

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V  
NITRE  
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED A  
INFORMATIKY**



***In vitro* produkcia embryí**

RNDr. Alexandra Rosenbaum Bartková, PhD.  
prof. RNDr. František Strejček, PhD.

**NITRA 2023**

## **Názov publikácie: *In vitro* produkcia embryí**

Edícia Prírodovedec č. 828

### **Autori:**

RNDr. Alexandra Rosenbaum Bartková, PhD.  
prof. RNDr. František Strejček, PhD.

### **Recenzenti:**

prof. Ing. Peter Chrenek, DrSc.

Odbor genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat; Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum; Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky Slovenská republika

prof. MVDr. Massányi Peter, DrSc.

Katedra fyziológie živočíchov; Ústav aplikovanej biológie; Fakulta biotechnológie a potravinárstva; Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre; Tr. A. Hlinku 2; 94976 Nitra; Slovenská Republika

Rukopis bol schválený Edičnou komisiou FPVaI UKF v Nitre s odporúčaním zaradenia do kategórie vedecká monografia.

Edícia: Prírodovedec č. 828

Prvé vydanie, 2023

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou

Publikácia bola vytvorená v rámci projektu KEGA č. 039UKF-4/2021 Biologické študijné inovácie.

Vydala: © FPVaI UKF v Nitre, 2023

ISBN 978-80-558-2100-9

# Obsah

<b>Zoznam skratiek.....</b>	<b>6</b>
<b>Predslov.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Gametogenéza .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Oocyt.....</b>	<b>12</b>
2.1 Funkcie oocytu.....	14
2.2 Proces vzniku oocytu.....	16
2.2.1 Oogenéza .....	17
2.2.2 Folikulogenéza.....	21
2.3 Regulácia meiotickej maturácie <i>in vivo</i> .....	25
2.3.1 Regulácia meiotickej maturácie oocytov.....	25
2.3.2 Regulácia folikulárneho rastu .....	27
2.4 <i>In vitro</i> maturácia oocytov .....	29
2.4.1 Maturačné média .....	31
2.4.2 Vplyv maturačných médií na <i>in vitro</i> maturáciu .....	33
2.5 Kvalita oocytu.....	36
2.5.1 Spôsoby hodnotenia oocytárnej kvality.....	37
2.5.2 Vplyv vitálnej selekcie na <i>in vitro</i> maturáciu oocytov .....	41
2.5.3 Vplyv vitálnej selekcie na cytoplazmatické dozrievanie oocytov .....	43
2.5.4 Vplyv vitálnej selekcie na detekciu apoptózy .....	46
2.5.5 Vplyv vitálnej selekcie na expresiu génov .....	48
2.5.6 Vplyv vitálnej selekcie na proteomický profil oocytov.....	50
<b>3. Oplodnenie .....</b>	<b>52</b>
3.1 Morfológické aspekty oplodnenia.....	53
3.2 Aktivácia oocytov .....	55
3.2.1 Aktivácia oocytov <i>in vivo</i> .....	55
3.2.1.1 Spermatiké faktory .....	56

3.2.1.2 Faktory oocyty .....	59
3.2.2 Aktivácia oocytov <i>in vitro</i> .....	62
3.3 Formovanie prvojadier .....	65
3.3.1 Rozdiely medzi prvojadrami .....	67
<b>4. Embryogenéza .....</b>	<b>70</b>
4.1 Ryhovanie.....	71
4.1.1 Typy embryonálneho ryhovania.....	72
4.2 Implantácia a gastrulácia.....	74
4.3 Organogenéza .....	75
4.4 Finálny vývoj plodu a narodenie.....	75
4.5 Morfológia embryí ošípanej.....	76
4.6 Regulácia embryogenézy .....	79
4.6.1 Cyklíny (CDKs).....	79
4.6.2 Rastové faktory.....	81
4.6.3 Hormóny.....	87
4.7 Regulácia embryogenézy <i>in vitro</i> .....	90
4.7.1 Kultivačné média v rámci IVP .....	91
4.7.2 Vplyv maturačných médií na ranú embryogenézu .....	93
4.7.3 Vplyv vitálnej selekcie na ranú embryogenézu.....	95
4.7.4 Vplyv maturačného média na načasovanie delivosti.....	96
4.7.5 Vplyv maturačného média na aktiváciu embryonálneho genómu..	97
4.7.6 Vplyv maturačného média na formovanie jadriek embryí .....	98
4.7.7 Vplyv maturačného média na transkriptomický profil embryí ...	100
<b>5. Zmeny organel v procese IVP .....</b>	<b>103</b>
5.1 Jadro.....	104
5.1.1 Jadro oocytov .....	106
5.2 Jadierko.....	108

5.2.1 Dynamika jadierka.....	110
5.3 Jadierkové proteíny .....	112
5.4 Stanovenie relatívneho obsahu proteínov jadierka .....	121
<b>Záver .....</b>	<b>123</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>124</b>
<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>125</b>

## Zoznam skratiek

3 $\beta$ -HSD3	$\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza
6-DMAP	6-dimetylaminopurín
ADP	adenozíndifosfát
AMH	Anti-Müllerov hormón
APC/C	anafázu podporujúci komplex - cyklozóm
ATP	adenozíntrifosfát
AURKA	Aurora kináza A
BCB	brilantná krezylová modrá
BDNF	neurotrofický faktor odvodený od mozgu
BMP15	kostný morfogenetický proteín 15
BSA	hovädzí sérový albumín
Bub1	serín/treonín proteínkináza BUB1(budding uninhibited by benzimidazole 1)
CamKII	kalmodulín dependetná kináza II
cAMP	cyklický adenzínmonofosfát
CCs	kumulárne bunky
CDC25	fosfatáza 25 regulujúca cyklus bunkového delenia
CDK1	cyklín dependetná kináza 1
cGMP	cyklický guanozínmonofosfát
COCs	kumulus-oocytárne komplexy
CSF	cytostatický faktor
Cx	konexín
DFC	denzné fibrilárne komponenty
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA metyltransferáza
E2	estradiol
EGA	aktivácia embryonálneho genómu
EGF	epidermálny rastový faktor
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora
Emi2	skorý mitotický inhibítor 2
ESCs	embryonálne kmeňové bunky
FBS	fetálne bovinné sérum
FC	fibrilárne centrá
FCS	fetálne teľacie sérum
FDA	fluoresceíndiacetát
FGF2	fibroblastový rastový faktor 2
FSH	folikuly stimulujúci hormón
G6PDH	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza

