

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**3D kultivační systém využívající GrowDex pro kultivaci
kumulo-oocytárních komplexů prasete**

Diplomová práce

Bc. Tereza Šmídová

Reprodukční biotechnologie

doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci: „3D kultivační systém využívající GrowDex pro kultivaci kumulo-oocytárních komplexů prasete" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Kateřině Havlíkové, která mi poskytla velikou pomoc při práci v laboratoři, a své rodině za podporu během celé doby studia.

3D kultivační systém využívající GrowDex pro kultivaci kumulo-oocytárních komplexů prasete

Souhrn

Kultivační systémy využívající trojrozměrné (3D) prostředí představují pokročilý přístup v buněčné kultivaci, jelikož lépe odrážejí přirozené prostředí buněk a podporují jejich vývoj.

Cílem diplomové práce bylo srovnat 3D kultivační systém pro dlouhodobou kultivaci oocyty obklopujících buněk prasete využívající celulózový hydrogel GrowDex se standardním 2D kultivačním prostředím z pohledu exprese vybraných markerů apoptózy.

Ve 3D kultivačním prostředí s přídavkem hydrogelu GrowDex v různé koncentraci (1 a 0,5 %) bylo nejprve hodnoceno jaderné zrání kumulo-oocytárních komplexů (COCs) prasete. Oocyty kultivované v kultivačním médiu M199 s přídavkem hydrogelu GrowDex (3D) v obou použitých koncentracích vykazovaly srovnatelné výsledky jaderného zrání s kontrolou (2D).

Kumulární buňky z oocytů ve stádiu druhé meiotické metafáze byly poté ve 3D a standardním kultivačním prostředí (2D) ponechány k dlouhodobé kultivaci po dobu 2, 4, 7 a 16 dní. Na základě exprese markerů apoptózy byl hodnocen vitální stav kultivovaných buněk. Markery apoptózy byly zjišťovány pomocí imunodetekce metodou Western blot. Hodnocena byla míra exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a pro-apoptotického proteinu Bax z rodiny proteinů Bcl-2, jejíž členové jsou schopni regulovat propustnost mitochondriální membrány pro cytochrom c a jsou zásadní pro celý proces vnitřní apoptotické dráhy. Síla signálu reakce proteinu s protilátkou na membráně byla hodnocena na základě parametru integrované optické denzity (IOD), která se rovná součinu průměrné optické denzity a plochy, kde proběhla reakce proteinu s protilátkou. Stanovené hodnoty byly následně vztaženy k IOD referenčního proteinu tubulinu, který se vyskytuje ve všech typech buněk a takto byla získána relativní integrovaná optická denzita (RIOD).

Proteiny Bcl-2 i Bax byly pomocí imunodetekce nalezeny ve všech kategoriích dlouhodobě kultivovaných buněk. Míra exprese proteinů ze skupiny Bcl-2 v kumulárních buňkách byla hodnocena po různé době kultivace, a to jak z 2D, tak z 3D kultivačního prostředí s přídavkem hydrogelu GrowDex. Hypotéza, že ve 3D kultivačním systému bude vyšší exprese anti-apoptotického proteinu, a naopak nižší exprese pro-apoptotického proteinu nebyla potvrzena. Anti-apoptotický protein Bcl-2 nevykazoval statisticky významnou vyšší míru exprese ve 3D systému s GrowDex oproti 2D prostředí. Jediný významný rozdíl byl zjištěn v délce kultivace do 16 dní. Ani předpokládaná nižší exprese pro-apoptotického proteinu Bax ve 3D systému s GrowDex nebyla statisticky prokázána, a to v žádné z kategorií hodnocených kumulárních buněk.

Z pohledu exprese markerů apoptózy i výsledků jaderného zrání jsou oba kultivační systémy srovnatelné. V budoucích experimentech by bylo vhodné zaměřit se na další 3D kultivační systémy a detekci nových markerů, jako jsou markery proliferace a diferenciací.

Klíčová slova: Prase, kumulo-oocytární komplexy, kultivace, markery apoptózy, 3D systém, detekce proteinů

3D culture system with GrowDex for cumulus-oocytes complexes cultivation

Summary

Culture systems using three-dimensional (3D) environment represent an advanced approach in cell culture, as they better reflect the natural environment of cells and support their development.

The aim of the diploma thesis was to compare a 3D culture system for long-term cultivation of porcine oocyte-surrounding cells using cellulose hydrogel GrowDex with a standard 2D culture medium in terms of expression of selected markers of apoptosis.

Nuclear maturation of cumulus-oocytes complexes (COCs) in a 3D culture medium with the addition of GrowDex hydrogel at various concentrations (1 and 0.5%) was first evaluated. Oocytes cultured in M199 culture medium supplemented with GrowDex hydrogel (3D) at all used concentrations showed comparable nuclear maturation results to the control (2D).

Cumulus cells from the oocytes in the second meiotic metaphase stage were then left in long-term culture in 3D and standard culture medium (2D) for 2, 4, 7 and 16 days. Based on the expression of markers of apoptosis, the vital status of cultured cells was assessed. Markers of apoptosis were detected by Western blot immunodetection. The expression levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the pro-apoptotic protein Bax from the Bcl-2 family of proteins, whose members are able to regulate the permeability of the mitochondrial membrane to cytochrome c and are essential for the whole process of the intrinsic apoptotic pathway, were evaluated. The strength of the protein-antibody reaction signal on the membrane was evaluated based on the integrated optical density (IOD) parameter, which is equal to the product of the average optical density and the area where the protein-antibody reacted. The determined values were then related to the IOD of the reference protein tubulin, which occurs in all cell types, and the relative integrated optical density (RIOD) was obtained.

Both Bcl-2 and Bax proteins were found by immunodetection in all categories of long-term cultured cells. The level of expression of Bcl-2 family proteins in cumulus cells was evaluated after different cultivation times, both from 2D and 3D culture medium with the addition of GrowDex hydrogel. The hypothesis that in the 3D culture system there will be a higher expression of the anti-apoptotic protein and, conversely, a lower expression of the pro-apoptotic protein was not confirmed. The anti-apoptotic protein Bcl-2 did not show a statistically significant higher expression rate in the 3D system with GrowDex compared to the 2D environment. The only significant difference was found in the length of cultivation up to 16 days. The presumed lower expression of the pro-apoptotic protein Bax in the 3D system with GrowDex was not statistically proven in any of the categories of cumulus cells.

From the point of view of the expression of apoptotic markers and the results of nuclear maturation, both culture systems are comparable. In future experiments, it would be possible to focus on other 3D culture systems and detect other markers, such as markers of proliferation and differentiation.

Keywords: Pig, cumulus-oocyte complexes, cultivation, apoptotic markers, 3D system, protein detection

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Oogeneze	3
3.1.1	Fáze množení a vznik folikulu	3
3.1.2	Fáze růstu a vývoj folikulu	5
3.1.2.1	Folikulogeneze	6
3.1.2.2	Kumulární buňky a expanze kumulu	7
3.1.3	Fáze meiotického zrání	8
3.1.4	Faktory zapojené do regulace oogeneze	9
3.2	Apoptóza a proteiny Bcl-2 rodiny	16
3.2.1	Apoptóza	16
3.2.2	Proteiny Bcl-2 rodiny	18
3.2.2.1	Bcl-2	19
3.2.2.2	Bax	20
3.3	3D kultivační systémy	21
3.3.1	Rozdíly ve 2D a 3D kultivaci	21
3.3.2	Typy 3D modelů	22
3.3.3	GrowDex®	24
3.3.4	Kultivace COCs ve 3D kultivačním systému	25
4	Metodika	26
4.1	Odběr vaječníků a izolace oocytů	26
4.2	Kultivace COCs	26
4.3	Stanovení exprese proteinů Bcl-2 a Bax metodou Western Blot	27
4.4	Statistická analýza	29
4.5	Uspořádání experimentů	29
5	Výsledky	31
5.1	Hodnocení jaderného zrání COCs ve 2D a 3D kultivačním prostředí	31
5.2	Detekce proteinů Bcl-2 a Bax v kultivovaných kumulárních buňkách metodou Western blot	32
6	Diskuze	38
7	Závěr	40
8	Literatura	41

1 Úvod

Výzkum v oblasti reprodukčních biotechnologií prochází v současné době rychlým rozvojem, a to jak v případě humánní medicíny, tak v chovech hospodářských zvířat. Vzhledem k přísným legislativním regulím EU jsou pro získávání nových poznatků v oblasti biotechnologie reprodukce namísto lidských oocytů často využívány oocyty různých druhů zvířat. Vhodným modelovým organismem pro studium samičích pohlavních buněk je prase, jehož oocyty se podobají lidským (Santos et al. 2014). Prase je také významným hospodářským zvířetem, a protože efektivita metod využívaných při jeho asistované reprodukci je nízká, je potřeba efektivitu těchto technologií nadále zvyšovat.

Pro studium principů regulace reprodukce je nutné získat zralé oocyty s ukončeným stádiem růstu, které se však *in vivo* ve vaječníku vyskytují v omezeném množství. Kvalitu *in vitro* oocytů uplatnitelných pro reprodukční biotechnologie ovlivňuje významnou měrou použitý kultivační systém. Standardní 2D systém kultivace naráží na limity, jako je například omezení komunikace mezi oocytem a okolními kumulárními buňkami přes spoje označované jako gap junctions. Proto jsou pro kultivaci kumulo-oocytárních komplexů, popřípadě kumulárních buněk hledány alternativy, jednu z nich může poskytnout trojrozměrný kultivační systém (3D). 3D systémy představují pokročilý přístup v buněčné kultivaci, protože přesněji napodobují přirozené prostředí buňky a podporují její růst, vývoj a funkci. Uplatňují se také často ve výzkumu nádorů, při studiu působení léčiv nebo v tkáňovém inženýrství (Jensen & Teng 2020). Kumulo-oocytární komplexy prasete nebyly podle dostupných záznamů nikdy kultivovány v trojrozměrném systému využívající přírodní hydrogel GrowDex®. Kvalitu kultivačního prostředí je možné posuzovat z pohledu exprese markerů programované buněčné smrti, apoptózy. Apoptóza je fyziologický děj vyznačující se specifickými biochemickými a morfologickými procesy (Reed 2000). Důležitou roli v regulaci apoptózy mají proteiny Bcl-2 rodiny, jako je Bcl-2 a Bax, přičemž stanovení hladiny jejich exprese může sloužit jako významný marker vitálního stavu kultivovaných buněk.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce bylo srovnat 3D kultivační systém pro dlouhodobou kultivaci oocyty obklopujících buněk využívající celulózný hydrogel GrowDex se standardním 2D kultivačním prostředím z pohledu exprese vybraných markerů apoptózy.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

Procesem oogeneze se nazývá přeměna diploidní zárodečné buňky, zvané oogonie, ve zralou samičí pohlavní buňku – oocyt (Lasman et al. 2020). Během této doby buňka prochází diferenciacním procesem, při kterém získává schopnost být oplozena a dát vznik novému jedinci (Elkouby & Mullins 2017).

V průběhu oogeneze gameta podstupuje zrací dělení (meiózu), kdy dojde ke snížení počtu chromozomů na poloviční (haploidní) počet. Tímto způsobem je zajištěno, že se během procesu oplození obnoví plná (diploidní) sada chromozomů. Meióza hraje důležitou roli nejenom v přesném přenosu genetického materiálu, ale rovněž zajišťuje genetickou variabilitu vytvářením nových kombinací během překřížení chromatid (crossing-over) v pachytene I. zracího dělení a náhodnými rekombinacemi chromozomových sad na konci I. zracího dělení (Vacek 2011).

Tento proces můžeme rozdělit do tří fází: fáze množení, fáze růstu a fáze zrání.

Oocyt, největší buňka v samičím organismu, se vyvíjí v ovariálním folikulu, specializované části vaječnicku nacházející se v jeho kůře (Johnson 2018). Folikul je funkční jednotkou vaječnicku, podporuje vývoj kompletního vajíčka a vždy obsahuje jeden oocyt obklopený granulózními buňkami (Arroyo et al. 2020). Folikulogeneze je oddělený proces tvorby folikulu, který provází a podporuje všechny fáze oogeneze.

Na rozdíl od spermatogeneze probíhající u samečů, kde je kladen důraz na pohyblivost gamety, během oogeneze vzniká gameta zajišťující prostředí pro zdárný vývoj životaschopného organismu. Kromě haploidního jádra oocyt obsahuje cytoplazmatické enzymy, mRNA, organely a metabolické substráty (Gilbert 2000).

3.1.1 Fáze množení a vznik folikulu

Buňky, které dávají vznik oocytům, se nazývají primordiální zárodečné buňky (Primordial Germ Cells, PGCs) a během gastrulace se vyvíjí v zadní části primitivního proužku. Následně migrují do endodermu žloutkového váčku, aby se poté přesunuly přes zadní střevo do pohlavní lišty. Přesun PGCs do pohlavní lišty probíhá nejprve pasivně, poté je podmiňován chemoatraktanty, jako je transformující růstový faktor (TGF β 1) a aktivin. Chemoatraktanty zároveň ovlivňují jejich mitotickou aktivitu (Van den Hurk & Zhao 2005), která ještě před vstupem na místo budoucí pohlavní žlázy vede ke zvýšení jejich počtu na několik tisíc (Fulka 2007). Pohyb je mimo jiné zprostředkován c-kit receptorem vystaveném na PGCs a jeho ligandem vystaveném na buňkách podél migrační trasy těchto buněk (Fleischman 1993). Jakmile PGCs osídlí genitální lištu, diferencují se v závislosti na pohlaví na oogonie nebo spermatogonie vykazující vysokou mitotickou a transkripční aktivitu (Picton et al. 1998).

Až donedávna se předpokládalo, že celkový počet folikulů je stanoven již na začátku života a každý z nich prodělá buď ovulaci, anebo ve většině případů zaniká (McGhee & Hsueh 2000). Podle starého dogmatu reprodukční biologie se po prenatálním vývoji samice PGCs již nemnoží a počty zárodečných buněk trvale ubývají. V roce 2004 však profesor Jonathan Tilly se svým týmem popsali přítomnost buněk na myších ováriích vykazujících podobnost s PGCs a po dalším zkoumání zjistili, že tyto buňky jsou schopny nahradit populaci zanikajících oocytů.

Uvádějí také, že bez dalšího doplňování zárodečných buněk by byly zásoby oocytů rychle vyčerpány (Johnson et al. 2004). O rok později došli Johnson et al. (2005) k závěru, že do vaječnicku tyto buňky mohou migrovat ze zásobárny v kostní dřeni.

PGCs se zanořují do kůry budoucích vaječníků a přeměňují se na oogonie, které se mitoticky dělí a shlukují v jednotné skupiny původem z jedné buňky. Cytokineze však není úplně dokončena a oogonie zůstávají spojeny cytoplazmatickými můstky neboli gap junctions a tvoří zárodečnou lištu. Gap junctions slouží ke komunikaci a přenosu látek mezi oogoniemi i somatickými buňkami, které je obklopují (Elkouby & Mullins 2017). Jsou tvořeny konexinovými proteiny a prochází jimi látky jako jsou metabolity, aminokyseliny a nukleotidy, informační molekuly a inhibiční a stimulační meiotické faktory. Konkrétně protein konexin-37 je oocyty exprimován ve všech fázích folikulárního vývoje (McGhee & Hsueh 2000; Amleh & Dean 2002).

Oogonie prasete dosahují velikosti asi 13 μm (Anderson 2009). Jednotlivé oogoniální skupinky od sebe dělí buňky célomového epitelu, vyrůstající z ovariálního povrchu. Tyto buňky postupně prorůstají do shluků oogonií, oddělují je od sebe a tím je zastaveno mitotické dělení. Oogonie obalené touto vrstvou epitelu se stávají oocyty I. řádu a vstupují do profáze meiózy I. Buňky, které je obklopují jsou buňky folikulární (Vacek 2011). Meióza u prasete začíná asi od 40. dne embryonálního vývoje (Hunter 2000).

Primární oocyt a buňky jej ohraničující tvoří společně primordiální folikul, který sestává jen z jedné vrstvy granulóznic buněk kolem oocytu (Jaffe & Egbert 2017). Folikulární buňky jsou mezi sebou spojeny těsnými spoji (tight junctions), které uzavírají intercelulární prostory (Vacek 2011). Během vývoje oogonie uvnitř vaječnicku apoptoticky zanikají a zůstávají pouze ty zárodečné buňky, které se nacházejí u povrchu (Sadler 2011). U prasete se po zániku množství zárodečných buněk jejich počet snižuje asi o 60 % oproti původnímu počtu (Van den Hurk & Zhao 2005).

Do první meiózy vstupují oocyty se zdvojenou DNA (Jaffe & Egbert 2017). Meióza je započata vstupem do profáze, která se dělí do pěti fází: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplojene* a *diakineze*. Během leptotene spiralizují chromozomy a rozpadají se jaderné póry, ve fázi zygotene se párují homologní chromozomy a tvoří bivalenty (Sánchez & Smits 2012). V pachytene dochází k rekombinacím mezi chromozomy (crossing-over), během kterého se vymění části nesesterských chromatid homologních chromozomů. Poté se oocyty dostávají do fáze diplojene, kde se chromatidy oddělují a zůstávají spojeny pouze v chiazmatech. Chromatidy se pak od sebe oddělí úplně (Hunt & Hassold 2008).

Meióza se zastavuje ve stádiu diplojene (diktyotene), pro které je typická neporušená membrána jádra i jadérka a částečně kondenzovaný chromatin (Jaffe & Egbert 2017). Diktyotene je pojem pro stádium nedokončené meiózy, ve kterém je primární oocyt zastaven. Savčí oocyty zůstávají v profázi I různě dlouhou dobu a do další fáze vstoupí, až když buňka začne před ovulací dozrávat. Během tohoto období má stále diploidní počet chromozomů (Sadler 2011).

První zrací dělení je přerušeno působením inhibičních faktorů, například inhibitorem OMI (Oocyte Maturation Inhibitor), který produkují folikulární buňky. Meiotický blok je následně udržován mnoha faktory, z nichž nejvýznamnějším je cyklický adenosin monofosfát (cAMP), který je podporován působením cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) (Vacek

2011; Jaffe & Egbert 2017). V prvním meiotickém bloku oocyty setrvávají vlivem folikulárních buněk. To dokázaly pokusy dle Pincuse a Enzmanna (1935), kdy oocyty odebrané z antrálního folikulu spontánně obnovily meiózu a dozrály až do metafáze II.

Přestože je jejich vývoj pozastaven, jsou oocyty synteticky aktivní. V této fázi mají rozlišitelné, velké jádérko. Jádro oocytu v meiotickém bloku má sférický tvar a je označováno termínem zárodečný váček (GV, Germinal Vesicle) (Manandhar et al. 2005). V rostoucím oocytu se intenzivně tvoří všechny typy RNA, které jsou nezbytné pro později probíhající proteosyntézu. Dále se v pachytene tvoří proteiny jako je tubulin a specifické jaderné proteiny, mezi které řadíme například histony uplatňující se při expresi genů regulujících syntézu RNA (Vacek 2011).

Dlouhé setrvání v prvním meiotickém bloku zároveň poskytuje oocytu příležitost pro hromadění poškozené DNA. Buňka na toto poškození může reagovat zastavením buněčného cyklu, anebo zahájením apoptózy. Primordiální a primární folikul syntetizuje regulační molekuly, jako je například TAp63, umožňující odpovědět na poškození DNA zahájením apoptózy. Expresí těchto molekul se však v antrálním folikulu snižuje a místo toho jsou oocyty s poškozenou DNA schopné zastavit svůj vývoj v metafázi I (Collins & Jones 2016).

3.1.2 Fáze růstu a vývoj folikulu

Po fázi množení nastupuje fáze růstu, během které oocyty zůstávají v prvním meiotickém bloku (Kaser et al. 2019). Fáze růstu trvá od puberty až do ukončení pohlavní aktivity a každý ovariální cyklus vstupuje do této fáze několik primárních oocytů.

Zastavený oocyt ve fázi GV syntetizuje glykoproteinový obal, *zona pellucida*, která je tvořena ze tří vrstev: ZP1, ZP2, ZP3 (Kaser et al. 2019). Glykoproteiny *zona pellucida* jsou zodpovědné za druhově specifickou vazbu spermií, vyvolávají jejich akrozomální reakci a zabraňují polyspermii (Wassarman 2008).

Oocyty musí dorůst do odpovídající velikosti, aby byly schopny podstoupit zrání, následnou fertilizaci a buněčné dělení. Během zvětšování svého objemu se také diferencují. Cytoplazma dostává nové uspořádání, orgány se přeskupují, modifikují a vznikají nové. Dochází ke zvýšení hladiny intracelulárního vápníku (Picton et al. 1998). Oocyt prasete se zvětší ze 30 μm na 120 μm (Motlík & Fulka 1986).

Dochází ke vzniku tzv. Balbianiho žlutkového jádra, shluku organel v cytoplazmě poblíž jádra, které obsahuje endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát a proteiny. V rostoucím folikulu se rozšiřuje k okrajům buňky a rozpadá se na menší části (Cox & Spradling 2003). Vzniká velké množství ribozomů, RNA a proteinů sloužících k transportu a skladování látek, membránových vezikulů či granul (Van den Hurk & Zhao 2005).

Zároveň s růstem, kdy se zvětšuje buněčná hmota, probíhají v oocytu kvalitativní změny v organelách a informačních molekulách, které budou regulovat určité vývojové funkce. Například geny maternálního účinku jsou sekvencemi, které jsou transkribovány a translatovány již během oocytárního růstu, ale jejich regulační funkce je vyžadována až po oplození (Li et al. 2010).

