky J, Schneider F, Torner H, Kanitz W, Solti L. 1999. Effects of Follicular Fluid on the Transport of Porcine Oocytes into the Oviduct at Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals* **34(5)**: 423–429.

Ding B, Gibbs PEM, Brookes PS, Maines MD. 2011. The coordinated increased expression of biliverdin reductase and heme oxygenase-2 promotes cardiomyocyte survival: a reductase-based peptide counters β -adrenergic receptor ligand-mediated cardiac dysfunction. *The FASEB Journal* **25(1)**: 301–313

Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive biology and endocrinology* **4(1)**: 16.

Dumont BL. 2016. Variation and Evolution of the Meiotic Requirement for Crossing Over in Mammals. *Genetics* 205(1): **155–168**.

Ebeling S, Labudda A, Meinecke B. 2010. In Vitro Ageing of Porcine Oocytes: Changes in Phosphorylation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Parthenogenetic Activability. *Reproduction in Domestic Animals* **45(6)**: 398–404.

Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122(6)**: 829-838.

Fissore R, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* **124(6)**:745-754.

Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. 1995. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biology of reproduction* **52(6)**: 1234-1243.

Gong S, Sun GY, Zhang M, Yuan HJ, Zhu S, Jiao GZ, Luo MJ, Tan JH. 2017. Mechanisms for the species difference between mouse and pig oocytes in their sensitivity to glucorticoids. *Biology of Reproduction* **96(5)**: 1019–1030.

Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. 2010. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **50(1)**: 323–354.

Handel MA, Schimenti JC. 2010. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* **11(2)**: 124-136.

Harada T, Koi H, Kubota T, Aso T. 2004. Haem oxygenase augments porcine granulosa cell apoptosis in vitro. *Journal of Endocrinology* **181(1)**: 191–205.

Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Reproduction* **100(2)**: 333-339.

- Homa ST, Carroll J, Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction* **8(8)**: 1274-1281.
- Hunter MG. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction* **5(2)**: 122-130.
- Hunter RHF. 1977. Physiological Factors Influencing Ovulation, Fertilization, Early Embryonic Development and Establishment of Pregnancy in Pigs. *British Veterinary Journal* **133(5)**: 461-470.
- Kanitz W, Brussow KP, Becker F, Torner H, Schneider F, Kubelka M, Tomek W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archiv Fur Tierzucht* **44**: 9-23.
- Kaufman ML, Homa ST. 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology* **265(1)**: 69-76.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. 2000. Maturation/M-Phase Promoting Factor: A Regulator of Aging in Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction* **63(3)**: 715-722.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Kaneko H, Tojo H. 2002. Maturation/M-Phase Promoting Factor Regulates Aging of Porcine Oocytes Matured In Vitro. *Cloning and Stem Cells* **4(3)**: 211-222.
- Krejčová T et al. 2015. Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes. *PLOS ONE* **10(1)**. DOI: 10.1371/journal.pone.0116964.
- Krisher RL. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science* **82(E)**: 14-23.
- Kujjo LL, Perez GI. 2011. Ceramide and mitochondrial function in aging oocytes: juggling a new hypothesis and old players. *Reproduction* **143(1)**: 1-10.
- Lee J, Miyano T, Moor RM. 2000. Spindle formation and dynamics of γ -tubulin and nuclear mitotic apparatus protein distribution during meiosis in pig and mouse oocytes. *Biology of reproduction* **62(5)**: 1184-1192.
- Lin Q et al. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **282(28)**: 20621-20633.

Lord T, Aitken RJ. 2013. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* **146(6)**: 217-227.

Ma R, Zhang Y, Zhang L, Han J, Rui R. 2015. Sirt1 protects pig oocyte against in vitro aging. *Animal Science Journal*. DOI: 1111/asj.12360.

Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update* **15(5)**: 573–585.

Miao Y, Zhou C, Cui Z, Zhang M, ShiYang X, Lu Y, Xiong B. 2018. Postovulatory aging causes the deterioration of porcine oocytes via induction of oxidative stress. *The FASEB Journal* **32(3)**: 1328-1337.

Moniruzzaman M, Miyano T. 2010. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development* **56(6)**: 559-566.

Motterlini R, Foresti R. 2017. Biological signaling by carbon monoxide and carbon monoxide-releasing molecules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **312(3)**: C302–C313.

Motterlini R, Sawle P, Hammad J, Bains S, Alberto R, Foresti R, Green CJ. 2005. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *The FASEB Journal* **19(2)**: 284–286.