GC	granulárne komponenty
GCs	granulózne bunky
GDF9	rastový diferenciačný faktor 9
GnRH	gonadotropín uvoľňujúci hormón
GPR3	receptor 3 spojený s G proteínom
GTP	guanozíntrifosfát
GV	zárodočný vačok
GVBD	rozpad zárodočného vačku
H2a-H4	históny 2a-4
H2AX	histón
HAS	ľudský sérový albumín
HCG	ľudský choriový gonadotropín
ICSI	intracytoplazmatická injekcia spermií
IGF-1	inzulínu podobný rastový faktor
IGFBP	väzbový proteín pre inzulínu podobný rastový faktor
IGS	intergénový spacer
IP3	inozitol 1,4,5 trifosfát
IP3R	inozitol 1,4,5 trifosfát receptor
LH	luteinizačný hormón
LHR	receptor luteinizačného hormónu
LIF	leukemický inhibičný faktor
Mad1-2	proteíny s deficitom mitotického zastavenia 1-2
MAPK	mitogén aktivovaná proteínkináza
MCC	mitotický kontrolný bod
MEK	mitogén aktivovaná proteínkináza kináza
MPF	maturáciu podporujúci faktor
MPGF	rastový faktor samčieho prvojadra
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
Myt	myelínový transkripčný faktor
NGF	nervový rastový faktor
NLB	fibrilárna sféra oocytov v štádiu GV (nucleolus like body)
NOR	oblasť organizácie jadierka
NPB	fibrilárna sféra v štádiu zygoty a skorých embryí (nucleolus like body)
NPPC	natriuretický peptidový prekursor typu C
NPR2	natriuretický peptidový receptor
NSN	neobklopené jadro
OSF	oocytmi sekretované faktory
PAWP	WWP doména viažuci proteín
PB	pólové teliesko
PCOS	syndróm polycystických ovárií
PDE3A	fosfodiesteráza 3A

PDGF	rastový faktor odvodený od krvných doštičiek
PGC	primordiálne zárodočné bunky
PGC7	proteín súvisiaci s vývojom pluripotenciou 7
PGE2	prostaglandín E2
PGT	preimplantačné genetické testovanie
PI	propídium jodid
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PIC	preiniciačný komplex
PIP2	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKB	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PLC $\zeta$	fosfolipáza C zeta
PLK1	polo-like kináza 1
PMCA	ATPáza plazmatickej membrány Ca <sup>2+</sup>
PMSG	konský sérový gonadotropín
POI	predčasná ovariálna insuficiencia
PPP1R12C	12C proteínovej fosfatázy 1
PTEN	fosfatáza a tenzínový homológ
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová aktivácia
PTGS2	prostaglandín-endoperoxid syntáza 2
RNA	ribonukleová kyselina
rDNA	ribozomálna DNA
rRNA	ribozomálna RNA
SAC	kontrolný bod vretienka
SC	synaptonemálny komplex
Shh	Sonic hedgehog
SMAD	materálny supresorový antidekapentaplegický proteín
SN	obklopené jadierko
StAR	steroidogénny akútny regulačný proteín
TF-IC	transkripčný iniciačný faktor
TGF- $\alpha$	transformujúci rastový faktor alfa
TGF $\beta$	transformujúci rastový faktor $\beta$ Thr treonín
TNFAIP6	tumor nekrotizujúci proteín 6 indukovaný nádorovým nekrotickým faktorom $\alpha$
TTF1	transkripčný terminátorový faktor 1
Tyr	tyrozín
UBF	upstream väzbový transkripčný faktor
VEGF	vaskulárny endoteliálny rastový faktor
Wee1B	Wee1-like protein kináza 2
ZP1-3	glykoproteíny zona pellucida
$\gamma$ H2AX	fosforylovaná forma histónu H2A



## Predslov

Oblasť molekulárnej biológie a embryológie predstavujú neoddeliteľnú súčasť neustále sa rozvíjajúcich biologických vied. Vedci sa každý deň ponárajú do odhaľovania záhad obklopujúcich základné aspekty života s cieľom pochopiť zložité mechanizmy, ktoré riadia ich vývoj a progresiu. Od génovej aktivity až po zložité bunkové spojenia, tieto oblasti poskytujú nový pohľad na základy života.

V oblasti molekulárnej biológie, konkrétne embryológie, je výskum a zber výsledkov nanajvyš dôležitý. Schopnosť zhromažďovať presné a spoľahlivé údaje je rozhodujúca pre pokrok nie len v našom chápaní jednotlivých molekulárnych procesov, ale aj v celkovom rozvoji výskumníkov, ktorí sú vlastnou praxou schopní odovzdávať aktuálne poznatky.

V rámci nášho výskumu sa zameriavame na molekulárne aspekty *in vitro* maturácie oocytov a následnej ranej embryogenézy cicavcov. Naším cieľom je objasnenie základných molekulárnych procesov a zvýšenie úspešnosti *in vitro* produkcie embryí (IVP). IVP je aktuálne neoddeliteľnou súčasťou biotechnológií a techník asistovanej reprodukcie, ktorá poskytuje nádej párom s diagnostikovanou primárnou resp. sekundárnou neplodnosťou, ženám so syndrómom polycystických vaječníkov alebo po prekonaní onkologického ochorenia.

Táto monografia je výsledkom výskumnej činnosti tímu kolegov, ktorá Vás ponorí do podmanivej oblasti molekulárnej biológie a embryológie. Objasní ich dôležitosť, vzájomnú prepojenosť a aktuálny pokrok dosiahnutý v týchto disciplínach. Okrem teoretického prehľadu poskytuje daná monografia aj zber našich aktuálnych výsledkov a zahŕňa širokú škálu techník vrátane analýzy génovej expresie, mikromanipulácie a zobrazovacích metód, ktorým sa v rámci nášho výskumu venujeme.

Veríme, že táto monografia poskytne nielen aktuálne poznatky zo sledovanej problematiky, ale bude hlavne prínosom pre celú vedeckú komunitu zaoberajúcou sa molekulárnou biológiou a embryológiou.

Týmto spôsobom by sme taktiež radi poďakovali našim kolegom, ktorí sa podieľali nie len na podpore spoločnej výskumnej činnosti, ale aj na umožnení nášho pôsobenia na viacerých medzinárodných zahraničných výskumných inštitúciách.

**ALEXANDRA ROSENBAUM BARTKOVÁ**  
&  
**FRANTIŠEK STREJČEK**

## 1. Gametogenéza

U pohlavne sa rozmnožujúcich druhov dochádza k vytvoreniu nového organizmu fúziou dvoch špecializovaných buniek, nazývaných gaméty. Gaméty sú haploidné bunky, čo znamená, že nesú jednu sadu chromozómov ( $1n$ ). Keďže pohlavne sa rozmnožujúce organizmy sú tvorené z diploidných buniek (každá bunka obsahuje dve sady chromozómov), fúzia týchto dvoch gamét obnoví normálny počet diploidných chromozómov ( $2n$ ). Gaméty sa tvoria počas citlivého a vysoko regulovaného procesu nazývanom gametogenéza (Saitou, Miyauchi, 2016; Saitou, Hayashi, 2021).