3.1.2.1 Folikulogeneze

Primordiální folikuly jsou během života samice kontinuálně vybírány mezi rostoucí folikuly (Hirshfield 1991). Do fáze růstu vždy vstupuje několik folikulů (Van den Hurk & Zhao 2005). Mimo reprodukční věk samice folikuly taktéž vstupují do fáze růstu, nemohou však dosáhnout ovulační velikosti a zanikají, protože nedochází ke stimulaci gonadotropiny (Salha 1998).

Poté, co se vrstva plochých buněk změní na kubické, označuje se folikul jako primární. Během tohoto stádia se však velikost folikulu příliš nemění (Van den Hurk & Zhao 2005). Kolem oocyty vzniká obal *membrana granulosa* a současně dochází k růstu oocyty.

Granulózní buňky vykazují vysokou proliferační aktivitu a vytvářejí několik vrstev; v tuto chvíli se již folikul označuje jako sekundární (také preantrální). Tyto buňky obklopují oocyt a obsahují na svém povrchu receptory pro FSH a estrogény. Z intersticiálních buněk vznikají buňky théky, které obalují granulózní buňky – *theca folliculi externa* a *theca folliculi interna*. U prasnic dosahuje preantrální folikul velikosti přibližně 300 μm a oocyt uvnitř folikulu stále roste (Van den Hurk et al. 1997; Hyttel et al. 1999). *Theca folliculi interna* obsahuje receptory pro LH a při nárůstu hladiny tohoto hormonu začnou její buňky syntetizovat testosteron, který se transportuje do *theca folliculi externa*, kde je enzymem cyp19 aromatázou přeměněn na estrogény. Estrogény společně s FSH podněcují sekreci granulózních buněk, čímž vzniká dutina vyplněná tekutinou, *antrum folliculi*. FSH zároveň podporuje vytváření LH receptorů na granulózních buňkách (Eppig 2001).

Zatímco oocyty hlodavců dosáhnou své plné velikosti před tvorbou dutiny, u prasat a skotu oocyty stále rostou, když folikuly dosáhnou časného antrálního stádia. Folikulární antrum je u prasete plně diferencováno ve folikulech o průměru asi 0,4–0,8 mm a je vyplněno tekutinou (Motlík & Fulka 1986).

Granulózní buňky se dělí na dvě rozdílné vrstvy: murální granulózní buňky z vnějších buněk a kumulární buňky obklopující oocyt. Oocyt dorůstá do plné velikosti, ale meiotické zrání je stále zastaveno (Mehlmann 2005). Kumulární buňky těsně obklopují oocyt a zprostředkovávají jeho metabolické procesy. Murální buňky po vnitřním obvodu folikulu jsou více aktivní ve tvorbě steroidních hormonů než kumulární buňky, které produkují kyselinu hyaluronovou a zajišťují expanzi kumulu (Li et al. 2000).

Antrální tekutina je důležitým zdrojem regulačních látek, jako jsou gonadotropiny, steroidy, růstové faktory, enzymy, proteoglykany a lipoproteiny, pocházejících z krve nebo folikulárních buněk. Folikul je v tomto stádiu citlivý ke gonadotropinové stimulaci a po zvýšení hladiny FSH podstupuje další růst (Driancourt 2001).

Výběr dále rostoucích folikulů funguje na principu velikosti. Čím větší folikul je, tím menší množství FSH vylučovaného z hypofýzy potřebuje a zároveň produkuje více estrogenů, které zpětně snižují tvorbu FSH a tím způsobuje atrezii ostatních folikulů (Zelesnik 2004). V dozrávajícím folikulu je primárně syntetizovaným estrogenem estradiol (Liu et al. 2017). Sekrece estradiolu dominantním folikulem spouští nárůst LH a následně ovulaci (Boron & Boulpaep 2016).

Preovulační, anebo Graafův folikul, je největší a skládá se z přibližně 2–3 vrstev vnitřních kumulárních granulózních buněk a dále z 5–10 okolních vrstev murálních granulózních buněk. Obsahuje *cumulus oophorus*, vejconosný hrbolek tvořený granulózními buňkami. Tento folikul

je připraven k ovulaci oocytu a promínuje nad povrch vaječníku. Gap junctions spojují všechny granulózní buňky ve funkční syncytium, stejně jako buňky kumulární s oocytem. Buňky kumulární komunikují s oocytem přes extracelulární vrstvu *zona pellucida* (Jaffe & Egbert 2017).

Prasečí folikuly se během svého růstu a zrání zvětšují přibližně trojnásobně a v době ovulace dosahují velikosti okolo 2 – 5 mm (Motlík et al. 1984). Oocyty prasníc v Graafových folikulech mají průměr asi 120 μm v době ovulace a *zona pellucida* dosahuje tloušťky přibližně 8,6 μm . Mitochondrií je v oocytu přibližně 200 000. Těsně pod vitelinní membránou se nachází množství kortikálních granul o průměru 0,2 μm . Kortikální granula jsou malé organely, jejichž obsah se po penetraci spermie vylíje do perivitelinního prostoru a dojde k jevu „zona hardening“. Ten je popsán jako změna složení ZP, která následně tvrdne a stává se odolnější vůči proteolytickému štěpení (Coy et al. 2008; Anderson 2009).

Schopnost oocytu obnovit meiotické zrání a úspěšně ho dokončit je označována jako meiotická kompetence. Plně dorostlé prasečí oocyty s průměrem 120 μm jsou meioticky kompetentní a jsou schopné dozrát do stádia druhé metafáze. Oocyty s průměrem 110 μm mohou dosáhnout při kultivaci v *in vitro* podmínkách stádia první meiotické metafáze, jsou tudíž označovány jako částečně meioticky kompetentní. Oocyty menší než 100 μm jsou zcela meioticky nekompetentní a pokud jsou kultivovány v podmínkách *in vitro*, nejsou schopny vystoupit ze stádia zárodečného vajíčku (Motlík & Kubelka 1990; Tichovská et al. 2011).

3.1.2.2 Kumulární buňky a expanze kumulární

Kumulární buňky obklopují oocyt a společně s ním tvoří kumulo-oocytární komplex (COCs) (Nevoral et al. 2015). Komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami je základním předpokladem pro meiotické zrání. Kromě toho podporují širokou škálu procesů ve zrajícím oocytu, jako například přeměnu látek či přeskupení cytoskeletu (Coticchio et al. 2015). Kumulární buňky v nejbližším kontaktu se *zona pellucida* se označují jako *corona radiata* a jsou paprscitě uspořádány. *Corona radiata* se společně s ostatními buňkami kumulární podílí na výživě a zprostředkování signálů nutných pro meiotické zrání. Z vrstvy *corona radiata* vystupují dlouhé výběžky přes *zona pellucida* až do povrchu oocytu. Ty zprostředkovávají inhibiční faktory z kumulárních buněk zabráňující oocytu vystoupit z prvního meiotického bloku. Vlivem LH se mezibuněčné spoje přerušují, intercelulární prostory jsou vyplněny kyselinou hyaluronovou a inhibiční vliv zaniká, čímž může dojít k obnovení cyklu (Mattioli & Barboni 2000).

Během meiotického zrání oocytu dochází k expanzi kumulární, během níž kumulární buňky mění svoji morfologii a metabolickou aktivitu. Expandovaný kumulární při ovulaci napomáhá uvolnění COCs ze stěny folikulu a jeho vyloučení do nálevky vejcovodu, účastní se také fertilizace a vývoje časného embrya. Bylo prokázáno, že u prasat míra expanze koreluje s mírou meiotické zralosti oocytu (Yokoo et al. 2010). Proces je doprovázen rozsáhlým přeskupením cytoskeletu kumulárních buněk a syntézou velkého množství extracelulární matrix složené z proteoglykanů, které jsou tvořeny membránovými proteiny buněk kumulární a glykosaminoglykany (GAG) (Nevoral et al. 2014). Nejvýznamnějším glykosaminoglykanem je kyselina hyaluronová (hyaluronan), která je syntetizována hyaluronan syntázou 2 (HAS2) (Bláha et al. 2017). Hyaluronan se váže na receptor CD44 na povrchu kumulárních buněk a předpokládá se, že aktivace tohoto receptoru u prasat indukuje obnovení meiózy (Yokoo et al.

2010). K expanzi kumulu dochází bezprostředně před ovulací jak *in vivo*, tak i při kultivaci COCs v *in vitro* prostředí (Nevoral et al. 2014).

Podle Sánchez & Smitze (2012) jsou plně vzrostlé GV oocyty v antrálních folikulech významnými regulátory funkce kumulárních buněk. Před vzestupem hladiny LH oocyty ovlivňují jejich růst, dělení, a také metabolickou aktivitu jako je příjem aminokyselin, glykolýza a syntéza cholesterolu. Po nárůstu hladiny LH oocyty regulují expresi genů kumulárních buněk zodpovědných za expanzi kumulu.

3.1.3 Fáze meiotického zrání

Proces, ve kterém oocyt dokončí první redukční dělení a podstupuje cytoplazmatické změny, se nazývá oocytární zrání a zahrnuje vznik faktorů nezbytných pro dokončení vývoje (Mehlmann 2005). Kumulární buňky zde hrají důležitou roli v podpoře a regulaci oocytu (Coticchio et al. 2015). Po skončení růstové fáze oocytu již neprobíhá téměř žádná transkripce a oocyt využívá jen vytvořených a uskladněných transkriptů (Moor & Dai 2001).

Obnovení meiózy je zahájeno v reakci na nárůst hladiny luteinizačního hormonu (LH) vylučovaného z hypofýzy během estrálního cyklu krátce před ovulací (Mehlmann 2005). Pouze plně dorostlé oocyty jsou schopné reagovat na stimul LH (Manandhar et al. 2005). Receptory pro LH jsou lokalizovány ve vrstvě murálních granulózních buněk, v kumulárních buňkách se nachází jen malé množství a v oocytu se nevyskytují. Mechanismus stimulace zrání je tedy nepřímý (Peng et al. 1991; Eppig et al. 1997). Spouštěčem ovulace je rovněž LH; způsobuje prasknutí folikulu a uvolnění oocytu do vejcovodu, aby mohlo dojít k oplození (Jaffe & Egbert 2017). Oocyt opouští vaječník spolu se *zona pellucida* a *corona radiata*.

Pod vlivem LH plně vzrostlý oocyt ve fázi GV vystoupí z meiotického bloku a projde metafází I, anafází I a telofází I (Kaser et al. 2019). Podle Pan & Li (2019) je obnovení meiotického zrání charakterizováno rozpadem jaderné membrány oocytu, pro který existuje pojem GVBD (Germinal Vesicle Breakdown). Dochází ke zmizení jadérka a chromozomy kondenzují (Edwards & Gates 1959; Trounson et al. 2001).

Oocyty prasete dokončí první meiotické dělení asi 36–40 hodin po vzestupu hladin gonadotropinů (Hunter 2000). Během něho je jedna sada chromozomů segregována do malé buňky zvané pólové tělísko. Toto dělení zredukuje diploidní počet chromozomů v oocytu z diploidního (2n) na haploidní (n) počet (Jaffe & Egbert 2017). Výsledkem jsou tedy dvě buňky s haploidním počtem chromozomů, přičemž každý chromozom je složen ze dvou chromatid. Pólové tělísko se nachází v bezprostřední blízkosti oocytu, mezi buněčnou membránou a *zona pellucida* (Szmelskyj et al. 2014).

Vstupem do profáze II je zahájena druhá meióza, před kterou již neprobíhá replikace DNA (S-fáze). Oocyt poté přechází do metafáze II, zbývající chromozomy se shromažďují na druhé meiotické vřeténko, ale zde se meióza opět zastaví. V tomto stádiu je oocyt ovulován z vaječníku a vstupuje do vejcovodu, připraven k oplození. Setrvává v metafázi II, dokud oplození spermií neposkytne stimul pro dokončení meiózy a zahájení embryonálního vývoje (Van den Hurk & Zhao 2005; Jaffe & Egbert 2017).

Po fertilizaci dojde k obnovení druhého meiotického dělení a nastává anafáze II, kdy se oddělují sesterské chromatidy a následně v telofázi II putují samostatně k opačným pólům buňky. Po dokončení druhé meiózy vzniká druhé pólové tělísko, zároveň může první pólové

tělisko procházející mitózou a rozdělit se na dvě. Poté všechny tři pólocyty zanikají a jsou resorbovány (Lasman et al. 2020). Z původní jedné buňky mateřské vznikají čtyři nestejně haploidní buňky dceřinné a v oocytu zůstane jedna kopie každého genu.

Při cytoplasmatickém zrání vznikají podmínky k blokování polyspermie, dekondenzaci penetrované spermie a formaci prvojádra těsně po oplození. Přeskupují se organely, mitochondrie se přesouvají na okraj oocytu a kortikální granula se shlukují podél oolemy (Van den Hurk & Zhao 2005). Cytoplasmatické zrání je zahájeno poté, co se oocyt stane meioticky kompetentním. Zahrnuje hromadění velkého množství molekul, jejich modifikaci a tvorbu lipidů a glykogenu. S cytoplasmatickou zralostí souvisí vývojová kompetence, která se vztahuje na schopnost oocytu být oplozen a vyvinout se ve zdravé embryo schopné dokončit svůj vývoj (Sánchez & Smits 2012).

3.1.4 Faktory zapojené do regulace oogeneze

Meióza je řízena množstvím regulačních faktorů, jimiž je buď inhibována či naopak spouštěna. Zásadní roli hraje kaskáda fosforylací a defosforylací regulovaná protein kinázami a fosfatázami. Konečným důsledkem vzestupu hladiny LH před ovulací je především snížení hladiny cAMP a vystoupení z meiotického bloku (Fan et al. 2002).

Cyklické nukleotidy

Za klíčový faktor působící v meiotickém bloku je považován cAMP. Ve spolupráci s druhým buněčným poslem cGMP ovlivňuje zastavení či spuštění meiózy (Pan & Li 2019).

Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP) zabraňuje oocytu předčasně obnovit meiózu a tím ho udržuje v profázi I. Je produkován granulózními buňkami a transportován přes gap junctions do oocytu (Mehlmann 2005; Hinckley et al. 2005), ale je tvořen i v oocytu samotném (Mehlmann et al. 2002; Jaffe & Egbert 2017). cAMP vzniká z ATP činností enzymu adenylát cyklázy (AC). Oocyt je schopný tvořit cAMP přes G-spřažený receptor v oolemě, který stimuluje G-protein (Gs) a následně adenylát cyklázu (Mehlmann 2005).

Vysoké hladiny cAMP v oocytu udržují cyklin-dependentní kinázu (CDK1) neaktivní pomocí signalizace PKA (Adhikari & Liu 2014). cAMP aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA), která má inhibiční vliv na meiotické zrání (Lazar et al. 2002). PKA je složena ze dvou podjednotek, a to katalytické a regulační (Wassarman 1988; Fan 2002). Pokud dojde k vazbě cAMP na regulační podjednotku, je uvolněna podjednotka katalytická a ta následně spouští fosforylací proteinů, které nemohou aktivovat CDK1. Tím se meióza zastaví v první profázi (Wassarman, 1988; Sasseville et al. 2006). V izolovaných oocytech může být obnovení meiózy potlačeno přidáním membrány prostupujícího cAMP odolným vůči hydrolýze nebo inhibitoru cAMP fosfodiesterázy (Jaffe & Egbert 2017).

Před obnovením meiózy klesne hladina cAMP, který následně nemůže spustit aktivaci PKA a je tedy umožněno CDK1 a cyklinu B (popsáno níže), aby obnovili buněčný cyklus (Lazar et al. 2002). cAMP je degradován enzymem cAMP-fosfodiesterázou (PDE) na AMP (Bornslaeger et al. 1986). U prasečích oocytů je nejvýznamnější fosfodiesterázou PDE3A, která účinně stimuluje obnovení meiózy do 3 hodin před GVBD a přechodně ovlivňuje meiotickou progresi (Sasseville et al. 2006).

Folikulární buňky hrají klíčovou roli při udržování hladiny cAMP v oocytu během meiotického bloku produkcí cyklického guanosin monofosfátu (cGMP), který je transportován do oocytů pomocí gap junctions a inhibuje hydrolýzu cAMP.

Vlna LH ničí gap junctions ve folikulu, to zabraňuje vstupu cGMP do oocytu a vede k degradaci cAMP (Adhikari & Liu 2014). cGMP je schopný navyšovat hladinu cAMP inhibicí cAMP fosfodiesterázy (Bornslaeger et al. 1984). Je produkován v granulózních buňkách guanylát cyklázou B, která katalyzuje přeměnu GTP na cGMP (Zhang et al. 2010). Vyjmutí oocytu z folikulu snížilo hladinu cGMP (Törnell et al. 1990), to odpovídá hypotézám, že cGMP pocházející z granulózních buněk se dostává přes gap junctions do oocytu, kde inhibuje cAMP hydrolýzu a udržuje meiotický blok (Törnell et al. 1990; Törnell et al. 1991). PDE3A je tedy kompetitivně inhibovaná cGMP (Bender & Beavo 2006; Vaccari et al. 2009).

Dalším způsobem snížení hladiny cAMP je snížení produkce cGMP. To je způsobeno defosforylací a inaktivací NPR2 guanylát cyklázy. Hydrolýza cGMP je zvýšena aktivací PDE5 fosfodiesterázy. Pokles cGMP v granulózních buňkách má za následek jeho difúzi z oocytu, což zahájí obnovení meiózy. Doplňujícím mechanismem je pomalejší parakrinní signalizace extracelulárními peptidy (natriuretické peptidy typu C a ligandy receptoru EGF) udržující nízkou hladinu cGMP v oocytu (Jaffe & Egbert 2017).

Metafázi podporující faktor (MPF)

Metafázi podporující faktor (MPF) je serin/threonin protein kináza, která funguje jako spouštěč buněčné mitózy a meiózy (Dupré et al. 2013). MPF je heterodimer složený z katalytické podjednotky CDK1 (p34cdc2) a regulační podjednotky cyklinu B (Hunt & Nasmyth 1997), součástí komplexu je také nedávno objevená Greatwall kináza (Li et al. 2013).

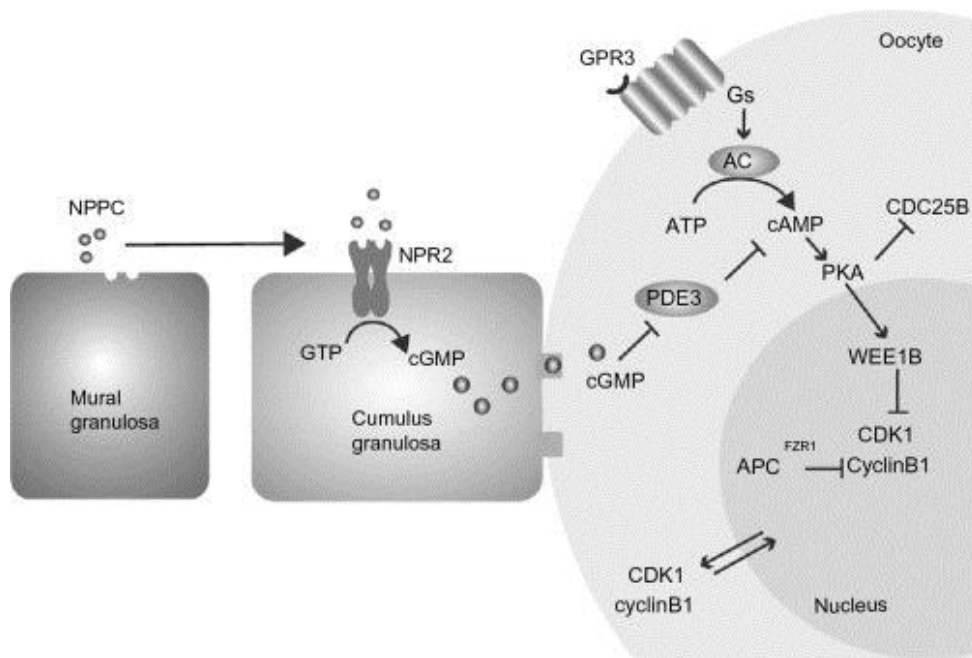
Spojením katalytické a regulační podjednotky vzniká neaktivní komplex nazývaný pre-MPF, který se vyskytuje během růstové fáze oocytů (Maller et al. 1989). V této době je podjednotka CDK1 inhibičně fosforylována na threoninu 14 a tyrosinu 15 (Jones 2004). Threonin 14 je fosforylován vlivem kinázy Wee1 a tyrosin 15 je fosforylován za pomoci kinázy Myt 1 (Touny & Banerjee 2006). Tím je komplex pre-MPF udržován v neaktivním stavu. Faktory podílející se na zajištění meiotického bloku v profázi I jsou znázorněny na Obrázku 1. Během fáze růstu dochází v oocytu ke hromadění CDK1 a zároveň je průběžně syntetizován a degradován cyklin B. Podmínkou pro obnovení meiózy a aktivaci MPF je vysoká koncentrace CDK1 a syntéza cyklinu B (Chesnel & Eppig 1995; Viveiros et al. 2004; Eppig et al. 2012; Adhikari & Liu 2014). Aby se však komplex v reakci na hormonální signál aktivoval, je zapotřebí provést defosforylací CDK1 na threoninu 14 a tyrosinu 15, k níž dochází pomocí fosfatázy cdc25. Pro aktivaci CDK1 je tedy zapotřebí vysoká aktivita cdc25 a nízká aktivita Wee1/Myt1 (Jones 2004). Je také nutné, aby cdc25 aktivační kináza (CAK) fosforylovala CDK1 na threoninu 161 a stabilizovala tak jeho spojení s cyklinem B (Clarke 1995). Greatwall kináza tlumí účinek fosfatáz (nejvýznamněji protein fosfatázu 2A) snažících se inhibovat vytvořený komplex CDK1-cyklin B (Li et al. 2013; Vigneron et al. 2016).