Muñoz Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. 2014. A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**: 1–16.

Němeček D, Dvořáková M, Heroutová I, Chmelíková E, Sedmíková M. 2017a. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *PeerJ* **5(3876)**. DOI: 10.7717/peerj.3876.

Němeček D, Dvořáková M, Sedmíková M. 2017. Heme oxygenase/carbon monoxide in the female reproductive system: an overlooked signalling pathway. *International journal of biochemistry and molecular biology* **8(1)**: 1-12.

Nevoral J et al. 2013. The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science* **58(10)**: 453-459.

Nevoral J, Bodart JF, Petr J. 2016. Gasotransmitters in Gametogenesis and Early Development: Holy Trinity for Assisted Reproductive Technology – A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**: 1–12.

- Nevoral J, Orsák M, Klein P, Petr J, Dvořáková M, Weingartová I, Vyskočilová A, Zámostná K, Krejčová T, Jílek F. 2015. Cumulus Cell Expansion, Its Role in Oocyte Biology and Perspectives of Measurement: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **45(4)**: 212–225.
- Ono T, Mizutani E, Li C, Yamagata K, Wakayama T. 2011. Offspring from intracytoplasmic sperm injection of aged mouse oocytes treated with caffeine or MG132. *Genesis* **49(6)**: 460–471.
- Orr B, Godek KM, Compton D. 2015. Aneuploidy. *Current Biology* **25(13)**: R538–R542.
- Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG, Tilly JL. 2000. Mitochondria and the death of oocytes. *Nature* **403(6769)**: 500–501.
- Petrová I, Sedmíková M, Chmelíková E, Švestková D, Rajmon R. 2004. In vitro aging of porcine oocytes. *Czech Journal of Animal Science-UZPI (Czech Republic)* **49(3)**: 93–98.
- Petrová I, Sedmíková M, Petr J, Vodková Z, Pytloun P, Chmelíková E, Řehák D, Čtrnáctá A, Rajmon R, Jílek F. 2009. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **55(1)**: 75–82.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and cellular endocrinology* **145(1–2)**: 27–37.
- Prasad S, Tiwari M, Koch B, Chaube SK. 2015. Morphological, cellular and molecular changes during postovulatory egg aging in mammals. *Journal of biomedical science* **22(36)**: 1–5.
- Procházka R, Nagyová E, Rimkevičová Z, Nagai T, Kikuchi K, Motlík J. 1991. Lack of effect of oocyctomy on expansion of the porcine cumulus. *Reproduction* **93(2)**: 569–576.
- Ryter SW, Alam J, Choi AMK. 2006. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews* **86(2)**: 583–650.
- Scheuerer Gajda B. 2009. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reproductive biology* **9(2)**: 97–112.
- Sun QY, Lai L, Park KW, Kühholzer B, Prather RS, Schatten H. 2001c. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of reproduction* **64(3)**: 879–889.
- Sun QY, Lai L, Wu GM, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001a. Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: Correlation with chromosomes, γ -tubulin,

and MAP kinase. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **60(4)**: 481–490.

Sun QY, Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* **49(5)**: 347–359.

Sun QY, Schatten H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* **131(2)**: 193–205.

Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001b. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* **122(1)**: 155–163.

Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. 2013. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **39(10)**: 1431–1439.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **61(3)**: 414–424.

Tsafiriri A, Reich R. 2009. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **107(01)**: 1–11.

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

Wang T, Gao YY, Chen L, Nie ZW, Cheng W, Liu X, Schatten H, Zhang X, Miao YL. 2017. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging and promotes subsequent embryonic development in the pig. *Aging* **9(6)**: 1552–1563.

Wu L, Wang R. 2005. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacological Reviews* **57(4)**: 585–630.

Wu Y, Wang X, Liu J, Bao Z, Tang D, Wu Y, Zeng S. 2011. BIMEL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged porcine oocytes via a paracrine action. *Theriogenology* **76(8)**: 1487–1495.

Yao X, Jiang H, Liang S, Shen X, Gao Q, Xu YN, Kim NH. 2018. Laminarin enhances the quality of aged pig oocytes by reducing oxidative stress. *Journal of Reproduction and Development*. DOI:10.1262/jrd.2018-031.

Zenclussen ML, Jensen F, Rebelo S, El-Mousleh T, Casalis PA, Zenclussen AC. 2011a. Heme Oxygenase-1 Expression in the Ovary Dictates a Proper Oocyte Ovulation, Fertilization, and Corpora Lutea Maintenance. *American Journal of Reproductive Immunology* **67(5)**: 376–382.