Gametogenéza je proces, pri ktorom dochádza ku vzniku pohlavných buniek, gamét, a je považovaná za prvý krok v reprodukcii. Na začiatku je charakterizovaná prítomnosťou prvotných zárodočných buniek, gametogónií, ktoré sa transformujú na špecializované bunky a to samičie pohlavné bunky, oocyty a samčie pohlavné bunky, spermie (Yamashiro *et al.*, 2020).

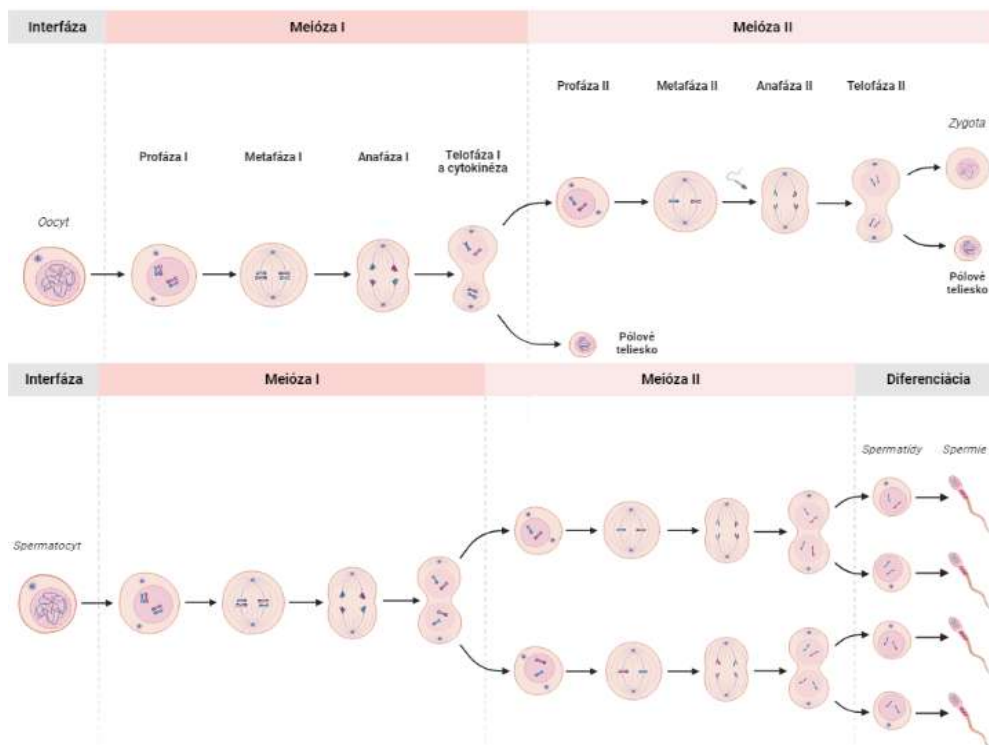
Produkcija životaschopných a funkčných gamét je nevyhnutná pre úspešnú reprodukciu a pokračovanie druhu. Vďaka hlbšiemu pochopeniu gametogenézy cicavcov môžeme získať prehľad o zložitosti reprodukcie a potenciálne vyvinúť nové stratégie na riešenie problémov neplodnosti u ľudí, prípadne u zvierat. U cicavcov prebieha gametogenéza v gonádach, semenníkoch a vaječníkoch, a preto proces gametogenézy zahŕňa dva odlišné procesy: spermatogézu a oogenézu (Obr.1) (L'Hernault, 2006; Martin, 2008; Kupriyanova, Safronova, 2022).

Spermatogenéza je proces produkcie oplodnenia schopných spermií. Zahŕňa niekoľko štádií vrátane mitózy, meiózy a spermiogenézy. Počas mitózy dochádza k rozdeleniu bunkového jadra, v ktorom dochádza k zdvojeniu genetickej informácie a tvorbe diploidných buniek, spermatogónií. Meióza je typ bunkového delenia, ktorý znižuje počet chromozómov o polovicu a jej výsledkom je vznik haploidných buniek, nazývaných primárne spermatocyty. Tieto primárne spermatocyty následne podstupujú meiózu I za vzniku dvoch sekundárnych spermatocytov, ktoré vstupujú do meiózy II za vzniku štyroch haploidných spermatíd. Spermatídy potom prechádzajú procesom nazývaným spermiogenéza, počas ktorého sa diferencujú na zrelé spermie. Spermiogenéza je posledným štádiom spermatogenézy, kde sa okružle spermatídy diferencujú, čo zahŕňa tvorbu akrozómu, ktorý obsahuje enzýmy potrebné na oplodnenie a vývoj bičika potrebného pre motilitu. Konečným výsledkom je zrelá spermia, ktorá je schopná oplodniť vajíčko. Celý proces spermatogenézy trvá u človeka približne 64-72 dní. Tento proces sa vyskytuje v semenných tubuloch

semenníkov a je regulovaný rôznymi hormónmi, vrátane testosterónu a folikuly stimulujúceho hormónu (FSH) (Manku, Culty, 2015; Hermo *et al.*, 2018).

Oogenéza je proces produkcie oocytov. Zahŕňa tiež niekoľko štádií, vrátane mitózy, meiózy I, meiózy II a súbežne prebiehajúcej folikulogenézy. Počas mitózy sa zárodočné bunky delia a produkujú primárne oocyty, ktoré vstupujú do meiózy I. V tomto štádiu je oogenéza zastavená až do dosiahnutia štádia pohlavnej dospelosti. V každom menštruačnom cykle dochádza v jednom primárnom oocyte k obnoveniu meiózy I za vzniku sekundárneho oocytu a pólóvého telieska prostredníctvom cytokinézy. Ak počas ovulácie nastane oplodnenie, tak dochádza k dokončeniu meiózy II.

Počas oogenézy sú oocyty uzavreté v štruktúrach známych ako folikuly. Folikuly poskytujú podporu a výživu vyvíjajúcemu sa oocytu, kým nie je pripravený na ovuláciu. Jedným z aspektov oogenézy je tvorba pólóvých teliesok, čo sú malé bunky, ktoré sú „vedľajšími produktmi“ meiózy. Celkovo je proces oogenézy nevyhnutný pre reprodukciu u cicavcov a zohráva kľúčovú úlohu pri zabezpečení prežitia budúcich generácií (Bukovsky *et al.*, 2005; Manku, Culty, 2015).