Celý tento mechanismus je zahájen vytvořením počátečního prahového množství aktivovaného MPF. Jakmile je přítomna určitá hladina, podporuje další defosforylací či fosforylací na výše uvedených místech. Tato pozitivní zpětná vazba zesiluje aktivitu CDK1 a

přispívá k přechodu do metafáze (Dupré et al. 2013). GVBD se objevuje za několik hodin od aktivace MPF (Jones 2004).

K poklesu MPF dochází v průběhu dalšího meiotického zrání oocytů, tento pokles je nezbytný pro přechod z metafáze do anafáze (Mattioli et al. 1991). Snížení hladiny MPF má na svědomí komplex podporující anafázi (APC). APC ubiquitinyluje cyklin B, aby mohl být následně označen pro provedení proteolýzy a být degradován proteazómem (Jones 2004). V meióze II je aktivita MPF opět zvýšena a udržována aktivitou cytotatického faktoru (CSF), který brání proteolytické degradaci cyklinu B a tím udržuje MPF v aktivním stavu (Masui & Markert 1971; Jones 2005).

Pokles aktivity MPF, který je impulzem pro opuštění druhého meiotického bloku (Taieb et al. 1997), je způsoben až oplozením oocyty spermií (Choi et al. 1991; Fulka et al. 1992). MPF je nezbytným faktorem k buněčnému zrání, podporuje tvorbu dělicího vřeténka a podílí se na kondenzaci a segregaci chromozomů (Li et al. 2013).



Obrázek 1 Regulační faktory prvního bloku meiotického zrání. Šipky na konci čar znamenají stimulační efekt, čáry končící kolmicí znázorňují inhibiční účinek (Holt et al. 2013).

Protein kináza C (PKC)

Další faktor, který hraje důležitou roli v meiotické regulaci savčích oocytů je protein kináza C (PKC) ze skupiny serin/threonin kináz. PKC může být aktivována nejčastěji diacylglycerolem (DAG) a vápenatými ionty (Fan et al. 2002), a to signálem přes G-protein spřažený receptor, tyrosin kinázový receptor nebo nereceptorovou tyrosin kinázu. Pro aktivaci protein kinázy C je nutné odstranění pseudosubstrátové inhibiční domény z aktivního místa (Newton 1997).

Protein kinázy C můžeme rozdělit do skupin podle jejich struktury (Nishizuka 1995). První objevené a nejlépe prozkoumané jsou konvenční PKC (PKC- α , β _I, β _{II}, γ), jejichž doména

obsahuje vazebné místo pro Ca^{2+} a které mohou být aktivované Ca^{2+} , DAG nebo fosfatidylserinem (PS) (Newton 1995). Tyto PKC se podílejí na zprostředkování kortikální reakce (Fan 2003a). Druhá skupina, nové PKC (PKC- δ , ϵ , η , θ), jsou stavebně podobné konvenčním, avšak neobsahují vazebné místo pro Ca^{2+} . Atypické PKC (PKC- ζ , ι) se liší svým složením od předchozích dvou a nejsou aktivovatelné ani vápníkovými kationty, ani DAG, ale fosfatidylserinem (Newton 1995; Mellor & Parker 1998). Poslední popsané jsou protein kinázy C čtvrté skupiny (PKC- μ , PKC- ν) (Dempsey et al. 2000).

PKC se podílí na aktivaci MAPK a obnovení meiózy v prasečích COCs. Při cílené inhibici PKC není MAPK aktivována a oocyt neobnoví svůj cyklus (Procházka & Němcová 2019). V oocytech zbavených kumulárních buněk, ve kterých byla aktivována PKC, nedocházelo k rozpadu zárodečného vaku, naopak v oocytech obklopených vrstvou kumulárních buněk došlo k obnovení meiózy (Yi et al. 2019).

Aktivita PKC se od počátku meiózy zvyšuje, během metafáze I dosahuje nejvyšších hladin a ke snížení dochází při přechodu z metafáze I do anafáze I. Při oplození působí PKC jako jeden z faktorů ovlivňovaných vápenatými kationty, které spouští exocytózu kortikálních granulí a vznik prvojádra. Je také zahrnuta do regulace MPF (Fan et al. 2003a).

Mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK)

Mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK; také ERK – extracelulárně regulované kinázy) jsou důležité enzymy přenášející extracelulární signál uvnitř buňky, které se účastní procesu meiotického zrání (Chang & Karin 2001). Řadí se mezi serin/threonin protein kinázy a podílejí se na regulaci široké škály buněčných procesů jako je proliferace, diferenciace, vývoj, buněčný cyklus a apoptóza (Strnisková et al. 2002; Coulombe & Meloche 2007). U savců je MAP kináza složena ze dvou forem, ERK1 a ERK2, které jsou si navzájem velmi podobné a sdílejí stejné aktivátory i substráty (Yang et al. 2008, Lefloch et al. 2009).

Aktivace MAP kináz spočívá v řadě fosforylačních kroků na třech úrovních. MAP kinázy jsou aktivovány dvojitou fosforylací MAPK kinázami (MAPKK či MEK1) na zbytcích threoninu a tyrosinu. MAPK kinázy jsou znovu fosforylovány MAPKK kinázami (MAPKKK), konkrétně proteinem Mos, na zbytcích serinu/threoninu. Tato kaskáda zajišťuje přísnou kontrolu nad přenášenými signály a jejich specifitou, intenzitou a trváním. Stimulem pro aktivaci kaskády jsou často růstové hormony (Yang et al. 2008).

MAP kinázy dále fosforylují množství proteinů, například transkripční faktory a MAP kinázou aktivované protein kinázy (MAPKAPKs) a jsou defosforylovány MAP kinázovými fosfatázami (MKPs) (Tanoue & Nishida 2003). Jednou z protein kináz aktivovanou MAP kinázami je p90Rsk, která fosforyluje Myt1 a tím pomáhá aktivovat MPF (Palmer et al. 1999). Podle Fan & Sun (2004) je kaskáda MAP kinázy hlavním regulačním faktorem, který funguje paralelně s MPF při řízení meiotického buněčného cyklu.

Před GVBD se část molekul MAP kináz přesouvá z cytoplazmy do jádra, kde zprostředkovávají signál k zahájení zrání. K aktivaci MAP kinázy dochází během GVBD nebo do několika hodin po něm a během celého procesu zrání oocyty zůstává vysoce aktivní (Stojkovic et al. 1999). U prasat byla nalezena zvýšená aktivita již před GVBD (Josefsberg et al. 2003).

Během zrání oocyty se MAPK podílí na organizaci mikrotubulů a meiotického vřeténka. Aktivace této kinázy je nezbytná pro udržení meiotického bloku v metafázi II. Až po oplození její aktivita klesá, tento pokles předchází tvorbě prvojadra (Fan & Sun 2004).

Cytostatický faktor (CSF)

Zatímco jsou oocyty zastaveny ve druhé meiotické metafázi, je jejich stabilita závislá na cytostatickém faktoru (CSF) (Masui & Markert 1971; Schmidt et al. 2006). V této fázi je aktivita CSF a jím udržovaného MPF vysoká (Kubiak et al. 1993). Pomocí CSF zůstává inhibován APC, jeden ze základních regulátorů buněčného cyklu, který jinak degraduje cyklin B (Murray et al. 1989). CSF se skládá z aktivity tří proteinů: Mos, MAP kinázy a p90Rsk (Sagata et al. 1989; Haccard et al. 1993; Bhatt & Ferrell 1999)

Serin/threonin protein kináza Mos je produktem proto-onkogenu c-Mos a je syntetizována během oogeneze (Sagata et al. 1989). Protein kináza Mos aktivuje MAP kinázu (Masopust & Průša 2003). MAP kináza fosforyluje protein p90Rsk a ten následně spouští činnost proteinu Bub1, který je s pomocí proteinů Mad1 a Mad2 zodpovědný za potlačení aktivity APC (Heytens et al. 2008). Tato signální dráha slouží k aktivaci MPF (Choi et al. 1996).

Bylo zjištěno, že proteiny ze skupiny Emi/Erp jsou důležitými složkami CSF. Podílejí se na inhibici APC a po oplození jsou degradovány (Schmidt et al. 2006).

Mos-protein je po oplození degradován a snižuje se aktivita cytostatického faktoru, který se ztrácí z cytoplazmy a cytosolu oocyty, čímž se dokončí meiotické dělení (Shibuya & Masui 1988; Masopust & Průša 2003). CSF také potlačuje aktivitu mikrotubulárních proteinů a ochraňuje dělicí vřeténko před poškozením (Tilston 2009).

Vápník (Ca^{2+})

Vápenaté kationty jsou důležitým druhým intracelulárním poslem. Signalizace vápníku reguluje různé fyziologické procesy, jako je růst buněk, svalová kontrakce, sekrece hormonů, neuronové vzruchy a jiné (Allbritton & Meyer 1993). Koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky je asi 20 000krát nižší než v extracelulárním prostoru. Protože vápník nemůže být metabolizován jako jiní sekundární poslové a jeho dlouhodobě vysoké hladiny v cytosolu vedou k buněčné smrti, je udržován na nízkých hladinách prostřednictvím mnoha vazebných proteinů, z nichž nejdůležitější je kalmodulin (Clapham 1995). Kalmodulin při navázání vápenatých iontů mění svou konformaci a je schopný měnit aktivitu jiných proteinů, z nichž významnými jsou kalmodulin dependentní kinázy (CaMK) fosforylující proteiny (Alberts 2002). Podle Fan et al. (2003b) v oocyty hraje významnou roli CaMKII, která se podílí na degradaci cyklinu B. Při experimentální inhibici CaMKII nedocházelo k degradaci cyklinu B.

K uskladnění vápenatých iontů v buňce slouží organely jako endoplazmatické retikulum a mitochondrie, dále je obsažen v karyoplazmě, vakuolách a na povrchu lipidových granul (Clapham 1995; Petr et al. 2001). ER aktivně ukládá Ca^{2+} do svého vnitřního prostoru pomocí SERCA pump ve své membráně s využitím ATP, kde je následně vázán s vazebnými proteiny (Clapham 1995).

Předovulační vlna LH spouští nárůst hladiny vápníku v oocyty, a to signální dráhou počínající aktivací fosfolipázy C (PLC), která štěpí membránový inositolový fosfolipid

nacházející se ve vnitřní vrstvě fosfolipidové membrány (Homa et al. 1993; Alberts 2002). Odštěpením hlavičky fosfolipidu vzniká inositol-1,4,5-trifosfát (IP3), přičemž lipidový konec diacylglycerol (DAG) zůstává přítomný v membráně (Alberts 2002). IP3 jako druhý posel prostupuje cytosolem a váže se na IP3 receptory na endoplazmatickém retikulu. Tím je spuštěno otevření vápníkových kanálů a následný nárůst Ca^{2+} iontů v cytosolu buňky (Homa et al. 1993; Clapham 1995). DAG v membráně se váže s Ca^{2+} ionty a fosfatidylserinem, následně se na tento na komplex naváže PKC a dojde k její aktivaci (Wilson et al. 2015).

Druhý způsob uvolňující vápenaté ionty z ER do cytosolu je přes ryanodinové receptory, které se uplatňují zejména ve svalových buňkách a neuronech. Ryanodinové receptory rozpoznávají vápník v cytosolu, čímž vytváří mechanismus pozitivní zpětné vazby – malé množství vápníku poblíž receptoru způsobí, že uvolní ještě více vápníku (Santulli & Marks 2015).

Dle Macháty et al. (1997) prasečí oocyty mají jak receptory IP3, tak ryanodinové receptory a během vývoje oocyty se jejich dynamika mění. Uvolnění vápenatých iontů během oplození spouští endogenní signál pro degradaci cyklinu B a následně inaktivaci MPF a CSF v oocytech zastavených v metafázi II. Ca^{2+} je nezbytný k dokončení meiózy a zahájení embryonálního vývoje (Lorca et al. 1993; Jones 2004).

Gasotransmitery

Gasotransmitter je označení pro malou plynnou molekulu zapojenou do signálního procesu. Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý (NO), sirovodík (H_2S) a oxid uhelnatý (CO). Uplatňují se při regulaci buněčných procesů v kardiovaskulárním, nervovém, imunitním a urogenitálním systému (Otasevic & Korac 2016). Gasotransmitery jsou tvořeny v buňce na základě jejich potřeby a jsou volně dostupné přes plazmatickou membránu (Liu et al. 2020). V buňce působí jako druhý buněčný posel, vzájemně spolupracují a jsou ve vteřinách odbourávány (Pae et al. 2009). Pokud koncentrace těchto tří plynů vystoupá nad určitou úroveň, nastává toxický efekt založený na inhibici buněčného dýchání (Abou-Hamdan et al. 2015).

- Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je v buňkách syntetizován za přítomnosti O_2 přeměnou L-argininu na L-citrulin specifickým enzymem NO syntázou (NOS). K proběhnutí reakce je taktéž nutný NADPH. V nepřítomnosti O_2 může NO vznikat pomocí reduktáz, jako jsou hemové globiny, enzymy obsahující molybden a různé složky mitochondriálního elektronového transportního řetězce (Daff 2010; Olson et al. 2012; Shiva 2013). Vyskytuje se ve třech izoformách – NOS1 (nervová nebo nNOS), NOS2 (indukovatelná nebo iNOS) a NOS3 (endoteliální nebo eNOS) (Daff 2010).

Konstitutivní izoformy (nNOS a eNOS) jsou závislé na vápníku a kalmodulinu a produkují malé množství NO po krátkou dobu. Naopak izoforma iNOS tvoří větší množství NO po delší dobu a tato tvorba není závislá na vápníku a kalmodulinu. Buňky obvykle obsahují více než jednu izoformu NOS (Viana et al. 2007).

V prasečích oocytech a kumulárních buňkách se všechny NOS izoformy podílejí na získání meiotické kompetence (Chmelíková et al. 2009).

Oxid dusnatý podporuje vazodilataci krevních cév, uvolňuje hladké svalstvo a často je využíván neurony k signalizaci sousedním buňkám (Alberts 2002). Je také důležitým regulátorem reprodukce, v hypotalamu ovlivňuje uvolňování gonadotropin releasing hormonu (GnRH), který na úrovni hypofýzy aktivuje nNOS a spouští vyplavování gonadotropinů (Rosselli et al. 1994). Podílí se na folikulogenezi, ovulaci a luteolýze (Hattori et al. 2000; El-Sherry et al. 2013). Z buňky, ve které vznikl, snadno prostupuje do ostatních buněk v okolí. Zde většinou cílí na enzym guanylát cyklázu, která reguluje tvorbu cyklických nukleotidů, čímž se NO podílí na meiotickém zrání (Gladwin et al. 2006). Ve vysokých koncentracích vykazuje NO cytotoxický efekt a meiotické zrání inhibuje, zatímco v nízkých koncentracích ho podporuje (Viana et al. 2007).

- Sirovodík

Sirovodík (H_2S) je tvořen endogenně z L-cysteinu pomocí enzymů cystathion beta-syntázy (CBS) a cystathion gama-lyázy (CSE) či 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (Ianaro & Cirino 2016). Všechny tyto tři enzymy byly nalezeny v prasečích oocytech, stejně jako v kumulárních buňkách (Nevoral et al. 2015). Je zapojen do mnoha fyziologických a patologických procesů včetně angiogeneze, vazodilatace a zánětlivé reakce. CBS a CSE byly identifikovány v myometriu a placentě březích samic (You et al. 2017). Podle Nevorala et al. (2015) se sirovodík účastní meiotického zrání, kdy pravděpodobně slouží jako důležitý buněčný posel. Při inhibici enzymů podílejících se na tvorbě H_2S v prasečích oocytech došlo ke snížení aktivity MPF a MAPK a potlačení meiotického zrání. Sirovodík má také svou roli ve zpomalení procesu stárnutí prasečích oocytů a pozitivně ovlivňuje embryonální vývoj (Krejčová et al. 2015). Podle Gelaude et al. (2020) u oocytů obojživelníků přispívá signalizace H_2S ke správnému načasování obnovení meiózy. Nárůst hladin LH před ovulací také pravděpodobně stimuluje tvorbu H_2S , který se následně podílí na průběhu ovulace (Estienne et al. 2019). Naopak podle Yang et al. (2018) expozice H_2S v *in vitro* podmínkách má negativní vliv na meiotické zrání prasečích oocytů, důsledkem může být narušení aktinu, tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) a apoptóza.

- Oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý (CO) vzniká rozpadem hemu za pomoci enzymu hem oxygenázy (Otasevic & Korac 2016). Štěpením hemu se uvolňuje CO, železnatý iont a biliverdin, který dává následně vzniknout bilirubinu (Tenhunen et al. 1968). Stejně jako předchozí plynné molekuly působí vazodilatačně a uplatňuje se v imunitní reakci (Otterbein et al. 2000). CO pravděpodobně stimuluje produkci steroidních hormonů ve vaječnicích (Alexandreaanu & Lawson 2003). Podle Němečka et al. (2017) přispívá CO k udržení životaschopnosti během *in vitro* stárnutí prasečích oocytů, a to prostřednictvím regulace apoptózy.

3.2 Apoptóza a proteiny Bcl-2 rodiny

3.2.1 Apoptóza

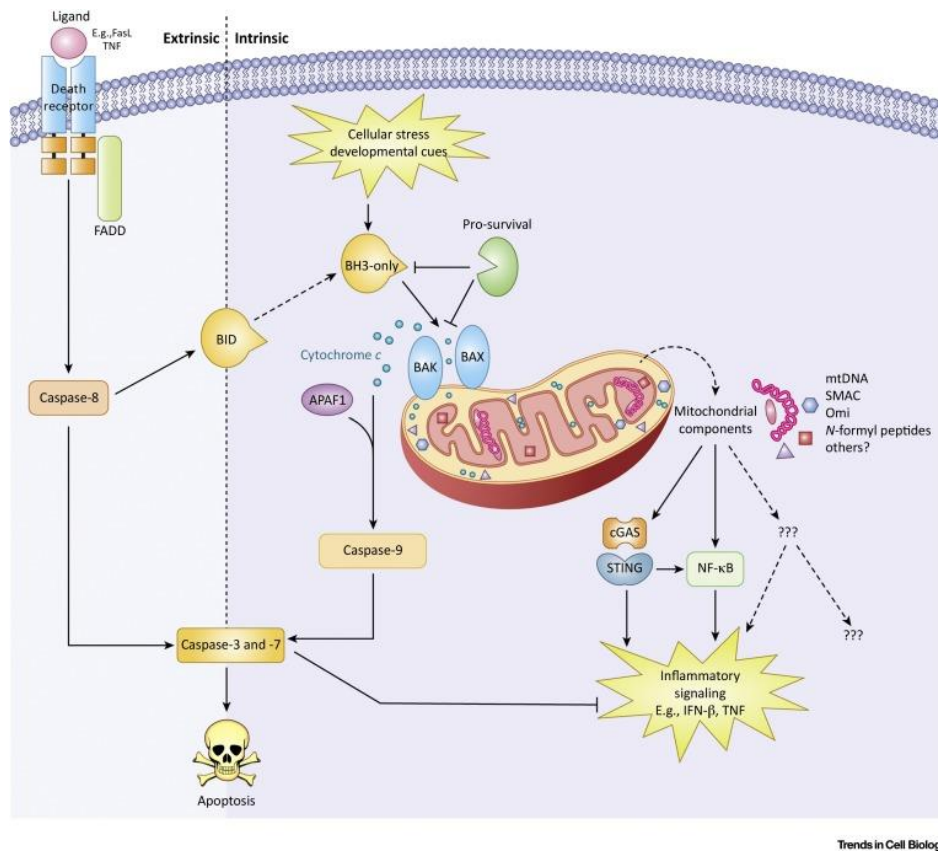
Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je fyziologickým procesem autodestrukce buňky a uplatňuje se jak v řadě procesů embryonálního vývoje, tak v dospělých tkáních, kde působí jako významný mechanismus homeostázy. Pokud je buňka pro organismus nepotřebná či škodlivá (např. při infekci nebo poškození DNA), zahájí svou smrt projevující se smršťováním, kondenzací chromatinu, fragmentací jádra a porušením cytoplazmatické membrány. Buňka se rozpadá na malé fragmenty obklopené membránou – apoptotická tělíska, která jsou fagocytována bez vyvolání zánětlivé reakce (Reed 2000).

Oproti tomu nekróza je vyvolána fyzikálním nebo chemickým poškozením buněk, dochází k otoku buňky a je narušena integrita cytoplazmatické membrány. Obsah buňky se vylévá do okolí, to vyvolá zánětlivou reakci a následnou řetězovou reakci nekrózu ostatních buněk (Gogvadze et al. 2009).

Apoptóza je cíleným procesem, ve kterém je buňka aktivním účastníkem své smrti a vynakládá na ni svou energii, navíc nedochází k poškození okolních buněčných tkání. V prenatalním vývoji je zodpovědná za správný vývoj tkání, například odstraněním nadpočetných buněk při tvorbě prstů nebo tělních dutin. Postnatálně zajišťuje přirozený buněčný obrát v organismu a je prevencí proti šíření poškozených nebo nebezpečných buněk (Jin & El-Deiry 2005; Kumar et al. 2005). Účastní se též zániku buněk endometria při menstruačním cyklu ženy a atrofie mléčné žlázy po přechodu (Vaskivuo et al. 2000). V apoptotickém procesu se uplatňují zejména cysteinové proteázy, tzv. kaspázy (Cysteine ASpartate ProteASEs) štěpící substrátové proteiny na specifickém zbytku aspartátu. Cíle kaspáz zahrnují stovky životně důležitých buněčných proteinů, jako jsou cytoskeletální proteiny, kinázy a transkripční faktory. Po jejich aktivaci je již proces nezvratný (Fischer et al. 2002; Lüthi & Martin 2007).