Zenclussen ML, Casalis PA, El-Mousleh T, Rebelo S, Langwisch S, Linzke N, Volk HD, Fest S, Soares MP, Zenclussen AC. 2011. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The Journal of Pathology* **225(2)**: 293–304.

Zickler D, Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual review of genetics* **32(1)**: 619–697.

9 Samostatné přílohy

Tabulka 1: Míra exprese hemoxygenázy-1 ve zralých (MII) oocytech a v oocytech stárnoucích v in vitro podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin.

	HO-1 - relativní intenzita signálu			
	MII	24 h	48 h	72 h
Průměrná hodnota	1,00	2,20	3,51	6,66
Směrodatná odchylka	0,07	0,16	0,26	1,26

Tabulka 2: Míra exprese hemoxygenázy-2 ve zralých (MII) oocytech a v oocytech stárnoucích v in vitro podmínkách po dobu 24, 48 a 72 hodin.

	HO-2 - relativní intenzita signálu			
	MII	24 h	48 h	72 h
Průměrná hodnota	1,00	1,33	1,67	3,13
Směrodatná odchylka	0,05	0,08	0,14	0,56

Tabulka 3: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 24 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Každá hodnota obsahuje její obousměrnou směrodatnou odchylku.

	CORM-A1 - 24 h stárnutí			
	kontrolní skupina (0 μM)	25 μM	50 μM	100 μM
MII oocyty	93,52 \pm 3,34	96,67 \pm 3,33	97,22 \pm 2,78	94,1 \pm 2,44
Apoptotické oocyty	4,63 \pm 2,45	0,00 \pm 0,00	2,78 \pm 2,78	4,17 \pm 4,17
Lytické oocyty	1,85 \pm 1,85	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Partenogeneticky aktivované oocyty	0,00 \pm 0,00	3,33 \pm 3,33	0,00 \pm 0,00	1,73 \pm 1,73

Tabulka 4: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 48 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Každá hodnota obsahuje její obousměrnou směrodatnou odchylku.

	CORM-A1 - 48 h stárnutí			
	kontrolní skupina (0 μM)	25 μM	50 μM	100 μM
MII oocyty	59,75 \pm 3,64	75,70 \pm 3,72	72,34 \pm 3,78	62,18 \pm 9,55
Apoptotické oocyty	30,00 \pm 4,31	15,64 \pm 5,76	19,82 \pm 4,61	27,32 \pm 9,52
Lytické oocyty	4,58 \pm 1,98	2,67 \pm 1,63	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Partenogeneticky aktivované oocyty	5,67 \pm 2,67	6,00 \pm 4,00	7,85 \pm 1,54	10,50 \pm 0,03

Tabulka 5: Změny podílu počtu MII (intaktních), apoptotických, lytických a partenogeneticky aktivovaných oocytů z celkového počtu (100 %) použitých oocytů během stárnutí 72 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Každá hodnota obsahuje její obousměrnou směrodatnou odchylku.

	CORM-A1 - 72 h stárnutí			
	kontrolní skupina (0 μM)	25 μM	50 μM	100 μM
MII oocyty	28,83 \pm 3,70	24,73 \pm 3,49	40,04 \pm 7,25	41,33 \pm 6,04
Apoptotické oocyty	59,4 \pm 3,59	60,5 \pm 6,01	45,16 \pm 7,28	47,21 \pm 0,15
Lytické oocyty	1,86 \pm 1,21	0,00 \pm 0,00	2,50 \pm 2,50	0,00 \pm 0,00
Partenogeneticky aktivované oocyty	9,85 \pm 3,40	14,78 \pm 5,35	12,3 \pm 3,35	11,46 \pm 6,19

Tabulka 6: Míra aktivace kaspázy-3 v prasečích oocytech stárnoucích po dobu 24, 48 a 72 hodin za použití 25, 50 a 100 μM CORM-A1. Každá hodnota obsahuje její obousměrnou směrodatnou odchylku.

	CORM-A1 - vliv na cCAS-3			
	kontrolní skupina (0 μM)	25 μM	50 μM	100 μM
24 h	100,00 \pm 6,01	51,55 \pm 6,15	59,15 \pm 5,88	83,48 \pm 5,24
48 h	65,63 \pm 10,34	48,92 \pm 4,85	42,11 \pm 4,53	65,00 \pm 3,54
72 h	69,03 \pm 7,62	55,56 \pm 5,16	46,11 \pm 8,72	62,41 \pm 3,92