Obrázok č. 1: Gametogenéza  
(Zdroj: Alexandra R.Bartková, 2023)

## 2. Oocyt

Samičia reprodukčná sústava predstavuje zložitý a prísne regulovaný systém zodpovedný za produkciu pohlavných buniek schopných produkcie potomstva. Primárnymi orgánmi samičieho reprodukčného systému sú vaječníky, v ktorých dochádza k produkcii vajíčok (*oocytov*), ktoré sú po ovulácii transportované vajcovodmi do maternice, kde v prípade oplodnenia dochádza k uhniedzenu embrya (Williams, 2002).

Oocyt teda možno charakterizovať ako haploidnú samičiu pohlavnú bunku, ktorá zohráva kľúčovú úlohu v rámci reprodukcie. Oocyt patrí medzi sférické bunky, pričom platí, že zrelé cicavčie oocyty sú najväčšie bunky v samičom tele. V priemere dosahujú veľkosť v rozmedzí 70-130  $\mu\text{m}$  v závislosti od živočíšneho druhu (Wassarman, 2013; Levi *et al.*, 2013).

Štruktúra oocytov je rovnaká ako v prípade eukaryotických buniek (Obr.2). Tieto sférické bunky sú obklopené ochrannou vrstvou nazývanou *zona pellucida*. *Zona pellucida* slúži ako bariéra a skladá sa z glykoproteínov známych ako *zona pellucida* glycoprotein 1-3 (ZP1, ZP2, ZP3). Tieto proteíny sú vylučované samotným oocytom, pričom ZP1 je najväčší proteín, ktorý tvorí základ *zona pellucida*. ZP2 a ZP3 sú zodpovedné za sprostredkovanie interakcie pohlavných buniek počas oplodnenia. Pod *zona pellucida* sa nachádza tzv. perivitelinový priestor. V ňom je možné lokalizovať mikrokľky a cytoplazmatické výbežky folikulárnych buniek (Malinský, Lichnovský, Michalíková, 2004). Oocyt je obklopený cytoplazmatickou membránou, selektívne priepustnou bariérou, ktorá oddeľuje vnútorné bunkové prostredie od extracelulárneho prostredia. Pozostáva z fosfolipidovej dvojvrstvy, v ktorej sú uložené rôzne proteíny ako sfingomyelín a cholesterol, ktoré prispievajú k stabilite membrány.

Vo vnútri oocytu sa nachádzajú početné organely, ktoré sú nevyhnutné pre jeho funkciu. Jednou z týchto organel sú mitochondrie, ktoré bunke poskytujú energiu produkciou adenosíntrifosfátu (ATP), kontrolou  $\text{Ca}^{2+}$  a redoxnej homeostázy. Oocyt tiež obsahuje ribozómy, ktoré sú zodpovedné za syntézu proteínov, a endoplazmatické retikulum, ktoré hrá úlohu v metabolizme lipidov. Zásoby lipidov a mastných kyselín prispievajú k tvorbe energie. Predpokladá sa, že oocytárne mastné kyseliny sú zdrojom metabolitov na produkciu energie, čo dokazuje inhibícia  $\beta$ -oxidácie počas dozrievania oocytov. Oocyty tiež obsahujú fosfolipidy a cholesterol, ktoré sú dôležité pre tvorbu membrán potrebných na opakované bunkové delenie v rámci ranej embryogenézy. Niektoré lipidy sú uložené vo vezikulách. Vezikuly sú malé

membránovo viazané štruktúry podieľajúce sa na rôznych bunkových procesoch, ako je intracelulárny transport, prenos signálu a komunikácia medzi bunkami. Vezikuly sú často úzko spojené s endoplazmatickým retikulom, pričom niektoré okrem lipidov obsahujú amorfný a membránový materiál,  $\text{Ca}^{2+}$  resp. N-acetylgalaktosamín (dé Avila, Silveira, 2019; Kirillova *et al.*, 2021).

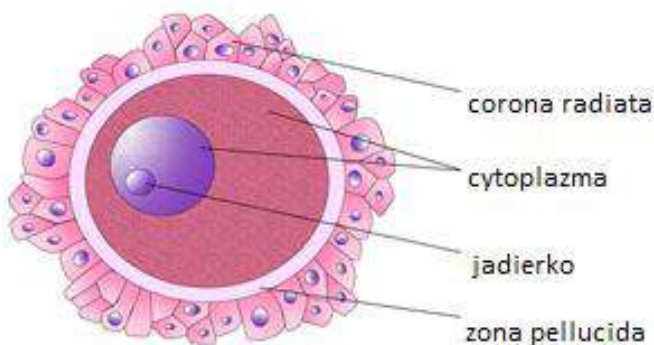
Endoplazmatické retikulum možno charakterizovať ako hrubé endoplazmatické retikulum (RER) a hladké endoplazmatické retikulum (SER). RER je charakteristický svojim posiatym vzhľadom v dôsledku prítomnosti ribozómov pripojených k jeho povrchu. Tieto ribozómy hrajú kľúčovú úlohu pri syntéze proteínov, ktoré sú buď určené na sekréciu alebo na začlenenie do bunkovej membrány. Na rozdiel od RER nemá SER na svojom povrchu ribozómy, čo mu dodáva hladký vzhľad. SER v oocytoch sa primárne podieľa na metabolizme lipidov a syntéze steroidných hormónov. Obsahuje enzýmy zodpovedné za syntézu lipidov vrátane fosfolipidov a cholesterolu, ktoré sú kľúčové pre tvorbu bunkových membrán a produkciu steroidných hormónov (Voeltz, Rolls, Rapoport, 2002; Goetz, Nabi, 2006).

Golgiho aparát v oocytoch, rovnako ako v iných typoch buniek, pozostáva zo série sploštených, na sebe naskladaných váčkov nazývaných cisterny. Tieto cisterny sú vzájomne prepojené a tvoria komplexnú sieť v cytoplazme blízko bunkového jadra. Počet a usporiadanie cisterien sa môže líšiť v závislosti od štádia vývoja oocytov a konkrétneho druhu. Jeho primárnou úlohou je syntéza a modifikácia glykoproteínov a proteoglykánov, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri dozrievaní oocytov, oplodnení a ranom embryonálnom vývoji. Okrem glykozylácie sa Golgiho aparát v oocytoch podieľa na tvorbe kortikálnych granúl. Tieto membránovo viazané organely sa nachádzajú v kôre, ktorá je najvzdialenejšou oblasťou oocytu. Kortikálne granuly majú u ľudí priemer od 300 do 400 nm. Počas dozrievania oocytov podliehajú podstatným distribučným zmenám (McGinnis *et al.*, 2018). Po oplodnení uvoľňujú kortikálne granuly svoj obsah do perivitelínneho priestoru, čím vytvárajú ochrannú bariéru, ktorá zabraňuje prenikaniu ďalších spermí do oocytu. Tento proces, známy ako kortikálna reakcia, zabezpečuje úspešnú fúziu jedinej spermie s oocytom a zabraňuje tvorbe polyploidných embryí (Chabin-Brion *et al.*, 2001; Liu, 2011; Yi *et al.*, 2019).