Apoptóza je proces řízený mnoha geny a do její regulace je zahrnuto spousta molekul s různými funkcemi, v rámci této práce jsou zmíněny jen vybrané. Je zahájena dvěma hlavními způsoby, které vedou k aktivaci kaspáz: vnější cestou stimulací receptorů na cytoplazmatické membráně nebo vnitřní cestou, kde se uplatňují mitochondrie a protein p53. Schéma těchto dvou apoptotických drah je znázorněno na Obrázku 2. Vnější signální dráha je aktivována navázáním ligandu na „receptor smrti“ (Death Receptor) v cytoplazmatické membráně. Dojde k aktivaci cytoplazmatických domén reagujících s adaptorovými proteiny, načež agregují proteiny prokaspáz a vzniká komplex DISC (Death Inducing Signalling Complex). Prokaspázy tohoto komplexu jsou aktivovány dimerizací a jako kaspázové heterotetramery jsou uvolněny do cytoplazmy (Boatright & Salvesen 2003; Jin & El-Deiry 2005). Vnitřní signální dráha může být vyvolána podněty jako je poškození DNA (například radiací), omezení růstových faktorů, hormonů a cytokinů nebo působení toxinů, virů a volných radikálů (Lawen 2003). V reakci na poškození DNA přichází na řadu molekula p53, transkripční faktor schopný iniciovat apoptózu. Za nejvýznamnější událost vnitřní signální dráhy se považuje permeabilizace vnější mitochondriální membrány a následné vylití cytochromu c, který působí jako aktivátor kaspáz (Boatright & Salvesen 2003; Elmore 2007; Wan et al. 2019). Aktivace kaspáz je bodem, kde se vnitřní a vnější dráhy propojují a apoptóza je od této chvíle navozena stejným způsobem.

Proteiny schopné regulovat propustnost mitochondriální membrány pro cytochrom c se nazývají proteiny Bcl-2 rodiny a jsou zásadní pro celý proces vnitřní apoptotické dráhy (Cai et al. 1998).



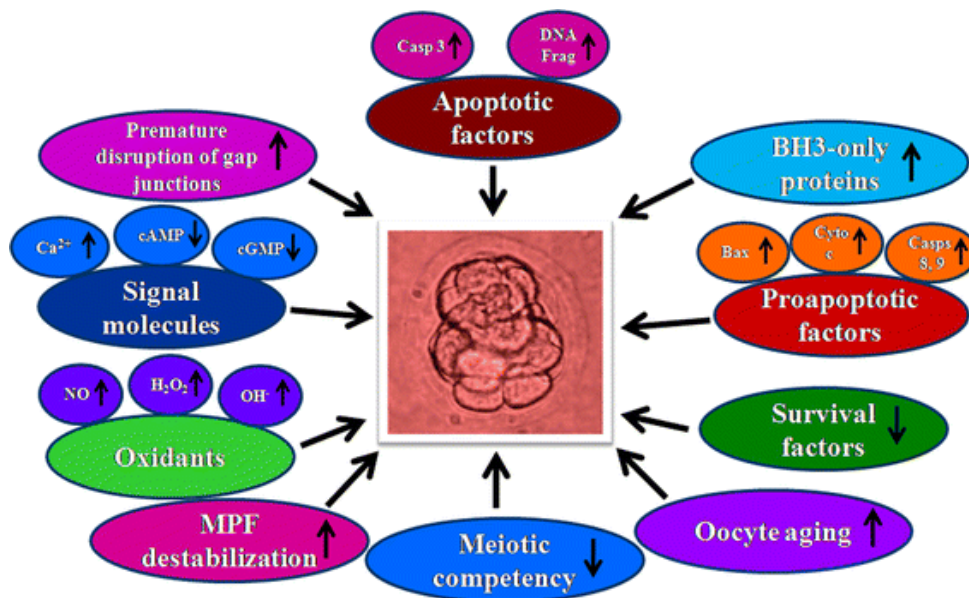
Obrázek 2 Schéma vnější a vnitřní dráhy apoptózy (McArthur & Kile 2018).

Apoptóza je přirozenou součástí zániku oocytů ve vaječníku v průběhu života samice, jakož i zániku ovulovaných oocytů ve stádiu druhé metafáze, poté co ve vejcovodu nedojde k oplození. Doba, kdy je oocyt schopný fertilizace je časově omezená a během ní probíhají funkční změny označované jako stárnutí oocyty, kdy klesá šance na oplození. Dochází například k poklesu MPF, MAPK a CSF a zvyšuje se hladina vápníku. V *in vitro* podmínkách lze navodit stárnutí oocytů metodou prodloužené kultivace (Nevoral 2018). Na apoptóze oocytů se podílejí jak vnitřní, tak vnější dráhy. V oocyty a okolních somatických buňkách folikulu je exprimováno spektrum pro-apoptotických a anti-apoptotických genů, jejichž exprese může být ovlivňována různými vlivy. Právě geny Bcl-2 rodiny jsou pro regulaci apoptózy v oocyty v různých fázích meiotického cyklu klíčové (Tilly et al. 1997).

Jedním z hlavních faktorů indukujících apoptózu oocytů u savců je oxidační stres, jehož zvýšená hladina může ovlivňovat poměr pro-apoptotických a anti-apoptotických faktorů a tím propustnost mitochondriální membrány (Yadav et al. 2018). Jako vedlejší produkt okysličování a látkové výměny vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), dochází k jejich akumulaci a následně v množství přesahujícím fyziologické hodnoty navozují oxidační stres, který může být zakončen apoptotickým procesem. Oxidační stres spouští jak apoptózu zprostředkovanou přes receptory buněčné smrti, tak mitochondriální cestou (Tiwari et al. 2017). U většiny zanikajících zárodečných buněk ve vaječníku je však uplatňována mitochondriální dráha. Oxidační stres je

jedním z hlavních faktorů, který má přímý negativní dopad na kvalitu oocytů a snižuje šanci na oplození. Antioxidanty na druhé straně snižují hladinu ROS a chrání před apoptózou zárodečných buněk zprostředkovanou oxidačním stresem (Prasad et al. 2016).

Za faktory podílející se na zahájení apoptózy se také považují například nízké hladiny cAMP a cGMP a zvýšené množství vápníku, vyčerpání živin a proteinů, předčasné odstranění kumulárních buněk a snížená schopnost dosažení meiotické kompetence oocytu (Tiwari et al. 2015) (viz Obrázek 3).



Obrázek 3 Faktory regulující apoptózu v oocytu (Tiwari et al. 2015).

3.2.2 Proteiny Bcl-2 rodiny

Proteiny Bcl-2 rodiny byly poprvé popsány v B-buňkách maligního lymfomu a jsou klíčovým regulátorem apoptózy (Tsujimoto et al. 1984). Rozdělují se obvykle do tří skupin. Do první skupiny patří anti-apoptotické proteiny, které podporují přežití buňky inhibicí faktorů potřebných pro aktivaci kaspáz rozkládajících buněčnou strukturu. Další dvě skupiny naopak apoptózu navozují a nazývají se proteiny pro-apoptotické. Působení pro-apoptotických proteinů může být blokováno proteiny anti-apoptotickými a vzájemný poměr těchto skupin rozhoduje o dalším osudu buňky (Cai et al. 1998; Adams & Cory 1998; Adams et al. 2019). Všechny skupiny mají ve svých proteinech alespoň jednu ze čtyř strukturálně konzervovaných BH domén (Bcl-2 Homologních Domén):

- Skupina I – anti-apoptotické proteiny: obsahují všechny čtyři domény BH. Zástupci této skupiny jsou proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 a Bcl-B/Bcl2L10.
- Skupina II – pro-apoptotické proteiny: obsahují buď BH1, BH2 a BH3. Zástupci skupiny jsou proteiny Bax, Bak a Bok/Mtd.

- Skupina III – pro-apoptotické proteiny („BH3-only“): obsahují samotnou BH3 doménu. Zástupci jsou proteiny Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk a Bik (Sattler et al. 1997; Thomas et al. 2013).

Anti-apoptotické proteiny mají schopnost zabránit smrti buňky vyvázáním či neutralizací pro-apoptotických proteinů. V jejich struktuře se nachází hydrofobní „kapsička“ tvořená doménami BH1, BH2 a BH3, která váže doménu BH3 pro-apoptotických proteinů, a tak dochází k jejich následné inaktivaci (Schuetz et al. 2012; Thomas et al. 2013). Navázány zde mohou být jak proteiny skupiny II, tak proteiny skupiny III (Kale et al. 2018). Doména BH4 stabilizuje ostatní hydrofobní části tím, že je překrývá a umožňuje další anti-apoptotické působení proteinu. Jedním ze způsobů inaktivace proteinů bránících v apoptóze je posttranslační odstranění koncové BH4 domény způsobené kaspázou, čímž se protein mění na pro-apoptotický (Danial 2007).

Proteiny skupiny II jsou zodpovědné za permeabilizaci vnější mitochondriální membrány tvorbou pórů. Jejich struktura též obsahuje vazebnou kapsičku uplatňující se jako receptor BH3 domén ostatních členů rodiny (Kale et al. 2018).

III. skupina BH3-only proteinů komunikuje s multidoménovými členy Bcl-2 rodiny a tvoří a přenáší apoptotické signály. Fungují jako nezbytní primární spouštěči apoptózy. Navázání těchto molekul na proteiny skupiny I v důsledku zabrání vazbě anti-apoptotických proteinů na pro-apoptotické proteiny skupiny II formující mitochondriální póry, čímž je otevřena cesta k zániku buňky (Kale et al. 2018). Zároveň stimulují aktivitu multidoménových pro-apoptotických proteinů skupiny II (Danial 2007).

Při převaze exprese pro-apoptotických proteinů dochází k jejich oligomerizaci a následnému zabudování do vnější mitochondriální membrány, kde působí na její celistvost tvorbou pórů (Green & Evan 2002). Naopak převaha anti-apoptotických proteinů tvorbě pórů zabraňuje (Orrenius et al. 2007). Po vzniku pórovité struktury dojde k permeabilizaci membrány a následné difúzi rozpustných proteinů (zejména cytochromu c) z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytosolu. Cytochrom c se váže na apoptotický proteázový aktivační faktor-1 (APAF-1) a vzniká kaspázový aktivační komplex nazývaný apoptozóm. Navazuje se na prokaspázu-9 a aktivuje ji oligomerizací. Aktivovaná kaspáza-9 poté aktivuje výkonnou kaspázu-3 a kaspázu-7, které již štěpí buněčné substráty, aby vyvolaly apoptózu (Riedl & Salvesen 2007). Permeabilizace vnější mitochondriální membrány se objevuje v různých dlouhých prodlevách po navození pro-apoptotického stresu a podle studií je tato prodleva závislá na koncentracích různých buněčných proteinů (Spencer et al. 2009). Aktivace kaspáz a apoptóza se po permeabilizaci membrány vyskytuje často do několika minut (Chipuk et al. 2010).

3.2.2.1 Bcl-2

Anti-apoptotický protein Bcl-2 o velikosti 26 kDa je lokalizován v mitochondriálních membránách, ER a perinukleární membráně. Navazuje pro-apoptotické proteiny a inhibuje jejich funkci, čímž se podílí na udržování homeostázy a vyvážení rovnováhy apoptotických skupin proteinů v buňce. Myši s knockoutovaným genem pro Bcl-2 vykazovaly apoptózu lymfocytů, ledvinových buněk a melanocytů (Jin & El-Deiry 2005; Hardwick & Soane 2013).

Skládá se z osmi α -helixů – dvou centrálních, převážně hydrofobních, které jsou obklopeny sedmi amfipatickými α -helixy. Stejně jako ostatní proteiny skupiny I tvoří na svém povrchu hydrofobní kapsu.

Zástupci anti-apoptotických proteinů se liší primární sekvencí proteinů, která může například ovlivňovat vlastnosti vazebné kapsy. Jedním z důsledků pozměněné sekvence je také změna elektrostatického charakteru. Vazba pro-apoptotických proteinů na Bcl-2 je tak oproti vazbě na Bcl-xL asi desetkrát slabší (Petros et al. 2004).

Bcl-2 se vyskytuje ve dvou izoformách, a to Bcl-2 α a Bcl-2 β , které mají podobnou strukturu. Pravděpodobně se však liší v anti-apoptotické aktivitě a ve schopnosti vázat pro-apoptotické proteiny (Petros et al. 2001; Warren et al. 2019). Exprese proteinu Bcl-2 byla hojně pozorována v buněčných populacích s dlouhou životností nebo proliferační schopností, jako jsou buňky ductů exokrinních žláz, bazální keratinocyty, buňky tračníku a neurony. Vyskytuje se také v cyklicky obnovujících se tkáních (endometrium) a plní významnou funkci ve vývoji, zrání a diferenciaci buněk (Lu et al. 1993).

Cílená exprese genu Bcl-2 v oocytech transgenních myší podporovala rezistenci proti přirozené i chemoterapií navozené apoptóze. Spontánní apoptóza oocytů vyskytující se *in vitro* může být výrazně oddálena cílenou expresí Bcl-2 (Morita et al. 1999).

3.2.2.2 Bax

Pro-apoptotický protein Bax (Bcl-2 Associated X protein) je tvořen z devíti α -helixů, z čehož dva centrální jsou hydrofobní a sedm obklopujících je amfipatických s hydrofilní částí vystavenou na povrch (Petros et al. 2004; Liu et al. 2016). Ve své plné velikosti má 21 kDa, skládá se z 192 aminokyselin a vyskytuje se v několika izoformách (Haferkamp et al. 2012; Park et al. 2017). Tento tumorový supresor byl poprvé identifikován jako heterodimer s Bcl-2 v roce 1993. Přítomnost Bax byla u myší prokázána také v apoptotických radiosenzitivních tkáních, které byly vystaveny γ -záření (Kitada et al. 1996; Bouvard 2000; Liu et al. 2016).

V inaktivní formě zaujímá globulární tvar, přičemž C-konec α -helixu 9 je zanořen do jádra proteinu v místě hydrofobní kapsy tvořené BH1, BH2 a BH3 doménami (Danial 2007). V takovém stavu se vyskytuje v cytoplazmě a zabraňuje tím vazbě na mitochondriální membránu. Vazbou α -helixu 9 do kapsy proteinu jsou zakryty všechny zbylé hydrofobní části, což je důležité pro zvýšení rozpustnosti proteinu a jeho lokalizaci v cytoplazmě. Část Bax proteinů se však může vyskytovat v mitochondriích i bez pro-apoptotického podnětu (Petros et al. 2004).

Aktivační BH3-only protein se po spuštění apoptotického stimulu váže do míst hydrofobní kapsy a nahrazuje tím α -helix 9, který se následně může zanořit do vnější mitochondriální membrány. Kromě C-terminálního konce se Bax do membrány zanořuje částečně ještě helixy 5 a 6 (Kale et al. 2018). Dle Cartron et al. (2003) je transport směrem k mitochondrii zprostředkován N-koncem α -helixu 1. Zde Bax homooligomerizuje s molekulami již přítomnými, například s proteiny Bak a ostatními Bax, což následně vede ke vzniku póru a permeabilizaci membrány. Jestli Bax protein vytváří póry nové anebo jen ovlivňuje a otevírá již existující, není zcela jasné (Kuwana et al. 2005).

Docházet může také ke spontánní aktivaci Bax následkem jakéhokoli narušení kompaktní globulární struktury, které vede k vystavení hydrofobního jádra proteinu. Buňky

s blokovanými geny pro BH3-only proteiny, u kterých byl taktéž geneticky či farmakologicky inhibován anti-apoptotický Bcl-2 protein, podstupovaly *in vitro* apoptózu způsobem závislým na Bax a Bak proteinech. To naznačuje, že BH3-only proteiny nejsou pro aktivaci Bax a Bak nezbytně nutné. Kultivované buňky často vykazují abnormální strukturu a v důsledku vysokých hladin kyslíku odolávají stresovým podmínkám, což má za následek spontánní aktivaci Bax (Kale et al. 2018).

Schopnost proteinů Bcl-2 rodiny vzájemně interagovat v protichůdné regulaci apoptózy je někdy nazývána „Bcl-2/Bax reostat“, kdy poměr Bcl-2 a Bax rozhoduje o zániku nebo přežití buňky (Edlich 2018).

Ve vaječnicích je Bax pravděpodobně hlavním proteinem apoptózy mající vliv na zánik velkého množství oocytů i granulóznic buněk (Tilly et al. 1997). Zvýšená exprese pro-apoptotického proteinu Bax pozitivně koreluje s apoptózou v krysích (Tilly et al. 1995) a lidských (Kugu et al. 1998) granulóznic buňkách a v luteálních buňkách skotu (Rueda et al. 1997) a králíka (Dharmarajan et al. 1999). Navíc myši s cíleným narušením genu Bax vykazují řadu abnormalit vaječníku, jako například nadbytek primordiálních folikulů vedoucí k výraznému prodloužení životnosti tohoto orgánu (Perez et al. 1999).

3.3 3D kultivační systémy

Proces kultivace je nezbytnou součástí studia buněčné morfologie, diferenciaci, interakce a buněčných pochodů. Kultivaci buněk *in vitro* lze zajistit ve dvou prostředích, které jsou charakterizované jejich prostorovým uspořádáním. Ve 20. století se začal k tomuto účelu využívat dvourozměrný kultivační systém (2D), který se uplatňuje dodnes. Přestože jsou 2D kultury kvalitním systémem pro buněčnou kultivaci, v poslední době nabývá na oblíbenosti trojrozměrný kultivační systém (3D), který lépe odráží přirozené prostředí buňky. Tento způsob buněčné kultivace mimo jiné nachází své uplatnění ve výzkumu léčiv, nádorových onemocnění, kmenových buněk či tkání navržených pro implantaci a poskytuje přesnější odraz chování buněk *in vivo* (Edmondson et al. 2014).

3.3.1 Rozdíly ve 2D a 3D kultivaci

Kultivace ve 2D prostředí je planární metoda spočívající v umístění buněk na plochém povrchu, která však nereflektuje anatomii a fyziologii studované tkáně a podmínky tohoto prostředí se mohou zcela lišit od prostředí fyziologického (Haycock 2011; Bhattacharya et al. 2012). Výhodou těchto systémů představuje jednoduchá proveditelnost, nízká ekonomická nákladnost a rychlá proliferace buněk. Výsledkem narušení přirozené struktury buněk však mohou být matoucí a zkreslená data experimentů (Edmondson et al. 2014).

Pro správnou funkci buněk v tkáních hraje klíčovou roli extracelulární matrix (ECM), kterou jsou buňky v organismu obklopeny (Dutta & Dutta 2009; Bowers et al. 2010). Zde buňky komunikují nejen mezi sebou, ale také s touto ECM, která obsahuje proteiny propůjčující jim jejich morfologické vlastnosti (Abbott 2003). ECM je tvořena z glykosaminoglykanů a vláknitých proteinů, jako je kolagen, elastin, laminin, fibronectin, které se sestavují do

nanofibrilární sítě (Fernandes et al. 2009). Tato síť poskytuje buňkám oporu a umožňuje přenos signálů pro řízení buňky (Bhattacharya et al. 2012).

Trojrozměrné systémy (3D) se snaží takové prostředí napodobit a předejít tak komplikacím, se kterými se potýká kultivace ve 2D systémech (Osaki et al. 2018). Bylo zjištěno, že buňky ve 3D kultivačním prostředí se od buněk kultivovaných ve 2D prostředí prokazatelně liší svou morfologií i fyziologií (Baharvand et al. 2006).

V klasické 2D kultuře buňky přilnou k povrchu nádoby, kde po dobu kultivace rostou a vyvíjejí se. V porovnání s buňkami ze 3D prostředí bývají obvykle více ploché a natažené. Tato abnormální morfologie ovlivňuje mnoho buněčných procesů včetně proliferace, diferenciaci, signalizace, apoptózy a exprese genů a proteinů (Tibbit & Anseth 2009). Kultivované buňky z 2D prostředí se tedy nemusí chovat tak, jak by se chovaly v těle organismu (Huh et al. 2011).

Třetí dimenze je klíčový faktor, který ovlivňuje prostorovou organizaci receptorů buňky zapojených do interakcí s okolním prostředím, ale také tvar a strukturu buňky. Tyto aspekty ve 3D kulturách zabezpečují přenos signálu z vnějšku dovnitř buněk a v konečném důsledku přispívají k přirozené genové expresi a buněčným pochodům (Edmondson et al. 2014). Při 3D kultivaci se buňky shlukují do agregátů zvané sféroidy a to pomocí vazeb mezi integriny na povrchu buněk a ECM (Jensen & Teng 2020). Následně vytváří buňky silné kadherinové vazby mezi sebou a formují se do sférického tvaru (Lin & Chang 2008). Interakce buněk a biomateriálů je zprostředkována transmembránovými receptory rozeznávající adhezni molekuly na povrchu materiálů (Hynes 1992).

Technologie 3D kultivace umožňují přizpůsobení kultivačního prostředí pomocí optimálních fyzikálních parametrů, zatímco 2D prostředí lze regulovat pouze přidáním podporujících látek do kultivačního média, jako jsou růstové faktory či hormony (Filatov et al. 2015).

I přes veškeré výhody mají 3D kultivační systémy svá omezení. Oproti 2D systémům jsou náročnější na provedení, je zapotřebí zvážit složení ECM a napodobit biochemické prostředí buněk spolu s optimálním tlakem. Nevýhodou je také vyšší cena a těžší reprodukovatelnost experimentů (Osaki et al. 2018).