Lamelárne štruktúry sú jedinečné membránové kompartmenty zložené z naskladaných membrán usporiadaných do lamelárneho alebo rúrkového vzoru. Presná funkcia lamelárnych štruktúr v cytoplazme oocytov nie je úplne objasnená. Štúdie však naznačujú, že tieto štruktúry môžu hrať úlohu pri

transporte a skladovaní rôznych molekúl, vrátane proteínov a lipidov, pričom sa môžu podieľať aj na regulácii bunkových procesov počas maturácie oocytov a skorého embryonálneho vývoja (Liu, 2011).

Oocyt tiež obsahuje veľké jadro, ktoré sa nazýva aj zárodočný vezikul (GV). V jadre je uložený genetický materiál bunky a aj jadierko. Okrem týchto organel nájdeme v cytoplazme uložené aj kruhové lamely tvorené skupinami paralelných cisterien. Ich funkcia nie je zatiaľ objasnená, ale predpokladá sa, že vznikli delamináciou jadrovej membrány resp. endoplazmatického retikula (Mao *et al.*, 2017; Almonacid *et al.*, 2018).



*Obrázok č. 2: Oocyt*  
(Zdroj: Wilhelmová *et al.*, 2020)

## 2.1 Funkcie oocytu

Oocyty ako samičie pohlavné bunky slúžia predovšetkým na to, aby sa podieľali na oplodnení a zabezpečovali produkciu potomstva. Okrem toho však majú aj inú funkciu a to pri tvorbe pohlavných hormónov. Na základe nedávnych zistení možno oocyty taktiež označiť ako za regulátory diferenciácie a aktivácie granulóznych buniek (GCs) prostredníctvom produkcie a uvoľňovania rastových faktorov. Zistilo sa, že faktory vylučované oocytmi modulujú bunkový osud somatických granulóznych buniek, ako aj kvalitu a vývinovú kompetenciu oocytov (Gilchrist, Lane, Thompson, 2008; Belli, Shimasaki, 2018).

Centrálne oocytárne regulácie zamerané na funkciu folikulárnych buniek zohráva rozhodujúcu úlohu v regulácii oogenézy, rýchlosti ovulácie a plodnosti. Dochádza k nej práve na základe sekrécie rozpustných rastových faktorov, oocytmi sekretovaných faktorov (OSF), ktoré pôsobia na susedné

folikulárne bunky a regulujú široké spektrum funkcií GCs a kumulárnych buniek (CCs).

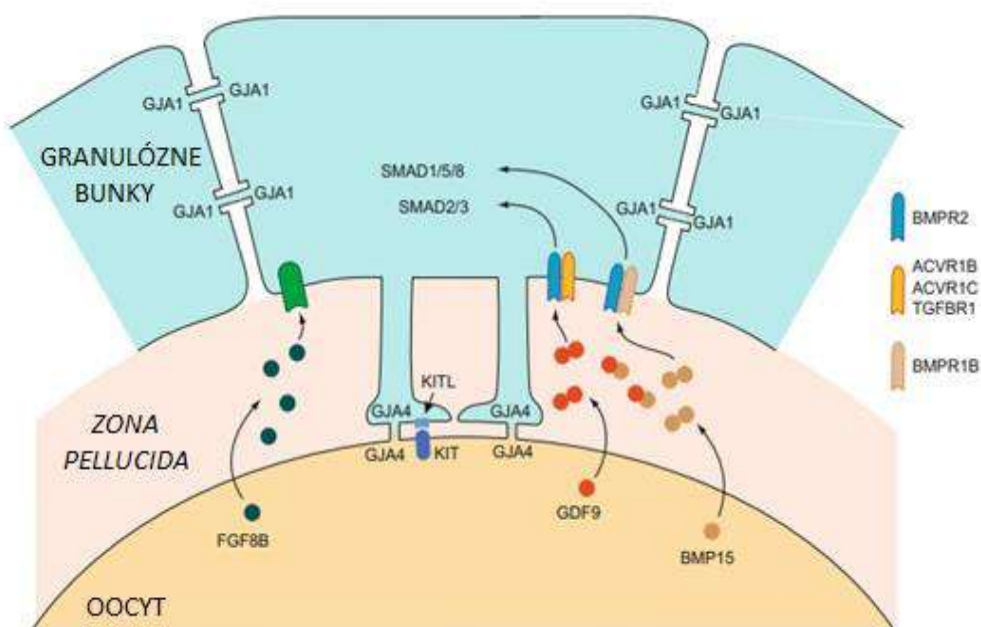
Oocyt ako vysoko špecializovaná bunka produkuje rastový diferenciačný faktor 9 (GDF9) a kostný morfogenetický proteín 15 (BMP15), ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii funkcie vaječníkov. Tieto faktory modulujú funkciu buniek granulózy, ovplyvňujú vývoj folikulov, dozrievanie oocytov a ovuláciu. GDF9 a BMP15 sú členmi superrodiny transformujúceho rastového faktora beta (TGF- $\beta$ ) a sú primárne produkované oocytmi v ovariálnych folikuloch. Tieto faktory hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii funkcie granulóznych buniek. Ukázalo sa, že GDF9 podporuje proliferáciu granulóznych buniek, zatiaľ čo BMP15 sa podieľa na regulácii diferenciácie granulóznych buniek. Interakcia medzi GDF9 a BMP15 s granulóznymi bunkami je sprostredkovaná rôznymi signálnymi dráhami. Jednou z takýchto dráh je dráha PI3K/Akt, ktorá sa podieľa na synergickom nábore koaktivátora p300 v oblasti promotora anti-Müllerovho hormónu (AMH). Tento nábor vedie k acetylácii histónu 3 lyzínu 27 (H3K27ac), čo uľahčuje expresiu AMH (Paulini, Melo, 2011; Belli, Shimasaki, 2018; Roy *et al.*, 2018).

V rámci procesu luteinizácie je možné sledovať premenu granulóznych buniek na luteálne bunky, ktoré sú zodpovedné za produkciu progesterónu. Tento proces spúšťa luteinizačný hormón (LH) vylučovaný hypofýzou. Nedávne štúdie však ukázali, že oocyt práve produkciou GDF9 a BMP15 taktiež zohráva kľúčovú úlohu pri luteinizácii buniek granulózy. Vylúčenie oocytu resp. jeho izolácia vedie k rýchlejšej luteinizácii granulóznych buniek, ktorá sa prirodzene prejavuje až po ovulácii (Field *et al.*, 2014).