3.3.2 Typy 3D modelů

Pro vytváření 3D kultivačních modelů bylo vyvinuto několik metodických postupů. Žádná technologie není univerzální pro všechny buňky, a tak musí být vybrána metoda nejvíce vyhovující pro potřeby experimentu. Přístupy realizace lze obecně rozdělit na systémy bez nosiče nebo s nosiči, přičemž tato podpůrná „lešení“ (scaffold) jsou vyrobena z přírodních nebo syntetických materiálů (Knight & Przyborski 2014), které buňkám poskytují mechanickou podporu a hydratovaný prostor (Rowley et al. 1999). Ideální matrix by měla napodobovat ultrastrukturu nativní ECM, podporovat růst a funkci buněk a poskytovat prostředí pro přenos živin, odpadních metabolitů a mezibuněčnou signalizaci. Měla by tedy vytvořit buňce co nejpřirozenější prostředí, které povede k pochodům identickým s nativním stavem konkrétního typu buňky (Bhattacharya et al. 2012).

- Metoda visuté kapky

Příkladem metody bez nosiče může být relativně jednoduchá metoda visuté kapky, která spočívá v kultivaci buněk v kapce média. Kapky buněčné suspenze se aplikují na víko Petriho misky, které se opatrně převrátí a umístí se na spodní část misky obsahující kapalinu, která vytváří vlhkou atmosféru uvnitř misky zabraňující rychlému vysychání kapky. Následkem gravitace nemohou buňky přilnout k povrchu, shlukují se na spodu kapičky a vytváří kompaktní 3D sféroid (Knight & Przyborski 2014).

Podle Banerjee & Bhonde (2006) tato metoda přispívá k dlouhodobému přežití buněk, zachování jejich fenotypu a ve srovnání se standardními 2D systémy umožňuje homogennější diferenciaci (De Smedt et al. 2008). Omezením může být obtížná difúze živin a plynů a nutnost časté výměny média. Hypoxické podmínky však mohou být výhodné u 3D modelů využívaných pro modelování vývoje a progresu nádorů (Knight & Przyborski 2014).

- Metoda pevného nosiče

Metoda spočívá v umístění buněk do pevného nosiče, který poskytuje prostor a podporuje vytváření přirozené 3D tkáňové struktury tím, že se na něj buňky mohou zavěsit. Výhodou technologií založených na pevných nosičích je organizované uspořádání buněk; lze je snadno umístit do porézní struktury předem připraveného pevného nosiče podle jednoduchých protokolů. Komerčně dostupné syntetické pevné nosiče neobsahují živočišné složky, jsou sterilní a připravené k okamžitému použití. Například vývoj konstruktů syntetické kůže je klasickým příkladem použití technologie pevného nosiče k vytvoření vrstvené struktury dermálních a epidermálních složek (Knight & Przyborski 2014).

Syntetické pevné nosiče jsou obvykle složeny z polymerů vyrobených z polyethylenglykolu (PEG), kyseliny polymléčné (PLA) nebo polyvinylacetátu (PVA) (Dhaliwal 2012). Oproti přírodním hydrogelům jsou biologicky inertní a vysoce pevné. Jejich vlastnosti lze upravit pomocí vnějších podnětů, jako je změna pH, teploty, světla nebo elektrického pole, což usnadňuje řízené uvolňování biologických faktorů (cytokinů, chemokinů, růstových nebo angiogenních faktorů) (Nath & Devi 2016).

- Metoda kultivace v hydrogelu

Jedním z nejvyužívanějších nosičů pro 3D kultivační systémy jsou látky na bázi hydrogelu. Hydrogely jsou hydrofilní polymery schopné zadržet velké množství vody, podobně jako měkké tkáně, přičemž zůstávají strukturálně stabilní. Vázaná voda uvnitř polymerní sítě podporuje propustnost a difúzi živin a molekul (Zhu & Marchant 2011). Hydrogely jsou jedinečné ve své schopnosti napodobit ECM, jsou přizpůsobitelné a lze je aplikovat na různé typy experimentů (Langhans 2018). Jejich vlastnosti lze upravit požadovanými chemickými látkami nebo strukturálně, aby korelovaly s přirozenou okolní buněčnou ECM (Barker 2011; Osaki et al. 2018). Běžně se vyrábějí z přírodních polymerů, jako je fibrinogen, kyselina hyaluronová, kolagen, želatina, chitosan, alginát a celulóza (Dhaliwal 2012; Filatov et al. 2015).

Hydrogely mohou obsahovat endogenní chemokiny a růstové faktory, které přispívají k životaschopnosti a podpoře růstu buněk. Rozdílné vlastnosti hydrogelů však mohou mít vliv na variabilitu výsledků, a tudíž ztěžují reprodukovatelnost experimentů. Vyznačují se malou pevností, což zvyšuje riziko jejich poškození při manipulaci (Nath & Devi 2016). Některé hydrogely díky vysokému obsahu tekutiny neposkytují dostatečnou mechanickou oporu a pro zvýšení hustoty musí být přebytečná tekutina odstraněna vložení absorbéru. Zvýšená tuhost hydrogelu snižuje difúzi kyslíku a dochází k formování hypoxického jádra podobně jako v *in vivo* prostředí (Mohammad-Hadi et al. 2018).

Algináty jsou jedním z nejčastěji využívaných materiálů pro výrobu hydrogelů. Poskytují buňkám imunitní bariéru a osvědčily se jako hydrogely poskytující funkční prostředí pro metabolickou výměnu látek (Laurén et al. 2017). Jsou to polysacharidy získané z buněčných stěn hnědých řas a skládají se z monomerů kyseliny β -D-mannuronové (jednotky M) a kyseliny α -L-guluronové (jednotky G), jejichž poměr se liší v závislosti na zdroji materiálu. Dvojmocné kationty (Ca^{2+}) se vážou mezi G-jednotky sousedních alginátových řetězců a vytvářejí iontové vazby, které způsobují gelovatění alginátu (Rowley et al. 1999).

Celulózní hydrogely lze připravit fyzikálním zesíťováním (cross-linking), tedy spojením polymerních řetězců celulózy. Nanofibrilární vlákna celulózy vykazují podobnost s vlákny kolagenními a vyznačují se svou netoxičností, biokompatibilitou a schopností zadržet velké množství vody (Laurén et al. 2017). Celulóza tvoří množství hydroxylových skupin, které se spojují do sítě vodíkovou vazbou, v důsledku této struktury je však velmi těžko rozpustná v běžných rozpouštědlech a pro její využití v hydrogelu se často využívá vhodných rozpouštědel, jako je například N-metylmorfolin-N-oxid (NMMO) a iontová kapalina. Při výrobě celulózových hydrogelů jsou také zpracovávány rozpustné deriváty celulózy (metylcelulóza či hydroxypropylcelulóza) a roztoky celulózy s jinými polymery jako je chitin či škrob, či s anorganickými látkami (Chang & Zhang 2011).

3.3.3 GrowDex®

GrowDex je hydrogel vyrobený z nanofibrilární celulózy získané z březového dřeva, je čistě rostlinného původu, sterilní a neobsahuje žádné živočišné příměsi. Podporuje 3D kultivaci různých typů buněk a umožňuje adekvátní difúzi živin a plynů (Paasonen & Aatsinki 2020). Produkt je připravený k okamžitému použití a lze jej ihned mísit s buňkami a kultivačními médii. Malé molekuly v něm mohou snadno difundovat gelem k buňkám (Sheard 2020).

Na rozdíl od mnoha jiných hydrogelů je GrowDex teplotně stabilní a nevyžaduje polymeraci, což umožňuje manipulaci při pokojové teplotě, usnadňuje práci s produktem a získání reprodukovatelných výsledků (Söderholm et al. 2021). Jeho obsahové složky jsou přesně stanoveny a může být upravován přidáním různých faktorů v médiu (Mimler 2019).

GrowDex je vysoce viskózní a může být ředěn například buněčným médiem. Při úpravě koncentrace pod 1,6 % může být dávkován pipetováním, přičemž si udržuje schopnost retence vody. Hydrogel snáší změny teploty i pH a své vlastnosti si zachovává v rozmezí pH 6–8. Není doporučeno přidávat média s obsahem vápníku a hořčíku, protože mohou poškodit celulózová vlákna. GrowDex není autofluorescenční, buňky proto mohou být jednoduše barveny a

pozorovány. Přesto lze před vizualizací buněk GrowDex enzymaticky rozložit přidáním enzymu celulózy, který je obsažen v přípravku GrowDase (Paukkonen 2018).

GrowDase je čistá směs celuláz specificky připravených ke štěpení nanofibrilárních vláken hydrogelu GrowDex na rozpustnou glukózu. Jednoduchý enzymatický proces umožňuje šetrné vyjmutí buněk z okolní matrix bez nežádoucích účinků a poškození 3D struktury sféroidu. Aplikace spočívá ve smíchání roztoku GrowDase a hydrogelu s buňkami. Směs se inkubuje při 37 °C a následně lze buňky z kapaliny vyjmout (GrowDex Application Note 4).

3.3.4 Kultivace COCs ve 3D kultivačním systému

Zrání oocytů *in vivo* do značné míry závisí kromě hormonů a dalších regulačních faktorů na vlastnostech okolní ovariální tkáně. Všechny tyto podmínky je třeba zajistit pro úspěšnou kultivaci *in vitro* (Filatov et al. 2015). Kumulo-oocytární komplex je mnohobuněčná struktura a komunikace mezi těmito buňkami je nezbytná pro proces oogeneze včetně obnovení meiózy a ovulace (Salustri et al. 2019). Pro kultivaci COCs, folikulů a embryí jsou často využívány alginátové hydrogely, které poskytují kvalitní podmínky pro meiotické zrání a embryonální vývoj. Taktéž genová exprese vykazuje nejvyšší podobnost s *in vivo* prostředím (Sargus-Patino et al. 2014; Zhao et al. 2015). Dodnes se také hojně využívají 2D systémy, ve kterých však dochází k přilnutí kumulu ke kultivačnímu povrchu Petriho misky či kultivační jamky. Kumulární buňky se rozpadají a migrují pryč od oocytů nebo se shlukují na dně jamky, což narušuje přirozenou trojrozměrnou strukturu COCs a procesy potřebné pro výměnu metabolických prekurzorů (Eppig et al. 2005; Sugiura et al. 2005). Narušení normálních interakcí mezi oocyty a kumulárními buňkami během posledních hodin zrání oocytů může znemožnit vytvoření plné vývojové kompetence (Albertini et al. 2001). Právě migrací kumulárních buněk ke dnu kultivační plochy ve dvourozměrném prostředí dochází ke zničení gap junctions, čímž je narušena komunikace mezi oocytem a kumulárními buňkami (Desai et al. 2010). Při identifikaci proteinů buněčných spojů (N-kadherin, E-kadherin) byly ve 3D kulturách COCs nalezeny vyšší hladiny v porovnání s 2D kulturami, tudíž 3D prostředí podporuje přirozené spojení a komunikaci buněk. Pro-apoptotické proteiny jako Bax a kaspáza 3 byly detekovány v kumulárních buňkách buvola kultivovaných ve 3D systému v menším množství než v kontrolní skupině kumulárních buněk kultivovaných ve 2D systému. Naopak anti-apoptotické proteiny včetně proteinu Bcl-2 se vyskytují ve zvýšeném množství. V souladu s tímto zjištěním byla v těchto buňkách rychlost apoptózy nižší (Shen et al. 2020). U myších COCs kultivovaných v alginátovém hydrogelu byl prokázán příznivý vliv na proliferaci a meiotické zrání (Pangas et al. 2003), podobně jako u lidských oocytů (Combelles et al. 2005) a oocytů kočky domácí (Colombo et al. 2019).

U prasečích COCs kultivovaných ve 3D agarózovém gelu společně s granulózními buňkami podporujícími zrání docházelo k lepšímu dosažení vývojové kompetence oocytu a pro-apoptotické faktory včetně proteinu Bax se v oocytech vyskytovaly v menší míře (Park et al. 2021). Podle dostupných informací nebyly do dnešní doby nikdy kultivovány COCs prasete v hydrogelu GrowDex.

4 Metodika

4.1 Odběr vaječníků a izolace oocytů

Vaječníky byly získány z porážených prasnic v nespecifikovaném stádiu říjového cyklu a transport z jatek do laboratoře probíhal v termolahvích s fyziologickým roztokem při teplotě 39°C. Aspirace oocytů byla prováděna pomocí injekční stříkačky s jehlou 20G. Získaná folikulární tekutina obsahující komplexy oocytů s kumulárními buňkami byla přelita do Petriho misky. Pod stereomikroskopem byly pomocí skleněné tenkostěnné kapiláry vybrány oocyty s ukončeným růstem, kompaktní vrstvou kumulárních buněk a celistvou nepoškozenou cytoplazmou. Komplexy oocytů s kumulárními buňkami byly pomocí skleněné tenkostěnné kapiláry přeneseny do kapek modifikovaného kultivačního média M199 (Sigma – Aldrich, Německo). Médium bylo obohaceno o látky uvedené v Tabulce 1, všechny byly zakoupeny v Sigma – Aldrich, Německo.

Tabulka 1 Složení modifikovaného média M199

Chemikálie	Množství ve 100 ml média M199
Laktát sodný	60 mg
Pyruvát sodný	25 mg
HEPES	150 mg
Gentamicin	2,5 mg
Bovinní sérový albumin	10 mg

4.2 Kultivace COCs

Kumulo-oocytární komplexy prasete (COCs) byly kultivovány v Petriho miskách při teplotě 39°C v prostředí 5% CO₂ se vzduchem. V kontrolní skupině bylo 20 COCs kultivováno v modifikovaném médiu M199 o výše uvedeném složení s přidavkem hormonů PG600 (Intervet s.r.o, USA), který je směsí hormonů LH a FSH. Experimentální skupina o stejném počtu COCs byla kultivována ve směsi modifikovaného média M199 obohaceného o PG600 a hydrogelu GrowDex (0,5% nebo 1%). COCs byly kultivovány do stádia druhé meiotické metafáze (48 hodin kultivace *in vitro*). Následně byly COCs zbaveny kumulárních buněk, z kultury byly odstraněny oocyty a kumulární buňky byly *in vitro* kultivovány v médiu s GrowDex hydrogelem, bez přidavku PG600, v kontrolní skupině bez hydrogelu. Prodloužená kultivace oocytů obklopujících buněk probíhala po dobu 2, 4, 7 a 16 dnů. Po dané době kultivace byly z kumulárních buněk připraveny vzorky pro stanovení markerů apoptózy metodou Western blot.

4.3 Stanovení exprese proteinů Bcl-2 a Bax metodou Western Blot

4.3.1 Příprava vzorků

COCs kultivované do stádia MII byly pomocí tenkostěnné skleněné pipety zbaveny kumulárních buněk a ze vzorku byly odstraněny oocyty. Tyto kumulární buňky a kumulární buňky z prodloužené kultivace (2, 4, 7 a 16 dní) byly odděleně ve skupinách promyty v PBS pufru (Sigma – Aldrich, Německo) a následně byly lyzovány v mikrozkumavkách s lyzačním pufrům (0,15 ml 10% Triton X, 0,05 ml 10% SDS, 4,3 ml PBS, 0,5 ml 10% inhibitor proteáz v PBS). Poté byly vzorky ponechány 10 minut k inkubaci na ledu a následně byly precipitovány v 5 μ l 100% kyseliny trichloroctové a dalších 10 minut inkubovány na ledu. Vzorky byly centrifugovány při teplotě 4°C 5 minut při 10 000 g. Následně byl odsát supernatant a kumulární buňky byly promyty v 50 μ l acetonu s HCl. Poté proběhla další centrifugace a odsátí supernatantu s následným promytím v 50 μ l acetonu a vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě -20°C až do doby Western blot analýzy.

4.3.2 Elektroforetická separace proteinů

K provedení elektroforézy byla využita metoda SDS-PAGE, která probíhá v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). SDS-PAGE slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku proteinů v denaturujícím a redukujícím pufru dochází k denuraci proteinů včetně odstranění disulfidových můstků a jejich obalení molekulami SDS, který udělí proteinům celkový záporný náboj.

Vzhledem k malé molekulové hmotnosti proteinů Bcl-2 (26 kDa) a Bax (21 kDa) byl pro SDS-PAGE zvolen separační gel o hustotě 12 % (složení v Tabulce 2). Ten byl následně nalit do připravených vyčištěných skel v aparatuře a převrstven destilovanou vodou, aby nedocházelo k odparu. Po ztuhnutí separačního gelu byla vylita destilovaná voda a zbytek volného prostoru mezi sklíčky byl doplněn 4% zaostřovacím gelem, jehož složení je uvedeno v Tabulce 3. Aby bylo lépe rozeznáno místo nanášky vzorků, byla do zaostřovacího roztoku přidána kapka bromfenolové modři, která gel zbarvila. Za účelem vytvoření jamek pro nanesení vzorků byl do zaostřovacího gelu vložen hřebínek o 15 jamkách tak, aby se v gelu nevytvořily vzduchové bubliny. Sklíčka s gelem byla umístěna do nástavce a vložena do elektroforezní aparatury (Bio-Rad, USA). Zalita byla elektroforetickým pufrům (složení v Tabulce 4) tak, aby hladina pufru dosahovala až po horní hranu sklíček a po vyjmutí hřebínku pufr zatekl i do jamek. Do nich byly pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky nanášeny jednotlivé vzorky kumulárních buněk z obou kultivačních prostředí (2D a 3D) ve stádiu MII a po kultivaci 2, 4, 7 a 16 dnů (14 μ l na jamku) a hmotnostní marker (Prestained Molecular Weight Bovine Standard, Bio-Rad, Kanada, 161-0318) (3 μ l). Elektroforetický pufr byl dolit do aparatury na požadovanou hladinu a elektroforéza byla spuštěna na 1 hodinu a 20 minut, nejprve při napětí 80 V a po 20 minutách bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Tabulka 2 Složení 12% separačního gelu

pufř B (ml)	2,5
roztok A (ml)	4
destilovaná H ₂ O (ml)	3,5
10% SDS (μl)	100
TEMED (μl)	4,5
10% APS (μl)	70

Tabulka 3 Složení 4% zaostřovacího gelu

destilovaná H ₂ O (ml)	1,52
pufř C (ml)	0,625
roztok A (ml)	0,325
10% SDS (ml)	0,025
TEMED (μl)	3,8
10% APS (μl)	50

Tabulka 4 Složení elektroforetického pufřu

Tris	3 g
glycin	14,4 g
10% SDS	10 ml
destilovaná H ₂ O	doplnit do 1000 ml

4.3.3 Western Blot

Proteiny separované elektroforetickou metodou SDS-PAGE byly přeneseny na polyvinylidendifluoridovou membránu (PVDF) působením elektrického proudu.

Nejprve byla v misce s blotovacím pufřem připravena kazeta, na jejíž černou stranu byla umístěna nejprve houbička, dva filtrační papíry, poté gel, PVDF membrána, další dva filtrační papíry a houbička. Všechny komponenty byly před skládáním po dobu 15 minut ponořeny do blotovacího pufřu (složení v Tabulce 5). Membrána byla aktivována v metanolu po dobu 30 sekund a manipulace s ní byla prováděna pinzetou, aby nedošlo k jejímu znečištění a byla dodržena bezpečnost práce s jedovatými látkami. Převálcováním prázdné zkumavky po celém povrchu vrchní houbičky byly opatrně odstraněny vzduchové bubliny tak, aby nedošlo k posunutí membrány. Připravená kazeta byla vložena do blotovacího rámu a následně do aparatury, kde došlo k zalití blotovacím pufřem a překrytí víkem. Celá aparatura byla umístěna do větší nádoby s ledem. Elektrický proud na zdroji byl nastaven na 0,5 A a zdroj byl spuštěn na dobu 1 hodiny a 20 minut. Po uplynutí této doby byla membrána vyjmuta z kazety a propláchnuta v destilované vodě. Následně bylo kontrolováno přetištění na membránu obarvením červení Ponceau, která byla opět odmyta destilovanou vodou a PBS. Blokování volných míst na membráně probíhalo přes noc v lednici a k tomuto účelu byla využita inkubace membrány s 5% roztokem sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Nonfat Dry Milk, Bio-Rad, USA) v PBS.

Tabulka 5 Složení blotovacího pufru

Tris	3 g
glycin	14, 4 g
10% SDS	1 ml
metanol	100 ml
destilovaná H ₂ O	doplňit do 1000 ml

4.4 Statistická analýza

Všechny experimenty byly minimálně třikrát opakovány. Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Statistica verze 12 analýzou rozptylu jednoduchého třídění (One-Way ANOVA). Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p \leq 0,05$.

4.5 Uspořádání experimentů

4.5.1 Experiment 1: Hodnocení jaderného zrání COCs ve 2D a 3D kultivačním prostředí

Cílem experimentu bylo ověřit jaderné zrání prasečích oocytů ve 3D kultivačním systému využívajícím hydrogel GrowDex. Kumulo-oocytární komplexy prasete (COCs) obsahující oocyty s ukončeným růstem (120 μm) a plnou meiotickou kompetencí byly 48 hodin *in vitro* kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem hydrogelu GrowDex v různé koncentraci (0,5 x 1%). Kontrolní skupina COCs byla kultivována ve standardním 2D kultivačním systému s médiem M199 bez přidavku hydrogelu.

Po 48 hodinách kultivace *in vitro* byly oocyty zbaveny opakovaným pipetováním skrz skleněnou tenkostěnnou pipetu kumulárních buněk, montovány na skla a proběhla jejich fixace ve skleněné kyvetě pomocí směsi etanolu a octové kyseliny v poměru 3:1 (v/v), a to po dobu minimálně 24 hod. Následně byly oocyty barveny 1% orceinem a bylo hodnoceno stádium jaderného zrání dle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1986).

Oocyty vyznačující se kompaktní jadernou membránou byly hodnoceny jako oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV). Pokud se v oocytu vyskytoval typický shluk chromatinu, byly oocyty definovány jako ve stádiu pozdní diakineze (LD). Oocyty, které se vyznačovaly výskytem metafázního vřetene, byly ohodnoceny jako oocyty ve stádiu první meiotické metafáze (MI), pokud bylo v oocytu nalezeno metafázní vřeteno a pólové tělísko, byly samičí pohlavní buňky označeny jako oocyty ve stádiu druhé meiotické metafáze (MII). Ostatní oocyty vykazující netypické uspořádání chromozómů byly hodnoceny jako atypické (atyp.).

V každé skupině bylo hodnoceno minimálně 50 oocytů, experiment byl 4x opakován.

4.5.2 Experiment 2: Detekce proteinů Bcl-2 a Bax kumulárních buňkách prasete metodou Western blot

Cílem experimentu bylo detekovat apoptotické proteiny Bcl-2 a Bax v kultivovaných kumulárních buňkách prasete ve 2D a 3D prostředí (1,0 % GrowDex) pomocí elektroforetické separace proteinů v polyakrylamidovém gelu spolu s dodecylsulfátem sodným. Proteiny poté byly přetištěny na PVDF membránu a inkubovány s protilátkou.

Odděleně byly analyzovány vzorky kumulárních buněk získaných z oocytů ve stádiu druhé meiotické metafáze a po kultivaci 2, 4, 7 a 16 dní ve standardním a 3D kultivačním systému s přídatkem 1,0% GrowDex.

5 Výsledky

5.1 Hodnocení jaderného zrání COCs ve 2D a 3D kultivačním prostředí

Komplexy oocytů s kumulárními buňkami (COCs) byly *in vitro* kultivovány ve standardním kultivačním prostředí v médiu M199 a ve 3D kultivačním prostředí využívajícím hydrogel GrowDex v různé koncentraci do stádia druhé meiotické metafáze po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby kultivace bylo hodnoceno stádium jaderného zrání oocytů podle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1986). Hodnoceny byly oocyty v kontrolní skupině v médiu M199 (2D) a oocyty kultivované v médiu M199 s přidavkem hydrogelu GrowDex v různé koncentraci (0,5% x 1%) viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Jaderné zrání oocytů kultivovaných ve 3D a standardním kultivačním prostředí.

Typ a doba kultivace	Prostředí	Počet oocytů	Počet opakování	Počet a % oocytů v dané fázi meiotického zrání				
				GV	MI	LD	MII	Atyp.
In vitro 48 hod	M199	50	4	6 ^{a,A} /3%	8 ^{a,A} /4%	4 ^{a,A} /2%	180 ^{b,A} /90%	2 ^{a,A} /1%
In vitro 48 hod	M199 + GrowDex 1,0%	50	4	4 ^{a,A} /2%	4 ^{a,A} /2%	2 ^{a,A} /1%	188 ^{b,A} /94%	2 ^{a,A} /1%
In vitro 48 hod	M199 + GrowDex 0,5%	50	4	3 ^{a,A} /1,5%	3 ^{a,A} /1,5%	2 ^{a,A} /1%	190 ^{b,A} /95%	2 ^{a,A} /1%

Oocyty byly *in vitro* kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem GrowDex v různé koncentraci (0,5 a 1 %), jako kontrola byly oocyty kultivovány v samotném médiu M199 bez hydrogelu. GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku, LD – oocyty ve stádiu pozdní diakineze, MI – oocyty ve stádiu první meiotické metafáze, MII – oocyty ve stádiu druhé meiotické metafáze, Atyp. – oocyty s netypickým uspořádáním chromozómů.

a, b, c hodnoty s různými písmennými superskripty ve stejném sloupci se od sebe liší statisticky významně ($P \leq 0,05$).

A, B, C hodnoty s různými písmennými superskripty ve stejném řádku se od sebe liší statisticky významně ($P \leq 0,05$).

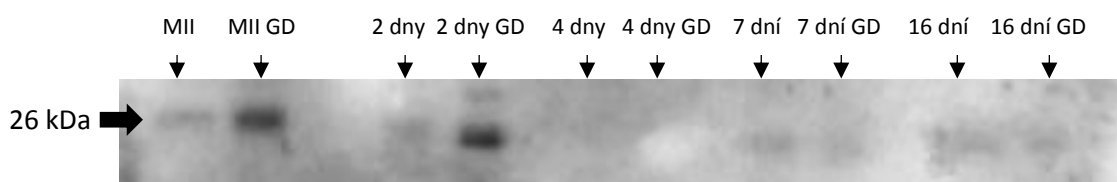
Oocyty kultivované v kultivačním médiu M199 s přidavkem hydrogelu GrowDex (3D) ve všech použitých koncentracích vykazovaly srovnatelné výsledky jaderného zrání s kontrolou (2D) (M199 + 1% GrowDex – GV (2%), MI (2%), LD (1%), MII (94%), atyp. (1%); M199 + 0,5% GrowDex – GV (1,5%), MI (1,5%), LD (1%), MII (95%), atyp. (1%); kontrola M199 bez GrowDex – GV (3%), MI (4%), LD (2%), MII (90%), atyp. (1%). Vzhledem k tomu, že se

výsledky jaderného zrání oocytů kultivovaných v koncentraci 0,5 a 1,0% GrowDex nelišily, byly v dalších experimentech oocyty obklopující buňky kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přísadkou GrowDex ve vyšší koncentraci, tj. 1,0%.

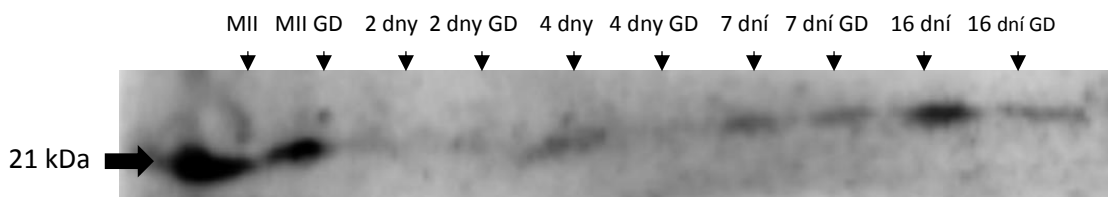
5.2 Detekce proteinů Bcl-2 a Bax v kultivovaných kumulárních buňkách metodou Western blot

Kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu druhé meiotické metafáze byly kultivovány ve 3D a 2D kultivačním prostředí (kontrola) 2, 4, 7 a 16 dnů a byly z nich připraveny vzorky, které byly analyzovány metodou Western blot. V proteinových vzorcích byla sledována exprese markerů apoptózy, pro-apoptického faktoru Bax a anti-apoptického faktoru Bcl-2. Množství proteinů přenesených na PVDF membránu v lyzátu analyzovaných buněk bylo detekováno pomocí specifických protilátek za využití ECL chemiluminiscenčního kitu a detekce signálu byla snímána pomocí přístroje Azure.

Síla signálu protilátky s proteinem byla vyhodnocena na základě parametru integrované optické denzity (IOD), která se rovná součinu průměrné optické denzity a plochy, kde proběhla reakce proteinu s protilátkou. Hodnoty IOD detekovaných proteinů byly vztaženy k IOD tubulinu α , který se vyskytuje ve všech typech buněk a využívá se jako referenční protein, a tímto byla stanovena relativní integrovaná optická denzita (RIOD). Byla vypočtena směrodatná odchylka, která je v grafech znázorněna úsečkou. Statisticky významný rozdíl v expresi daného proteinu mezi jednotlivými kategoriemi kultivovaných buněk je znázorněn spojující linkou s popiskem $p \leq 0,05$ (statistická významnost) nebo $p = ns$ (bez statistické významnosti; not statistically significant).

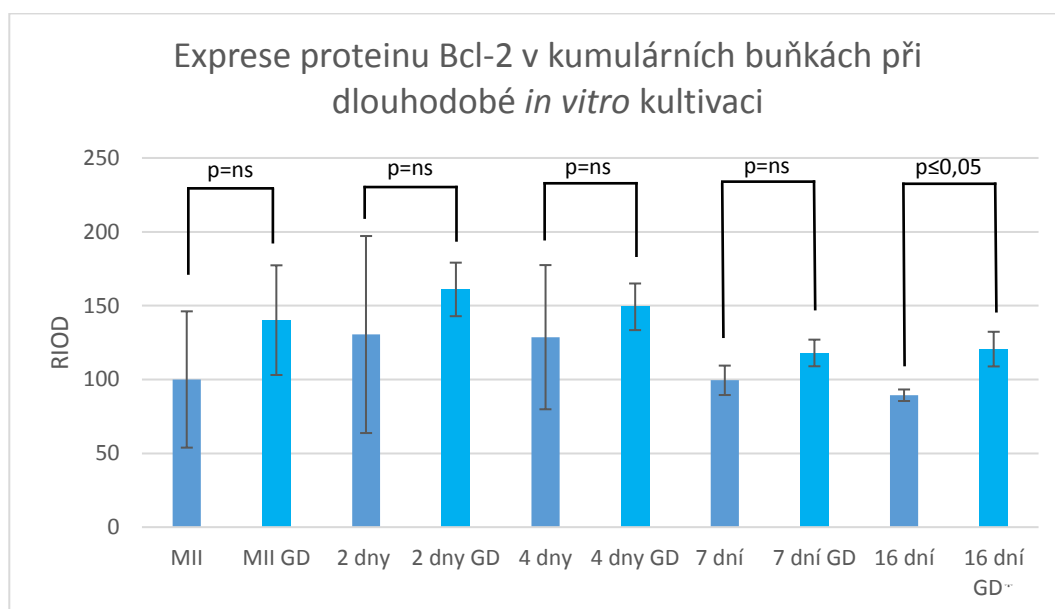


Obrázek 4 Detekce proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách prasete kultivovaných ve 2D a 3D kultivačním prostředí s přísadkou hydrogelu GrowDex (GD). MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické metafáze; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní; GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace s přísadkou hydrogelu GrowDex.



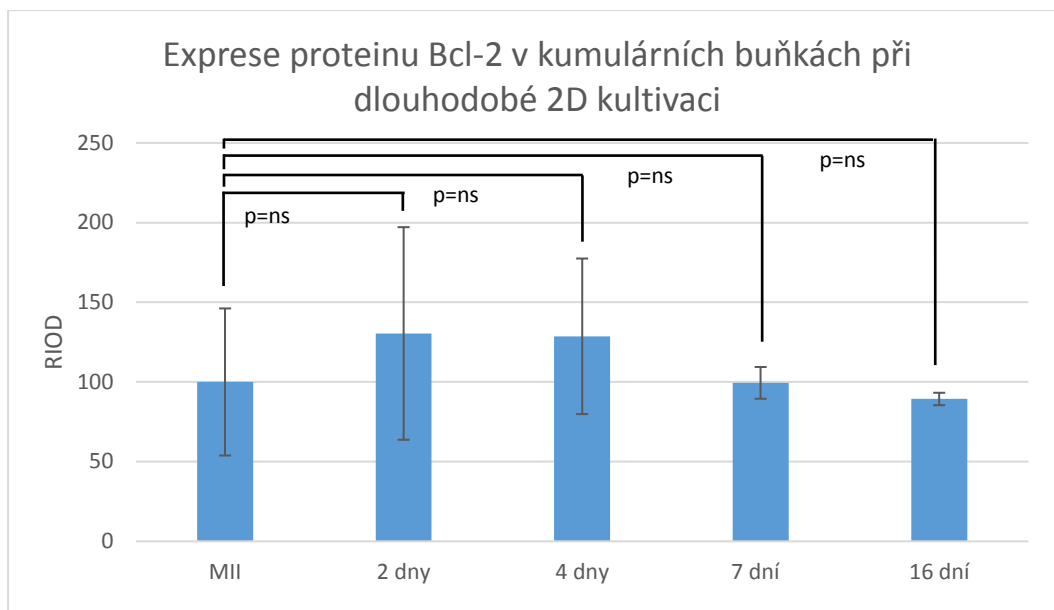
Obrázek 5 Detekce proteinu Bax v kumulárních buňkách prasete kultivovaných ve 2D a 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex (GD). MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické metafáze; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní; GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace s přidavkem hydrogelu GrowDex.

5.2.1 Detekce proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách při dlouhodobé *in vitro* kultivaci



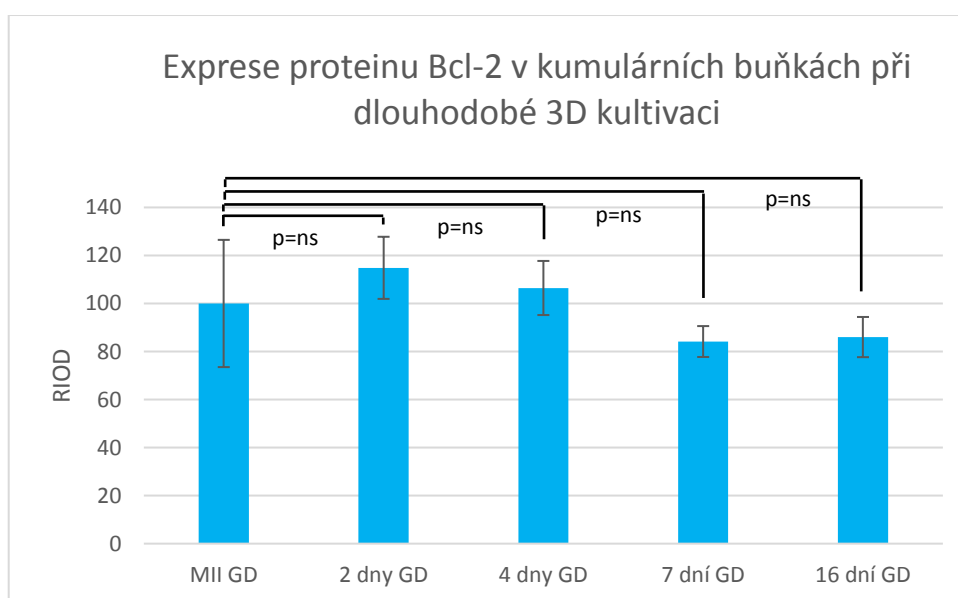
Graf 1 Expres proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách kultivovaných ve 2D a 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex (GD). RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické metafáze; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní; GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace s přidavkem hydrogelu GrowDex. P=ns – nesignifikanční statistický rozdíl. P≤0,05 – statisticky významný rozdíl.

Statistickou analýzou byly porovnávány rozdíly v expresi proteinu Bcl-2 mezi kontrolní a experimentální skupinou v každé kategorii (MIIxMII GD apod). Z Grafu 1 je patrné, že statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou byl prokázán pouze u kumulárních buněk z prodloužené kultivace 16 dní.



Graf 2 Expres proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách kultivovaných ve 2D kultivačním prostředí. RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní. P=ns – nesignifikantní statistický rozdíl.

Statistickou analýzou byly porovnávány rozdíly v expresi mezi kumulárními buňkami z oocytů ve druhé meiotické metafázi a kumulárními buňkami z různých kategorií prodloužené kultivace. Z Grafu 2 vyplývá, že ve standardním kultivačním prostředí se statisticky významně nelišila exprese proteinu Bcl-2 v kultivovaných buňkách 2, 4, 7 a 16 dní oproti buňkám z oocytů ve stádiu MII.

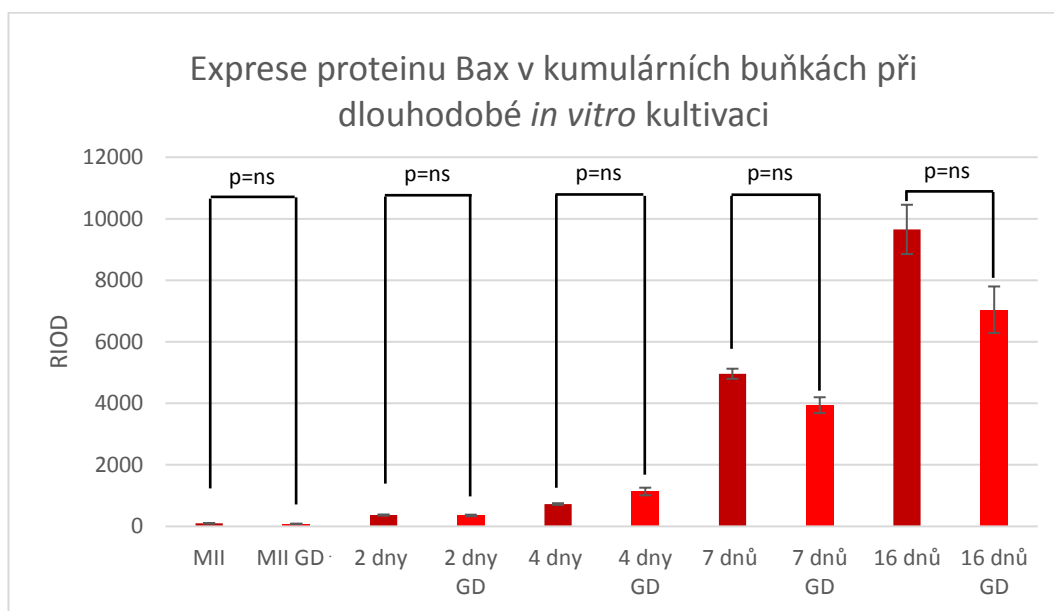


Graf 3 Expres proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách kultivovaných ve 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex (GD). RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické

metafáze; 2, 4, 7, 16 dní GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace 2, 4, 7, 16 dní s přidavkem hydrogelu GrowDex. P=ns – nesignifikantní statistický rozdíl.

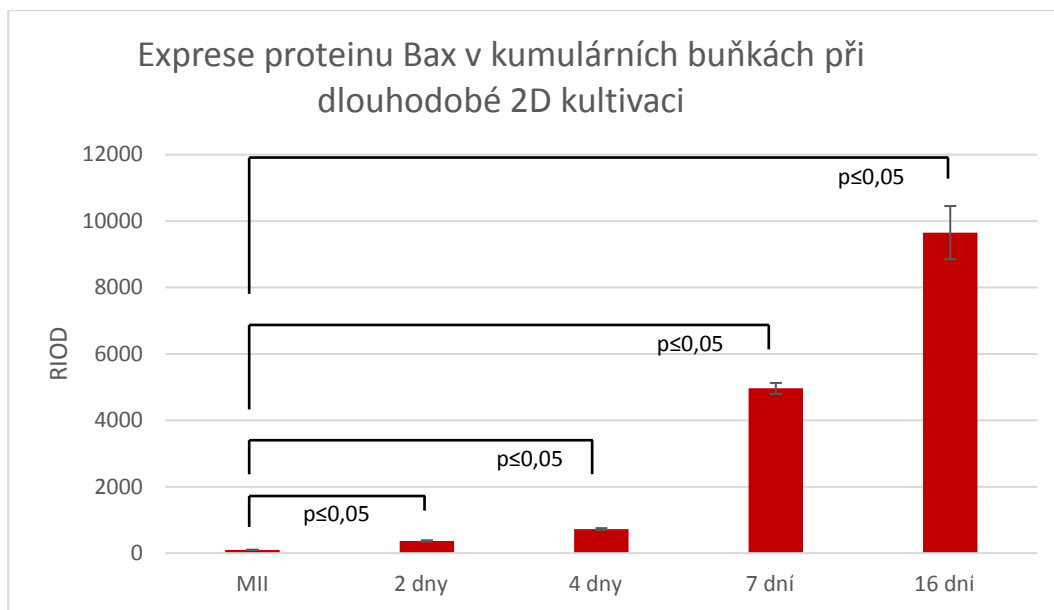
Statistickou analýzou byly porovnávány rozdíly v expresi mezi kumulárními buňkami z oocytů ve druhé meiotické metafázi a kumulárními buňkami z různých kategorií prodloužené kultivace. Z Grafu 3 vyplývá, že ve 3D kultivačním prostředí s přidavkem GrowDex se statisticky významně nelišila exprese proteinu Bcl-2 v kultivovaných buňkách 2, 4, 7 a 16 dní oproti buňkám z oocytů ve stádiu MII.

5.2.2 Detekce proteinu Bax v kumulárních buňkách při dlouhodobé *in vitro* kultivaci



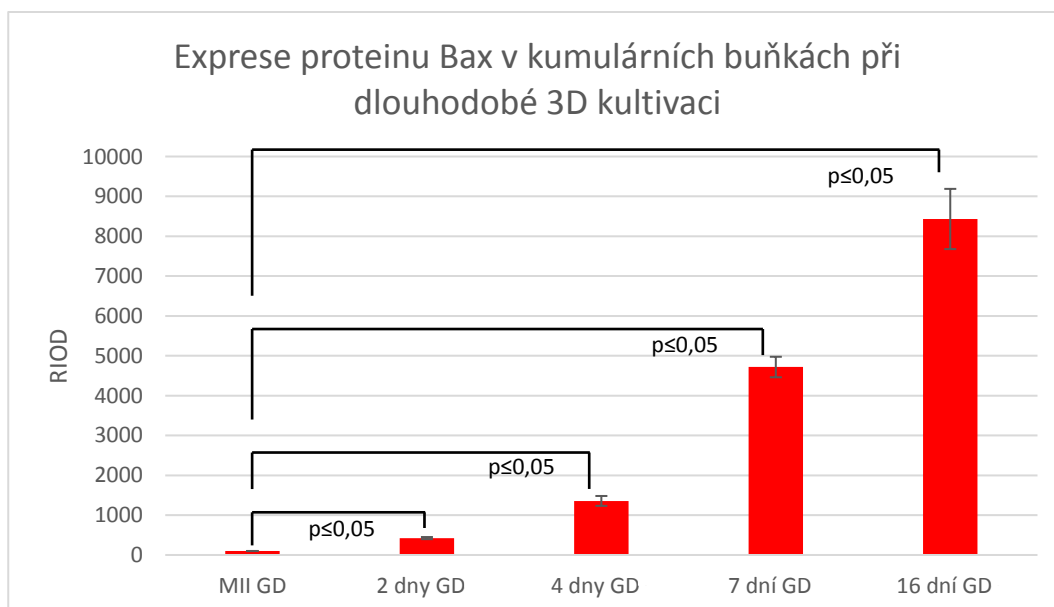
Graf 4 Expres proteinu Bax v kumulárních buňkách kultivovaných ve 2D a 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex (GD). RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické metafáze; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní; GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace s přidavkem hydrogelu GrowDex. P=ns – nesignifikantní statistický rozdíl. $P \leq 0,05$ – statisticky významný rozdíl.