Prostredníctvom obojsmernej interakcie medzi bunkami oocytu a granulózy nastáva ovplyvňovanie rastu a maturácie oocytov prostredníctvom aktivínu a inhibínu, ktoré sú produkované granulóznymi bunkami a k regulácii granulóznych buniek prostredníctvom GDF9 a BMP15, ktoré sú produkované oocytom. Táto obojsmerná komunikácia je obzvlášť dôležitá počas luteinizácie (Obr.3). Štúdie ukázali, že oocyt hrá kľúčovú úlohu pri podpore diferenciácie granulóznych buniek na luteálne bunky. To sa dosahuje sekréciou faktorov ako je GDF9, ktorý podporuje expresiu markerov luteálnych buniek ako je StAR (steroidogénny akútny regulačný proteín) a 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza) (Paulini, O Melo, 2011; Belli, Shimasaki, 2018).

GDF9 a BMP15 majú významný vplyv aj na funkciu vaječníkov, konkrétne regulujú vývoj folikulov a ovuláciu. Štúdie ukázali, že GDF9 a BMP15 ovplyvňujú kvalitu a vývinovú kompetenciu oocytov. Tieto faktory podporujú

produkcii vysoko kvalitných oocytov reguláciou expzie génov podieľajúcich sa na dozrievaní a oplodnení oocytov. V rámci klinického významu sú tieto poznatky dôležité z hľadiska ich potenciálu v podobe diagnostických markerov a terapeutických cieľov pre rôzne reprodukčné poruchy. Dysregulácia týchto faktorov bola spojená so stavmi, ako je syndróm polycystických ovárií (PCOS) a predčasná ovariálna insuficiencia (POI). Pochopenie mechanizmov, ktorými GDF9 a BMP15 regulujú funkciu granulóznych buniek, by mohlo viesť k vývoju nových diagnostických nástrojov a cielených terapií pre tieto stavy (Roy *et al.*, 2018; Belli, Shimasaki, 2018).



Obrázok č. 3: Signálna dráha komunikácie oocytu s bunkami granulózy  
(Zdroj: Upravené Swain, Pool, 2008)

## 2.2 Proces vzniku oocytu

Oocyty vznikajú počas gametogenézy. U samíc však možno definovať dva navzájom súvisiace procesy a to oogenézu a folikulogenézu. Oogenéza prebieha vo vaječníkoch a býva zahájená už počas vývoja plodu, kedy dochádza k migrácii primordiálnych zárodočných buniek a kolonizácii genitálnych hrebeňov. Počas oogenézy zohrávajú folikuly zásadnú úlohu pri



podpore a výžive vyvíjajúcich sa oocytov. Folikulogenéza sa týka rastu a vývoja ovariálnych folikulov, ktoré obsahujú dozrievajúce oocyty.

### 2.2.1 Oogenéza

Oogenéza je zložitý proces, ktorý zahŕňa vývoj jedinej haploidnej bunky, oocytu. Tento proces vyžaduje sériu riadených a regulovaných udalostí počas dlhšieho obdobia s cieľom formácie kompetentnej bunky. Počas oogenézy možno charakterizovať tri štádia a to štádium množenia, rastu a zrenia (Bukovsky *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2008; Virant-Klun, 2015).

Štádium množenia je zahájené v prenatalnej fáze vývoja jedinca. Počas vývoja plodu dochádza v zárodočnom epiteli k proliferácii buniek rôzneho typu a jedným z nich sú aj primordiálne zárodočné bunky (PGCs) vznikajúce zo zadného epiblastu. Proliferácia a následná migrácia PGCs zo žltkového vaku vedie ku kolonizácii genitálnych hrebeňov, kde dochádza k diferenciacii PGCs do podoby oogónií. Oogónie sú prekurzorové bunky, z ktorých vznikajú oocyty. Sú lokalizované v zárodočnom epiteli na povrchu vaječníkov, kde podliehajú niekoľkonásobnému mitotickému deleniu (Grive, Freiman 2015). Počas delenia migrujú do hlbších častí vaječníkov, kde vytvárajú zhľuky, ktoré je možné vizualizovať pomocou prítomnosti synaptonemálnych komplexov (charakteristický znak homológnych chromozomálnych synapsí). Zhľuky zárodočných buniek (tzv. hniezda) obsahujú mnohopočetné oogónie ohraničené somatickými bunkami. Oogónie rastú a diferencujú sa na oocyty I. rádu, kedy dochádza k prechodu z mitotického delenia na meiotické delenie. Somatické bunky sa diferencujú na granulózne bunky a spoločne s oocytom vytvárajú primordiálny folikul. V tomto štádiu oocyt podlieha meiotickému deleniu, ktoré je zastavené v diploténnom štádiu meiotickej profázy I, až do dosiahnutia pohlavnej dospelosti, ktorá je sprevádzaná prudkým nárastom LH (luteinizačný hormón) v strede cyklu. Približne v čase narodenia je v primordiálnom folikule uložený oocyt obklopený jednou vrstvou granulóznych buniek, ktoré sú medzi sebou pospájané prostredníctvom vytvárania bunkových adhézných komplexov. Mork *et al.* (2012) popísal, že oocyty a granulózne bunky exprimujú viaceré funkčné proteíny ako nektíny a kadheríny, ktoré sú charakteristické práve pre vytvorenie adhézných spojov. V tomto ranom štádiu exprimujú oocyty hlavne E-kadherín, pričom bunky granulózy exprimujú N-kadherín. To znamená, že intracelulárne komplexy sú heterotypické. Absencia desmozómov uľahčuje zmeny v asociácii medzi oocytmi a granulóznymi bunkami počas rastovej fázy.

Zahájením rastovej fázy dochádza v oocyte k enormnému nárastu objemu. Tento nárast odráža akumuláciu organel, messengerovej ribonukleovej kyseliny (mRNA) a proteínov, ktoré podporujú štádium skorej embryogenézy po možnom oplodnení (Sanchez, Smitz 2012). Rastúci oocyt taktiež podlieha veľkým ultraštruktúrnym zmenám, ktorých základnou úlohou je zabránenie polyspermatického oplodnenia, vytvorenie špecifických vzorov DNA metylácie, akumulácia proteínov zahrnutých v kontrole translácie mRNA do subkortikálneho komplexu (Stewart *et al.*, 2015).