Statistickou analýzou byly porovnávány rozdíly v expresi proteinu Bax mezi kontrolní a experimentální skupinou v každé kategorii (MIIxMIIGD apod). Z Grafu 4 je patrné, že rozdíly v expresi mezi 2D a 3D kultivačním prostředím nebyly hodnoceny jako statisticky významné.



Graf 5 Expres proteinu Bax v kumulárních buňkách kultivovaných ve 2D kultivačním prostředí. RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu MII; 2, 4, 7, 16 dní – kumulární buňky z MII oocytů kultivované v prodloužené kultivaci 2, 4, 7, 16 dní. $P \leq 0,05$ – statisticky významný rozdíl.

V Grafu 5 je vidět rostoucí trend exprese proteinu Bax v kumulárních buňkách korelující s délkou jejich kultivace. Statistickým porovnáním exprese v kumulárních buňkách z prodloužené kultivace 2, 4, 7 a 16 dní s kumulárními buňkami z oocytů ve stádiu MII byla zjištěna signifikance nárůstu ve všech kategoriích prodloužené kultivace.



Graf 6 Expres proteinu Bax v kumulárních buňkách kultivovaných ve 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex (GD). RIOD – relativní integrovaná optická denzita. Kategorie: MII GD – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných v přítomnosti hydrogelu GrowDex do stádia druhé meiotické

metafáze; 2, 4, 7, 16 dní GD – kumulární buňky z prodloužené kultivace 2, 4, 7, 16 dní s přidavkem hydrogelu GrowDex. $P \leq 0,05$ – statisticky významný rozdíl.

Z Grafu 6 lze pozorovat trend nárůstu exprese proteinu Bax v čase v experimentální skupině, oproti kontrolní skupině je nárůst pomalejší. Rozdíl v množství proteinu v kumulárních buňkách při jejich dlouhodobé kultivaci (2-16 dní) byl oproti kumulárním buňkám z oocytů ve stádiu MII statisticky významný.

6 Diskuze

V diplomové práci byl hodnocen vliv trojrozměrného (3D) kultivačního prostředí na *in vitro* zrání kumulo-oocytárních komplexů (COCs) prasete a kvalitu kumulárních buněk z prodloužené kultivace (2, 4, 7 a 16 dní). Trojrozměrné kultivační systémy lépe napodobují přirozené prostředí buněk a předcházejí komplikacím, se kterými se potýká kultivace ve standardním dvourozměrném prostředí (Jin et al. 2010). V klasické 2D kultuře dochází k přilnutí buněk k povrchu nádoby a narušení spojů gap junctions, čímž může být narušena komunikace buněk a jejich přirozená morfologie (Tibbit & Anseth 2009). Dřívější výzkumy prokázaly příznivý vliv 3D prostředí na kultivaci prasečích (Park et al. 2021), myších (Pangas et al. 2003), lidských (Combelles et al. 2005) a kočičích komplexů oocytů s kumulárními buňkami (Colombo et al. 2019). Do dnešního dne nebyly publikovány žádné studie zaměřené na kultivaci COCs prasete ve 3D kultivačním prostředí využívající hydrogel GrowDex. GrowDex je vyrobený z nanofibrilární celulózy získané z březového dřeva, je čistě rostlinného původu, sterilní a neobsahuje žádné živočišné příměsi (Paasonen & Aatsinki 2020). Produkt je připravený k okamžitému použití a lze jej ihned mísit s buňkami a kultivačními médii. Malé molekuly v něm mohou snadno difundovat gelem k buňkám (Sheard 2020). GrowDex je, na rozdíl od jiných hydrogelů, teplotně stabilní, což umožňuje manipulaci při pokojové teplotě, usnadňuje práci s produktem a získání reprodukovatelných výsledků (Söderholm et al. 2021). Hydrogel má přesně definované obsahové složky a lze jej upravit přidáním různých faktorů v médiu (Mimler 2019).

Ve 3D kultivačním prostředí s přidavkem hydrogelu GrowDex v různé koncentraci (1 a 0,5 %) bylo nejprve hodnoceno jaderné zrání kumulo-oocytárních komplexů prasete. Oocyty kultivované v kultivačním médiu M199 s přidavkem hydrogelu GrowDex (3D) ve všech použitých koncentracích vykazovaly srovnatelné výsledky jaderného zrání s kontrolou (2D). Vzhledem k tomu, že se nelišily výsledky jaderného zrání oocytů kultivovaných v koncentraci 0,5 a 1,0% GrowDex, byly v dalších experimentech oocyty obklopující buňky kultivovány v modifikovaném médiu M199 s přidavkem GrowDex ve vyšší koncentraci, tj. 1,0%.

Vitální stav kumulárních buněk z dlouhodobé kultivace byl zjišťován na základě exprese markerů apoptózy, a to anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a pro-apoptotického proteinu Bax. Oba dva zmíněné proteiny patří mezi bílkoviny Bcl-2 rodiny, které jsou schopné regulovat propustnost mitochondriální membrány pro cytochrom c a jsou zásadní pro celý proces vnitřní apoptotické dráhy (Cai et al. 1998). Přítomnost těchto dvou proteinů jsme prokázali ve všech časových úsecích kultivace (2, 4, 7, 16 dní) kumulárních buněk pomocí imunodetekce metodou Western blot.

V našem experimentu byla exprese zkoumaných proteinů vztažena k expresi proteinu tubulinu α , který se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách, kde tvoří důležitou součást cytoskeletu (Gadadhar et al. 2017), a proto se využívá jako referenční protein. Tubulin α byl detekován v oblasti okolo 50 kDa, což odpovídá jeho molekulární hmotnosti 50–55 kDa (Feit et al. 1977). Porovnávány byly vždy hodnoty v rámci jedné membrány.

Metodou Western blot byla hodnocena míra exprese proteinů ze skupiny Bcl-2 v kumulárních buňkách po různé délce kultivace, a to jak z 2D, tak z 3D kultivačního prostředí s přidavkem GrowDex. Expresi proteinů Bcl-2 a Bax v buvolích kumulárních buňkách z COCs v metafázi II sledovali Shen et al. (2020), kteří zjistili, že oproti standardnímu kultivačnímu

prostředí vykazuje ve 3D systému protein Bcl-2 vyšší míru exprese, zatímco protein Bax se vyskytuje v menším množství.

Anti-apoptický protein Bcl-2 o molekulové hmotnosti 26 kDa se vyskytuje v mitochondriálních membránách, endoplazmatickém retikulu a jaderné membráně (Jin & El-Deiry 2005). Jeho cílená exprese v oocytu výrazně oddaluje spontánní apoptózu (Morita et al. 1999). V našich experimentech provedených za využití imunodetekce měl tento protein statisticky významně vyšší expresi v experimentální skupině kumulárních buněk oproti kontrole pouze v době prodloužené kultivace 16 dní. V ostatních kategoriích o různé délce kultivace byla sice z grafů patrná jeho vyšší exprese, avšak rozdíly v expresi nebyly po vyhodnocení statisticky potvrzeny. Hypotéza, že exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2 v kumulárních buňkách prasete kultivovaných ve 3D prostředí je vyšší, než ve standardním 2D kultivačním prostředí tedy nebyla statisticky potvrzena a tudíž nebylo prokázáno, že hydrogel GrowDex podporuje vyšší expresi anti-apoptického proteinu Bcl-2.

Pro-apoptický protein Bax o molekulové hmotnosti 21 kDa se vyskytuje v cytoplazmě a v mitochondriální membráně (Petros et al. 2004). V experimentech Park et al. (2021) docházelo u prasečích COCs kultivovaných ve 3D systému k lepšímu dosažení vývojové kompetence oocytu a protein Bax se v oocytech vyskytoval v menší míře oproti oocytům z 2D kultivačního prostředí. V našich pokusech nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v expresi proteinu Bax mezi experimentální skupinou kultivovanou v hydrogelu GrowDex a kontrolní skupinou, a to v žádné kategorii. Hypotéza, že exprese pro-apoptického proteinu Bax je nižší v kumulárních buňkách prasete kultivovaných ve 3D prostředí, tedy v našem experimentu statisticky prokázána nebyla. V souvislosti s apoptotickými změnami nadcházejícími během prodloužené kultivace kumulárních buněk žen zkoumali expresi tohoto proteinu Sibiak et al. (2021) a zjistili, že buňky kultivované prodlouženou kultivací 15 a 30 dní vykazovaly oproti buňkám z délky kultivace 7 dní nižší expresi proteinu Bax. Oproti tomu v našich experimentech měla exprese Bax statisticky potvrzenou rostoucí tendenci, a to jak v kontrolní, tak v experimentální skupině, což odpovídá apoptotickým procesům, které v buňce při jejím stárnutí probíhají. Rozdíly mezi experimenty mohou být dány jednak modelovým druhem a dále pak také použitým kultivačním systémem.

Oproti experimentu provedeném Shen et al. (2020) jsme nezjistili statisticky významný pozitivní vliv 3D kultivačního systému na kumulární buňky prasete, ačkoliv z hodnot vyjádřených v grafech je patrné, že exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2 byla ve 3D kultivačním systému vyšší než ve standardním 2D kultivačním prostředí, a naopak pro-apoptický protein Bax se zde vyskytoval v menším množství. Přestože se v žádném experimentu statisticky nepotvrdily naše hypotézy o pozitivním vlivu hydrogelu GrowDex na kvalitu prasečích kumulárních buněk, přítomnost apoptotických proteinů Bcl-2 a Bax v buňkách kultivovaných až po dobu 16 dní svědčí o schopnosti buněk regulovat svůj apoptotický cyklus po celou hodnocenou dobu kultivace. Z pohledu jaderného zrání i exprese markerů apoptózy jsou oba kultivační systémy srovnatelné.

V budoucích experimentech by bylo možné zaměřit se na další 3D kultivační systémy, například agarózový (Nagatomo et al. 2017) nebo kolagenový (Joo et al. 2016) hydrogel a detekci dalších markerů, jako jsou markery proliferace a diferenciací, například vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF-A) (Gao et al. 2019) a diferenciací inhibitor (ID2) (Da Silveira et al. 2014) a podobně.

7 Závěr

V našich experimentech byl sledován vliv 3D kultivačního prostředí využívajícího hydrogel GrowDex na *in vitro* zrání prasečích COCs a kvalitu kumulárních buněk z prodloužené kultivace. Vliv trojrozměrného kultivačního systému byl porovnáván se standardním 2D kultivačním prostředím. Stav kumulárních buněk byl hodnocen na základě exprese markerů apoptózy pomocí metody Western blot. Hypotézou bylo, že ve 3D kultivačním systému bude exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2 vyšší než v klasickém 2D prostředí, a oproti tomu se zde bude vyskytovat nižší exprese pro-apoptického proteinu Bax. Tato hypotéza nebyla v našich experimentech statisticky prokázána a nebyl potvrzen významný pozitivní vliv 3D kultivačního systému na prasečí kumulární buňky. Z našich experimentů je také patrné, že se neliší výsledky jaderného zrání COCs, které jsou kultivovány ve 2D a 3D kultivačním prostředí. V dalších experimentech by bylo možné zaměřit se na další 3D kultivační systémy a detekci markerů proliferace a diferenciaci.

8 Literatura

- Abbott A. 2003. Biology's new dimension. *Nature* **424**:870-872.
- Abou-Hamdan A, Guedouari-Bounihi H, Lenoir V, Andriamihaja M, Blachier F, Bouillaud F. 2015. Oxidation of H₂S in mammalian cells and mitochondria. Pages 201-228 in: Cadenas E, editor. *Methods in Enzymology: Hydrogen Sulfide in Redox Biology Part A*. Academic Press, Cambridge.
- Adams CM, Clark-Gavey S, Porcu P, Eischen CM. 2019. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology* **8**:636.
- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* **281**:1322-1326.
- Adhikari D, Liu K. 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **382**:480-487.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* **121**:647-653.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell* (4th edition). Garland Science, New York.
- Alexandreaanu IC, Lawson DM. 2003. Heme Oxygenase in the Rat Ovary: Immunohistochemical Localization and Possible Role in Steroidogenesis. *Experimental Biology and Medicine* **228**:59-63.
- Allbritton NL, Meyer T. 1993. Localized calcium spikes and propagating calcium waves. *Cell Calcium* **14**:691-697.
- Amleh A, Dean J. 2002. Mouse genetics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. *Human Reproduction* **8**:395-403.
- Anderson LL. 2009. Reproductive Biology of Pigs. *Animal Industry Report (AS655)* DOI: 10.31274/ans_air-180814-838.
- Arroyo A, Kim B, Yeh J. 2020. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact. *Reproductive Sciences* **27**:1223-1252.
- Baharvand H, Hashemi SM, Ashtiani SH, Farrokhi A. 2006. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *International Journal of Developmental Biology* **50**:645-652.
- Banerjee M, Bhonde RR. 2006. Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology* **51**:1-5.
- Barker TH. 2011. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials* **32**:4211-4214.

- Bender AT, Beavo JA. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Review* **58**:488-520.
- Bhatt RR, Ferrell JE Jr. 1999. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science* **286**:1309-1310.
- Bhattacharya M, Malinen MM, Lauren P, Lou YR, Kuisma SW, Kanninen L, Lille M, Corlu A, GuGuen-Guillouzo CH, Ikkala O, Laukkanen A, Urtti A, Yliperttula M. 2012. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *Journal of Controlled Release* **164**:291-298.
- Bláha M, Procházka R, Adámková K, Nevorál J, Němcová L. 2017. Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **130**:38-46.
- Boatright KM, Salvesen GS. 2003. Mechanism of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**:725-731.
- Bornslaeger EA, Wilde MW, Schultz RM. 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology* **105**:488-499.
- Bornslaegr J, Mattei P, Schultz R. 1986. Involvement of camp-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse maturation. *Developmental Biology* **114**:453-462.
- Boron WF, Boulpaep EL. 2016. *Medical physiology*. Elsevier Books, Amsterdam.
- Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E. 2000. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* **19**:649-660.
- Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**:474-482.
- Cai J, Yang Y, Jones DP. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta* **1366**:139-349.
- Cartron PF, Priault M, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM. 2003. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *Journal of Biological Chemistry* **278**:11633-11641.
- Clapham, DE. 1995. Calcium signalling. *Cell* **80**:259-268.
- Clarke P. 1995. Cyclin-Dependent Kinases: Cak-Handed Kinase Activation *Current Biology* **5**: 40-42.
- Collins JK, Jones KT. 2016. DNA damage responses in mammalian oocytes. *Reproduction* **152**:15-22.
- Colombo M, Morselli MG, Tavares MR, Apparicio M, Luvoni GC. 2019. Developmental Competence of Domestic Cat Vitrified Oocytes in 3D Enriched Culture Conditions. *Animals* **9**:329.

- Combelles CMH, Fissore RA, Albertini DF, Racowsky C. 2005. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system. *Human Reproduction* **20**:1349–1358.
- Coticchio G, Dal Canto M, Renzini MM, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D, Novara PV, Fadini R. 2015. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction* **21**:427-454.
- Coulombe P, Meloche S. 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**:1376-1387.
- Cox RT, Spradling AC. 2003. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis. *Development* **130**:1579-1590.
- Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M. 2008. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* **135**:19-27.
- Da Silveira JC, Carnevale EM, Winger QA, Bouma GJ. 2014. Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**:44.
- Daff S. 2010. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide* **23**:1-11.
- Danial NN. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research* **24**:7254-7263.
- De Smedt A, Steemans M, De Boeck M, Peters AK, Van der Leede B, Van Goethem F, Lampo A, Vanparys P. 2008. Optimisation of the cell cultivation methods in the embryonic stem cell test results in an increased differentiation potential of the cells into strong beating myocard cells. *Toxicology In Vitro* **22**:1789-1796.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**:429-438.
- Desai N, Alex A, AbdelHafez F, Calabro A, Goldfarb J, Fleischman J, Falcone T. 2010. Three-dimensional in vitro follicle growth: Overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**:119-131.
- Dhaliwal A. 2012. Three dimensional cell culture: a review. *Materials and Methods* **2**:162.
- Dharmarajan AM, Hisheh S, Singh B, Parkinson S, Tilly KI, Tilly JL. 1999. Anti-oxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology* **140**:2555-2561.
- Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* **55**:1211-1239.

- Dupré A, Buffin E, Roustan Ch, Nairn AC, Jessus C, Haccard O. 2013. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the auto-amplification of MPF independently of PKA in *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science* **126**:3916–3926.
- Dutta RC, Dutta AK. 2009. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnology Advances* **27**:334-339.
- Edlich F. 2018. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **500**:26-34.
- Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies* **12**:207-218.
- Edwards RG, Gates AH. 1959. Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. *Journals of Endocrinology* **18**:292-304.
- Elkouby YM, Mullins MC. 2017. Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis – New findings from early vertebrate oogenesis. *Developmental biology* **430**:275-287.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**:495-516.
- El-Sherry, Derar R, Bakry R. 2013. Changes in blood flow in ovine follicles and serum concentration of estradiol 17 beta (E2) and nitric oxide (NO) around the time of ovulation in Ossimi ewes. *Animal Reproduction Science* **138**:188-193.
- Eppig JJ, Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Ning Y, Halet G, Kaldis P, Liu K. 2012. CDK1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics* **21**:2476-2484.
- Eppig JJ, Pendola FL, Wigglesworth K, Pendola JK. 2005. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. *Biology of Reproduction* **73**:351-357.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* **56**:976-984.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122**:829-838.
- Estienne A, Portela VM, Choi Y, Zamberlam G, Boerboom D, Roussel V, Meinsohn MC, Brännström M, Curry TE, Jo M, Price CA. 2019. The endogenous hydrogen sulfide generating system regulates ovulation. *Free Radical Biology and Medicine* **138**:43-52.
- Fan H, Li M, Tong CH, Chen D, Xia G, Song X, Schatten H, Sun Q. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction And Development* **63**:480-487.

- Fan H, Tong Ch, Chen D, Sun Q. 2003a. Roles of protein kinase C in oocyte meiotic maturation and fertilization. *Progress in Natural Science* **13**:6.
- Fan HY, Huo LJ, Meng XQ, Zhong ZS, Hou Y, Chen DY, Sun QY. 2003b. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction* **69**:1552-1564.
- Fan HY, Sun QY. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction* **70**: 535-547.
- Feit H, Dutton GR, Barondes SH, Shelanski ML. 1971. Microtubule protein. Identification in and transport to nerve endings. *Journals of Cell Biology* **51**:138-147.
- Fernandes H, Moroni L, Van Blitterswijk C, De Boer J. 2009. Extracellular matrix and tissue engineering applications. *Journals of Material Chemistry* **19**:5474-5484.
- Filatov MA, Khramova YV, Semenova ML. 2015. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art. *Acta Naturae* **7**:48-56.
- Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. 2002. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **10**:76-100.
- Fleischman RA. 1993. From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. *Trends in Genetics* **9**:285-290.
- Fulka J, Jung T, Moor RM. 1992. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **32**:378-382.
- Fulka J. 2007. Savčí oocyt – nový pohled na staré dogma? *Živa* **4**:161-168.
- Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. 2017. The tubulin code at a glance. *Journal of Cell Science* **130**:1347-1353.
- Gao X, Zhang J, Pang Z, Li Q, Liu H. 2019. The distribution and expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) during follicular development and atresia in the pig. *Reproduction, Fertility and Development* **32**:259-266.
- Gelaude A, Slaby S, Cailliau K, Marin M, Lescuyer-Rousseau A, Molinaro C, Nevoral J, Kučerová-Chrpová V, Sedmíková M, Petr J, Martoriati A, Bodart J-F. 2020. Hydrogen sulfide impairs meiosis resumption in *Xenopus laevis* oocytes. *Cells* **9**:237.
- Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology* (6th edition). Sinauer Associates, Sunderland.
- Gladwin MT, Raat NJ, Shiva S, Dezfulian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, Patel RP. 2006. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **291**:2026-2035.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2009. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Seminars in Cancer Biology* **19**:57-66.
- Green DR, Evan GI. 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**:19-30.

- Grover AR, Fegley B, Duncan TV, Duncan FE. 2018. The Oocyte. Encyclopedia of Reproduction (2nd edition) **2**:21-28.
- GrowDex Application Note 4. Guidelines for recovering cells and spheroids from GrowDex® using GrowDase™ enzyme.
- Haccard O, Sarcevic B, Lewellyn A, Hartley R, Roy L, Izumi T, Erikson E, Maller JL. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAPK. *Science* **262**:1262-1265.
- Haferkamp B, Zhang H, Lin Y, Yeap X, Bunce A, Sharpe J, Xiang J. Bax Δ 2 is a novel bax isoform unique to microsatellite unstable tumors. *Journal of Biological Chemistry* **287**:34722-34729.
- Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Current Biology* **9**:680-689.
- Hardwick JM, Soane L. 2013. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5** (a008722) DOI: 10.1101/cshperspect.a008722.
- Hattori MA, Nishida N, Takesue K, Kato Y, Fujihara N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* **24**:65-73.
- Haycock JW. 2011. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods in Molecular Biology* **695**:1-15.
- Heytens, E, Soleimani R, De Sutter P. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **6**:171-174.
- Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. 2005. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Developmental Biology* **287**:249-61.
- Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* **124**:43-101.
- Holt JE, Lane SIR, Jones KT. 2013. Chapter Seven – The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. Pages 207-226 in Wassarman PM, editor. *Current Topics in Developmental Biology* **102**. Academic Press, Cambridge.
- Homa ST, Carroll J, Swann C. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction* **8**:1274-1281.
- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology* **21**:745-754.
- Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in Genetics* **24**:86-93.
- Hunt T, Nasmyth K. 1997. Cell multiplication. *Current opinion in cell biology* **9**:765-767.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:123-129.

- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25.
- Hyttel P, Fair T, Avery B, Callesen H, Greve T. 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* **34**:447-454.
- Chang C, Zhang L. 2011. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers* **84**:40-53.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
- Chesnel F, Eppig JJ. 1995. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Gamete Biology* **40**:503-508.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell* **37**:299-310.
- Chmelíková E, Sedmíková M, Petr J, Kott T, Lánská V, Tůmová L, Tichovská H, Jeřeta M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal of Animal Science* **54**:137-149.
- Choi T, Aoki F, Mori M, Yamashita M, Nagahama Y, Kohmoto K. 1991. Activation of p34cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* **113**:789-795.
- Choi T, Fukasawa K, Zhou R, Tessarollo L, Borror K, Resau J, Vande Woude GF. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **93**:7032-7035.
- Ianaro A, Cirino G. 2016. Chapter 9 - Hydrogen Sulfide Pathway and Cancer. Pages 133-144 in: Hayat MA, editor. *Brain Metastases from Primary Tumors*. Academic Press, Cambridge.
- Jaffe LA, Egbert JR. 2017. Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annual Review of Physiology* **79**:237-260.
- Jensen C, Teng Y. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* **7**:33.
- Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology and Therapy* **4**:147-171.
- Jin S, Lei L, Shikanov A, Shea LD, Woodruff TK. 2010. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil Steril* **98**:2633-2639.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. **122**:303-315.

- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428**:145-150.
- Johnson MH. 2018. *Essential Reproduction* (8th edition). Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Jones KT. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **10**:1-5.
- Jones KT. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction* **130**:813-823.
- Joo S, Oh SH, Sittadjody S, Opara EC, Jackson JD, Lee SJ, Yoo JJ, Atala A. 2016. The effect of collagen hydrogel on 3D culture of ovarian follicles. *Biomedical Materials* **11**:6.
- Josefsberg LBY, Galiani D, Lazar S, Kaufman O, Seger R, Dekel N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction* **68**:1282-1290.
- Kale J, Osterlund E, Andrews D. 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* **25**:65-80.
- Kaser D, Ginsburg ES, Carrell DT, Racowsky C. 2019. Chapter 31 – Assisted Reproduction. Pages 779-822 in Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management* (8th Edition).
- Kitada S, Krajewski S, Miyashita T, Krajewska M, Reed JC. 1996 *Oncogene* **12**:187-192.
- Knight E, Przyborski S. 2015. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro*. *Journal of Anatomy* **227**:746-756.
- Krejčová T, Šmelcová M, Petr J, Bodart JF, Sedmíková M, Nevoral J, Dvořáková M, Vyskočilové A, Weingartová I, Kučerová-Chrpová V, Chmelíková E, Tůmová L, Jílek F. 2015. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One* 10 (e0116964) DOI: 10.1371/journal.pone.0116964.
- Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston NJ, Maro B. 1993. The metaphase II arrest in mouse is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF. *The EMBO Journal* **12**:3773-3778.
- Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao X-J, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL. 1998. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death and Differentiation* **5**:67-76.
- Kumar R, Herbert PE, Warrens AN. 2005. An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery* **3**:268-277.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* **17**:525-535.

- Langhans SA. 2018. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology* **9**:6.
- Lasman L, Hanna JH, Novershtern N. 2020. Role of m6A in Embryonic Stem Cell Differentiation and in Gametogenesis. *Epigenomes* **4**:5
- Laurén P, Somersalo P, Pitkänen I, Lou Y-R, Urtti A, Partanen J, Seppälä J, Madetoja M, Laaksonen T, Mäkitie A, Ylipetrulla M. 2017. Nanofibrillar cellulose-alginate hydrogel coated surgical sutures as cell-carrier systems. *PLoS ONE* **12** (e0183487) DOI: 10.1371/journal.pone.0183487.
- Lawen A. 2003. Apoptosis – an Introduction. *BioEssays* **25**:888-896.
- Lazar S, Galiani D, Dekel N. 2002. cAMP-Dependent PKA negatively regulates polyadenylation of c-mos mRNA in rat oocytes. *Molecular Endocrinology* **16**:331-341.
- Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. 2009. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* **8**:705-711.
- Li L, Zheng P, Dean J. 2010. Maternal control of early mouse development. *Development* **137**:859-870.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of Reproduction* **63**:839-845.
- Li YH, Kang H, Xu YN, Heo YT, Cui XS, Kim NH, Oh JS. 2013. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **89**:1-7.
- Lin RZ, Chang HJ. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* **3**:1172-1184.
- Liu T, Mukosera GT, Blood AB. 2020. The role of gasotransmitters in neonatal physiology. *Nitric Oxide* **95**:29-44.
- Liu W, Xin Q, Wang X, Wang S, Wang H, Zhang W, Yang Y, Zhang Y, Zhang Z, Wang Ch, Xu Y, Duan E, Xia G. 2017. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death and Disease* **8** (e2662) DOI: 10.1038/cddis.2017.82.
- Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild Ch, Chen H, Zhou J. 2016. Direct activation of Bax protein for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews* **36**:313-341.
- Lorca T, Cruzalegui F, Fesquet D, Cavadore JC, Méry J, Means A, Dorée M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* **366**:270-273.
- Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby AM. 1993. BCL-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *The Journal of Pathology* **169**:431-437.
- Lüthi AU, Martin SJ. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **14**:641-650.

- Macháty Z, Funahashi H, Day BN, Prather RS. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **56**:921-930.
- Maller J, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D, Nurse P. 1989. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science* **12**:53-63.
- Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. 2005. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of Reproduction* **72**:2-13.
- Masopust J, Průša R. 2003. *Patobiochemie buňky*. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta. Praha.
- Masui Y, Markert CL. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *The Journal of Experimental Zoology* **177**:129-145.
- Mattioli M, Barboni B. 2000. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus–oocyte complex. *Molecular and Cellular Endocrinology* **161**:19-23.
- Mattioli M, Galeati G, Bacci M. 1991. Changes in maturationpromoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molecular Reproduction and Development* **30**:120-125.
- McArthur K, Kile BT. 2018. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology* **28**:475-493.
- McGhee EA, Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *The Endocrinology Review* **21**:200-214.
- Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. 2002. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science* **297**:1343-1345
- Mehlmann LM. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* **130**:791-799.
- Mellor H, Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical Journal* **332**:281-92.
- Mimler T. 2019. Smooth muscle cells and endothelial cells comparative study of 3D culture in GrowDex and Matrigel. *GrowDex Application Note* 32.
- Mohammad-Hadi L, MacRobert AJ, Loizidou M, Yaghini E. 2018. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems. *Nanoscale* **10**:1570-1581.
- Moor R, Dai Y. 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction* **58**:91-104.
- Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. 1999. Targeted Expression of Bcl-2 in Mouse Oocytes Inhibits Ovarian Follicle Atresia and Prevents Spontaneous and Chemotherapy-Induced Oocyte Apoptosis In Vitro. *Molecular Endocrinology* **13**:841-850.
- Motlík J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility* **72**:323-328.

- Motlík J, Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* **25**:87-96.
- Motlík J, Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **4**:366-375.
- Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**:280-286.
- Nagatomo H, Yao T, Araki Y, Mizutani E, Wakayama T. 2017. Agarose capsules as new tools for protecting denuded mouse oocytes/embryos during handling and freezing-thawing and supporting embryonic development *in vivo*. *Scientific Reports* **7**:17960.
- Nath S, Devi GR. 2016. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics* **163**:94-108.
- Němeček D, Dvořáková M, Heroutová I, Chmelíková E, Sedmíková M. 2017. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during *in vitro* aging. *PeerJ* **5** (e3876) DOI: 10.7717/peerj.3876.
- Nevoral J, Orsak M, Klein P, Petr J, Dvorakova M, Weingartova I, Vyskocilova A, Zamostna K, Krejcová T, Jilek F. 2014. Cumulus cell expansion, a role in oocyte biology and its measurement: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **45**:13-26.
- Nevoral J, Žalmanová T, Zámstná K, Kott T, Kučerová-Chrpová V, Bodart J, Gelaude A, Procházka R, Orsák M, Šulc M, Klein P, Dvořáková M, Weingartová I, Výchová A, Hošková K, Krejčová T, Jilek F, Petr J. 2015. Endogenously Produced Hydrogen Sulfide Is Involved In Porcine Oocyte Maturation In Vitro. *Nitric Oxide* **51**:24-35.
- Nevoral J. 2018. Základní výzkum oocyty a časného embryonálního vývoje jako základ pro hodnocení endokrinně-disrupčního efektu polutantů na lidskou reprodukci [Habilitation Thesis]. Univerzita Karlova, Plzeň.
- Newton AC. 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:28495-28498.
- Newton AC. 1997. Regulation of protein kinase C. *Current Opinion in Cell Biology* **9**:161-167.
- Nishizuka Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *The FASEB Journal* **9**:484-496.
- Olson KR, Donald JA, Dombkowski RA, Perry FS. 2012. Evolutionary and comparative aspects of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **184**:117-129.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**:143-183.
- Osaki T, Shin Y, Sivathanu V, Campisi M, Kamm RD. 2018. In Vitro Microfluidic Models for Neurodegenerative Disorders. *Advanced Healthcare Materials* **7**:2192-2640.
- Otasevic V, Korac B. 2016. Aminoacids: Metabolism. Pages 149-155 in: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Cambridge.

- Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Lu HT, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine* **6**:422-430.
- Paasonen L, Aatsinki SM. 2020. Diffusion rates for small drug molecules studied in GrowDex®-T hydrogel. *GrowDex-T Application Note* 2.
- Pae HO, Lee YC, Jo EK, Chung HT. 2009. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H₂S) in inflammation. *Archives of Pharmacal Research* **32**:1155–1162.
- Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR. 1999. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal* **17**:5037-5047.
- Pan B, Li J. 2019. The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology* **17**:8.
- Pangas SA, Saudye H, Shea LD, Woodruff TK. 2003. Novel Approach for the Three-Dimensional Culture of Granulosa Cell–Oocyte Complexes. *Tissue Engineering* **9**:1013-1021.
- Park JE, Lee J, Lee ST, Lee E. 2021. In vitro maturation on ovarian granulosa cells encapsulated in agarose matrix improves developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* **164**:42-50.
- Park SS, Jwa E, Shin SH, Ju EJ, Park I, Pak JH, Hwang JJ, Cho DH, Kim BM, Kim SB, Lee JS, Song SY, Jeong SY, Choi EK. 2017. Ibulocydine sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via calpain-mediated Bax cleavage. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **83**:47-55.
- Paukkonen H. 2018. A method for freeze-drying cells in a hydrogel comprising nanofibrillar cellulose and freeze-dried cells in an aerogel comprising nanofibrillar cellulose. *Berggren Oy, Finland*. WO2018/108341A1.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* **129**:3200-3207.
- Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics* **21**:200-203.
- Petr J, Rozinek J, Hruban V, Jílek F, Sedmíková M, Vaňourková Z, Němeček Z. 2001. Ultrastructural Localization Of Calcium Deposits During In Vitro Culture Of Pig Oocytes. *Molecular Reproduction And Development* **58**: 196-204.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, Fesik SW. 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:3012-3017.
- Petros AM, Olejnik ET, Fesik SW. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**:83-94.

- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145**:27-37.
- Pincus G, Enzmann EV. 1935 The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *Journal of Experimental Medicine* **62**:665-675.
- Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. 2016. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science* **23**:36.
- Procházka R, Němcová L. 2019. Mechanisms of FSH- and Amphiregulin-Induced MAP Kinase 3/1 Activation in Pig Cumulus-Oocyte Complexes During Maturation In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:1179.
- Reed JC. 2000. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology* **157**:1415-1430.
- Riedl SJ, Salvesen GS. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:405-413.
- Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. 1994. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **202**:1543-1552.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**:45-53.
- Rueda BR, Tilly KI, Botros I, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL. 1997. Increased bax and interleukin-1 β -converting enzyme (Ice) messenger RNA levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biology of Reproduction* **56**:186-193.
- Sadler TW. 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. Grada, Praha.
- Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Ikawa Y. 1989. The cmos proto-oncogene product is a cytostatic factor (CSF) responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* **342**:512-518.
- Salha O, Abusheikha N, Sharma V, Abusheika N. 1998. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reproduction Update* **4**:816-832.
- Salustri A, Campagnolo L, Klinger FG, Camaioni A. 2019. Molecular organization and mechanical properties of the hyaluronan matrix surrounding the mammalian oocyte. *Matrix Biology* **78,79**:11-23.
- Sánchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* **1822**:1896-1912.
- Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BAJ. 2014. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**:117.
- Santulli G, Marks AR. 2015. Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain, metabolism, and aging. *Current Molecular Pharmacology* **8**:206-222.

- Sargus-Patino CN, Wright EC, Plautz SA, Miles JR, Vallet JL, Pannier AK. 2014. In vitro development of preimplantation porcine embryos using alginate hydrogels as a three-dimensional extracellular matrix. *Reproduction, Fertility and Development* **26**:943-953.
- Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. 2006. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Developmental Biology* **6**:47.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**:983-986.
- Sheard J. 2020. Robust and accurate 3D cell viability assays combining Promega viability kits and GrowDex. *GrowDex Application Note* 35.
- Shen P, Xu J, Wang P, Zhao X, Huang B, Wu F, Wang L, Chen W, Feng Y, Guo Z, Liu X, Deng Y, Jiang J, Shi D, Lu F. 2020. A new three-dimensional glass scaffold increases the in vitro maturation efficiency of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte via remodelling the extracellular matrix and cell connection of cumulus cells. *Reproduction of Domestic Animals* **55**:170-180.
- Shibuya EK, Masui Y. 1988. Stabilization and enhancement of primary cytotostatic factor (CSF) by ATP and NaF in amphibian egg cytosols. *Developmental Biology* **129**:253-264.
- Shiva S. 2013. Nitrite: a physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology* **1**:40-44.
- Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold *Journal of Cell Science* **119**:1213-1218.
- Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah, Boyle M, Slack GW, Marry MA, Connors JM, Brooks-Wilson AR, Gascoyne RD. 2012. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **26**:1383-1390.
- Sibiak R, Bryl R, Stefańska K, Chermuła B, Pieńkowski W, Jeseta M, Pawelczyk L, Mozdziak P, Spaczyński RZ, Kempisty B. 2021. Expression of the apoptosis regulatory gene family in the long-term in vitro cultured human cumulus cells. *Medical Journal of Cell Biology*: 9-13.
- Söderholm S, Varhimo E, Paasonen L, Kiuru T. 2021. Best Practices for Pipetting 3D Cell Culture Hydrogels. *GrowDex Application Note* 37.
- Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. 2009. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* **459**:428-432.
- Stojkovic M, Motlík J, Kölle S, Zakhartchenko V, Alberio R, Sinowatz F, Wolf E. 1999. Cell-Cycle Control And Oocyte Maturation: Review Of Literature. *Reproduction In Domestic Animals* **34**: 335-342.
- Strnisková M, Barančík M, Ravingerová T. 2002. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Regulation of Cellular Processes. *General Physiology and Biophysics* **21**:231-255.

- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental Biology* **279**:20-30.
- Szmelskyj I, Aquilina L, Szmelskyj A. 2014. *Acupuncture for IVF and assisted reproduction* (1st edition). Churchill Livingstone, London.
- Taieb R, Thibier C, Jessus C. On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development* **48**:397-411.
- Tanoue T, Nishida E. 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling* **15**:455-462.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61**:748-755.
- Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, Wang XY, Dent P, Reed JC, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. 2013. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **17**:61-75.
- Tibbitt MW, Anseth KS. 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* **103**:655-663.
- Tichovská H, Petr J, Chmelíková E, Sedmíková M, Tůmová L, Krejčová M, Dörflerová A, Rajmon R. 2011. Nitric oxide and meiotic competence of porcine oocytes. *Animal* **5**:1398-1405.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. 1995. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger RNA levels. *Endocrinology* **136**:232-241.
- Tilly JL, Tilly KI, Perez GI. 1997. The genes of cell death and cellular susceptibility to apoptosis in the ovary: a hypothesis. *Cell Death and Differentiation* **4**:180-187.
- Tilston V, Taylor SS, Perera D. 2009. Inactivating the spindle checkpoint kinase Bub1 during embryonic development results in a global shutdown of proliferation. *BMC Research Notes* **2**: 190.
- Tiwari M, Prasad S, Shrivastav TG, Chaube SK. 2017. Calcium Signaling During Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology* **232**:976-981.
- Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AN, Ali I, Singh AK, Shrivastav TG, Chaube SK. 2015. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis* **20**:1019-1025.
- Törnell J, Billig H, Hillensjö T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiologica Scandinavica* **139**:511-517.

- Törnell J, Billig H, Hillensjö T. 1991. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human Reproduction* **6**:411-422.
- Touny LH, Banerjee PP. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate* **66**:1542-1555.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. 2001. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* **121**:51-75.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14;18) chromosome translocation. *Science* **226**:1097-1099.
- Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* **81**:595-604.
- Vacek Z. 2011. Embryologie. Grada Publishing, Havlíčkův Brod.
- Van den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. 1997. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* **47**:73-82.
- Van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **63**:1717-1751.
- Vaskivuo TE, Stenbäck F, Karhumaa P, Risteli J, Dunkel L, Tapanainen JS. 2000. Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology* **165**:75-83.
- Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SGC, Faes MR, Paes de Carvalho CS, Quirino CR. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* **102**:217-227.
- Vigneron S, Robert P, Hached K, Sundermann L, Charrasse S, Labbé JC, Castro A, Lorca T. 2016. The master Greatwall kinase, a critical regulator of mitosis and meiosis. *The International Journal of Developmental Biology* **60**:245-254.
- Viveiros MM, Bivens CM, De La Fuente R. 2004. Regulation of mammalian oocyte maturation. Pages 113-129 in: Peter CKL, Eli YA, editors. *The Ovary*. Elsevier Academic Press.
- Wan J, Kalpage HA, Vaishnav A, Liu J, Lee I, Mahapatra G, Turner AA, Zurek MP, Ji Q, Moraes CT, Recanati MA, Grossman LI, Salomon AR, Edwards BFP, Hüttemann M. 2019. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Scientific Reports* **9**:15815.
- Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. 2019. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death and Disease* **10**:177.
- Wassarman PM. 1988. The mammalian ovum. Pages 69-102 in: Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd., New York.

- Wassarman PM. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *Glycobiology and Extracellular Matrices* **283**:24285-24289.
- Wilson CH, Ali ES, Scrimgeour N, Martin AM, Hua J, Tallis GA, Rychkov GY, Barritt GJ. 2015. Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca^{2+} entry and reduces ER Ca^{2+} through a protein kinase C-dependent mechanism. *The Biochemical Journal* **466**:379-390.
- Yadav PK, Tiwari M, Gupta A, Sharma A, Prasad S, Pandey AN, Chaube SK. 2018. Germ cell depletion from mammalian ovary: possible involvement of apoptosis and autophagy. *Journal of Biomedical Science* **25**:36.
- Yang LL, Zhao Y, Luo SM, Ma JY, Ge ZJ, Shen W, Yin S. 2018. Toxic effects and possible mechanisms of hydrogen sulfide and/or ammonia on porcine oocyte maturation in vitro. *Toxicology Letters* **285**:20-26.
- Yang R, Piperdi S, Gorlick R. 2008. Activation of the RAF/Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway Mediates Apoptosis Induced by Chelerythrine in Osteosarcoma. *Clinical Cancer Research* **14**:6396-6404.
- Yi ZY, Liang QX, Meng TG, Li J, Dong MZ, Hou Y, Ouyang YC, Zhang CH, Schatten H, Sun QY, Qiao J, Qian WP. 2019. PKC β 1 regulates meiotic cell cycle in mouse oocyte. *Cell Cycle* **18**:395-412.
- Ying-Hua L, Hyoeun K, Yong-Nan X, Young-Tae H, Xiang-Shun C, Nam-Hyung K, Jeong SO. 2013. Greatwall kinase is required for meiotic maturation in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **89**:1-7.
- Yokoo M, Kimura N, Sato E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development* **56**:15-19.
- You X, Chen Z, Zhao H, Xu Ch, Liu W, Sun Q, He P, Gu H, Ni X. 2017. Endogenous hydrogen sulfide contributes to uterine quiescence during pregnancy. *Reproduction* **153**:535-543.
- Zeleznik AJ. 2004. Dynamics of primate follicular growth: a physiological perspective. Pages 45-53 in: Leung PKC, Adashi EY, editors. *In The Ovary*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. 2010. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* **330**:366-369.
- Zhao S, Liu ZX, Gao H, Wu Y, Fang Y, Wu SS, Li MJ, Bai JH, Liu Y, Evans A, Zeng SM. 2015. A three-dimensional culture system using alginate hydrogel prolongs hatched cattle embryo development invitro. *Theriogenology* **84**:184-192.
- Zhu J, Marchant RE. 2011. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices* **8**:607-626.