Počas rastu oocytov dochádza k zahájeniu rastu folikulov v procese nazývanom folikulogenéza. Zmenou dlaždicového tvaru granulóznych buniek obklopujúcich oocyt na kubický dochádza k zahájeniu mitotického delenia (Da Silva-Buttkus *et al.*, 2008). V tomto štádiu dochádza k zmene primordiálneho folikulu na primárny. Ak oocyt naďalej rastie, tak aj granulózne bunky sa množia až pokrývajú celý rozširujúci sa povrch oocytu niekoľkými vrstvami. Počas pokračujúceho rastu oocytu dochádza k vytvoreniu dutiny, *antrum*, ktorá je vyplnená tekutinou. V tomto štádiu sa aj granulózne bunky začínajú rozlišovať do dvoch skupín a to:

- kumulárne bunky obklopujúce oocyt,
- granulózne bunky lemujúce stenu folikulu.

Posledná fáza vývinu oocytov sa nazýva meiotická maturácia (Conti *et al.*, 2012; Coticchio *et al.*, 2015). Maturácia resp. dozrievanie oocytov je rozhodujúci proces vo vývoji samičích reprodukčných buniek. Je to konečná fáza oogenézy, počas ktorej oocyt podlieha celému radu zmien, ktoré ho pripravujú na oplodnenie a následný embryonálny vývoj. V tomto štádiu dochádza k dokončeniu nie len prvého meiotického delenia, ale aj sprievodných procesov nevyhnutných pre následné oplodnenie a embryogenézu. Maturáciu oocytu môžeme rozdeliť do troch procesov a to jadrové, cytoplazmatické a epigenetické dozrievanie.

Počas maturácie oocytov dochádza k významným jadrovým zmenám, ktoré sú kľúčové pre úspešné oplodnenie a embryonálny vývoj. Jadrové dozrievanie zahŕňa sériu komplexných dejov vrátane kondenzácie chromatinu, rozpadu zárodočných vezikúl (GVBD) a progresie z metafázy I (MI) do štádia metafázy II (MII). Tieto jadrové zmeny sú prísne regulované a zohrávajú dôležitú úlohu pri zabezpečovaní správneho oocytárneho vývinu.

Jednou z kľúčových jadrových zmien počas jadrového dozrievania oocytov je kondenzácia chromatinu. Pred zrením je chromatín v oocyte v dekonenzovanom stave, ktorý je známy ako zárodočný vezikul (GV). S nárastom LH oocyt podlieha GVBD, čo znamená iniciáciu kondenzácie

chromatínu. Tento proces zahŕňa zhutňovanie chromatínových vlákien, výsledkom čoho je vysoko kondenzovaná štruktúra. Kondenzácia chromatínu je nevyhnutná z niekoľkých dôvodov. Po prvé, uľahčuje správne zarovnanie a segregáciu chromozómov počas meiózy. Ako oocyt postupuje zo štádia MI do štádia MII, kondenzovaný chromatín sa vyrovnáva a zoraďuje do metafázovej platničky, čím sa zabezpečuje presná segregácia chromozómov počas následného delenia (Smith, 2001; Sharma *et al.*, 2018).

Okrem toho chromatínová kondenzácia tiež hrá úlohu pri ochrane genetického materiálu oocyty. Vysoko kompaktná chromatínová štruktúra poskytuje stabilitu a ochranu pred poškodením DNA počas rôznych štádií vývinu oocytov. Toto je obzvlášť dôležité, pretože oocyty sú náchylné na poškodenie DNA v dôsledku predĺženého zastavenia M fázy v štádiu meiotickej profázy I (Smith, 2001; Rybska *et al.*, 2018).

Z morfológického hľadiska je možné sledovať rozpad zárodočného vezikulu (GVBD), ktorý možno popísať v štyroch fázach:

- *štádium I*: oocyty v tomto štádiu sú obklopené početnými kumulárnymi bunkami, pričom majú periférne uložené jemne granulované jadro s dobre viditeľnou jadrovou membránou. Chromatín je prítomný len v okolí jadierka v tvare kruhu alebo podkovy.
- *štádium II*: pred konečným dozretím jadro oocytov je okrúhle s riedko kondenzovanými chromozómami. Periviteliný priestor je úzky a kontakty medzi výbežkami kumulárných buniek a oocytom sú tesné typu gap junction. Inak je toto štádium po morfológickej stránke identické s predchádzajúcim.
- *štádium III*: jadrová membrána je ešte dobre viditeľná, jadierko sa stráca, zostáva však po ňom zreteľná svetlolomná plocha, stráca sa jemná granulácia nukleoplazmy. Konečné dozrievanie sa začína zvlhčením jadrovej membrány a spustením kondenzácie chromozómov. Periviteliný priestor sa zväčšuje a vrcholí rozpad kontaktov medzi výbežkami kumulárných buniek a oocytom.
- *štádium IV*: jadierko sa celkom stráca, jadrová membrána je menej zreteľná pričom vytvára štíhle výbežky. V jadre je viditeľná kondenzácia chromozómov.

Rozpad jadrovej membrány je spojený s kondenzáciou chromatínu a formáciou deliaceho vretienka. Deliace vretienko migruje zo stredu oocyty na perifériu a následne dochádza k prvému meiotickému deleniu (Bennabi,

Terret, Verlhac, 2016). Chromozómy zostávajúce v oocyte sa organizujú do štádia metafázy druhého meiotického delenia. Iniciácia anafázy je poznačená selekciou a segregáciou homológov. Oocyty postupujú telofázou, čo vedie k cytokinéze a exkrúzii polovice genetického materiálu vo forme prvého pólového telieska. Oocyty následne vstupujú do druhého meiotického delenia, v ktorom ostávajú až do oplodnenia. Okrem týchto zmien dochádza aj k translačnej aktivácii a zníženej expresii určitých mRNA. Kortikálne granuly migrujú na perifériu oocytu, mitochondrie agregujú okolo deliace vretienka. Granulózne bunky exprimujú matrix, čo vedie k expanzii kumulárných buniek a prerušeniu fyzického kontaktu oocytu a somatických buniek folikulu (Cecconi *et al.*, 2004; Cheeseman *et al.*, 2016).

Cytoplazmatické dozrievanie je proces, pri ktorom cytoplazma oocytu prechádza viacerými biochemickými a štrukturálnymi zmenami potrebnými pre zabezpečenie monospermatického oplodnenia a udržanie ranej embryogenézy. Cytoplazmatické zmeny, ktoré sa vyskytujú počas dozrievania oocytov, zahŕňajú hlavne syntézu, aktiváciu a degradáciu maternálnej mRNA, redistribúciu a usporiadanie organel, syntézu proteínov či vytváranie zásobných živín potrebných pre oplodnenie a ranú embryogenézu (Combelles *et al.*, 2002; Watson, 2007).

Počas cytoplazmatického dozrievania oocytov dochádza k redistribúcii organel, zmenám dynamiky cytosketu a molekulárnemu dozrievaniu. V rámci redistribúcie organel možno sledovať syntézu ribozómov, čo sa prejavuje fibrilogramulárnou formou jadierka. Endoplazmatické retikulum sa stáva aktívnym a interaguje s cytoskeletom formou regulácie  $Ca^{2+}$ , skladaním a degradáciou proteínov a pod. Mitochondrie ako syntetizátory ATP migrujú počas dozrievania z periférnej polohy do disperznej, čo je nevyhnutné pre správny embryonálny vývoj. Okrem mitochondrií podliehajú migrácii aj kortikálne granuly, ktoré sa z cytoplazmy presúvajú k okraju cytoplazmatickej membrány. Dynamika cytosketu zodpovedá za chromozómovú segregáciu, ale aj samotnú cytokinézu či transport organel. Zmeny možno detegovať na úrovni mikrotubulov, aktínových filamentov a stredných filamentov (Trebichalská *et al.*, 2021). Akékoľvek abnormality v cytoplazmatickom dozrievaní môžu viesť k vývinovým abnormalitám a neplodnosti (Li *et al.*, 2011).

Epigenetické dozrievanie možno charakterizovať ako sériu molekulárných modifikácií neovplyvňujúcich DNA sekvenciu. Epigenetické zmeny vedú k zmene gébovej expresie a môžu prebiehať nie len na špecifických doménach (teloméry, centroméry), ale aj na úrovni celého genómu. Epigenetické

modifikácie zahrňujú aj prechodné modifikácie nevyhnutné pre opravu zlomov DNA resp. jedinečných zmien vyskytujúcich sa z dôvodu mitotického či meiotického delenia. Epigenetické modifikácie tak môžu vytvárať zmeny v génovej expresii prostredníctvom metylácie DNA. Taktiež sú zodpovedné za posttranslačné modifikácie histónu, ako je metylácia histónu, acetylácia, fosforylácia a poly (ADP) ribozylácia (Liang *et al.*, 2012; He *et al.*, 2021).

### 2.2.2 Folikulogenéza

Folikulogenéza je proces vývoja ovariálnych folikulov, ktorý vedie k ovulácii a vylúčeniu oplodnenia zrelého oocytu. Základnou jednotkou je primordiálny folikul, ktorý možno definovať ako komplexnú štruktúru pozostávajúcu z oocytu obklopeného vrstvami buniek granulózy a theca. Proces folikulogenézy je regulovaný komplexnou súhrou hormónov a signálnych molekúl (Obr.4).

Folikulogenéza je dynamický a cyklický proces charakterizovaný drastickými zmenami v počte a veľkosti rôznych typov buniek prítomných vo vaječníku. Niektorí autori uvádzajú, že býva zahájená vo fetálnom štádiu migráciou primordiálnych zárodočných buniek (PGCs) smerom k embryonálnym genitálnym hrebeňom. Akonáhle PGCs dosiahnu genitálny hrebeň, vytvorí sa bipotenciálna gonáda, ktorá sa následne transformuje buď na vaječník alebo semenník. Včasná folikulogenéza je nasledovne definovaná progresiou malých primordiálnych folikulov a je neoddeliteľnou súčasťou menštruačného resp. estrálneho cyklu. Tvorba primordiálnych folikulov označuje začiatok včasnej ovariálnej folikulogenézy, po ktorej nasledujú jednotlivé štádiá formovania primárnych, sekundárnych, terciárnych a Graafových folikulov (Hardy *et al.*, 2000; Rybska *et al.*, 2018).

Štádiá folikulogenézy možno rozdeliť do troch častí: vývin folikulov, selekcia folikulov a nakoniec ovulácia a luteinizácia. V procese vývinu folikulov sa zhľuky malých nezrelých folikulov zhromažďujú a podliehajú vývojovým zmenám formáciou na väčšie, zrelé, antrálne folikuly. V štádiu selekcie a ovulácie sa z početných vyvíjajúcich sa antrálnych folikulov vyberú tie najvhodnejšie folikuly (u človeka je to väčšinou jeden za mesiac), ktoré podliehajú ovulačným zmenám. Nakoniec, počas luteinizácie, sa zvyškové bunky vo vnútri prasknutého folikulu spoja a vytvoria žlté teliesko (*corpus luteum*). Jeho primárnou funkciou je produkcia progesterónu, ktorý napomáha zahusťovať výstelku maternice, vďaka čomu je pripravená na implantáciu oplodneného oocytu (Smitz, Cortvrindt, 2002; Rimon-Dahari *et al.*, 2016).

Pochopenie procesu folikulogenézy je kľúčové pre výskum reprodukčného zdravia a klinickú prax. Prísna regulácia prostredníctvom endokrinných faktorov (gonadotropné hormóny, cytokíny, cyklíny a pod.) môže byť narušená hormonálnou nerovnováhou alebo genetickými mutáciami vedúcimi k poruchám reprodukcie resp. k vzniku neplodnosti (Hughes, Gorospe, 1991).

### ***Formovanie ovariálneho folikulu***

Počas embryonálneho vývoja obsahujú vaječníky veľký počet pohlavných buniek. Primordiálne pohlavné bunky môžeme prvýkrát identifikovať v stene žltkového vaku. Tieto premeiotické pohlavné bunky sa nazývajú oogónie a ich počet vo vaječníkoch postupne narastá mitotickým delením. Najväčšia mitotická aktivita je zaznamenaná v prenatalnom vývoji a krátko po narodení. Po ukončení mitotického delenia nastáva zmena klasifikácie oogónií na primárne oocyty, ktorých počet je v danom štádiu konečný. Primárne oocyty sa začínajú obklopovať plochými pre-granulóznymi bunkami, čím vzniknú primordiálne folikuly. Primordiálne folikuly sú najskorším štádiom vývoja folikulov, ktoré sú v stave pokoja až do dosiahnutia pohlavnej dospelosti (Picton, 2001; Fortune, 2003).

### ***Rast folikulu***

Primárne folikuly sa tvoria až aktiváciou primordiálnych folikulov, čo predstavuje komplexný proces, ktorý zahŕňa aktiváciu signálnych dráh a nábor podporných buniek. Počas vývoja primárnych folikulov bunky granulózy menia svoj plochý tvar a vytvárajú jednu vrstvu kubických buniek. Granulózne bunky podliehajú proliferácii a vytvárajú okolo oocytu viaceré vrstvy, čím dochádza k formovaniu rastúceho sekundárneho folikulu. Oocyt tiež začína rásť a podlieha meiotickému deleniu. Bunky theca sa začínajú diferencovať a obklopujú bunky granulózy. Primárny folikul je charakterizovaný prítomnosťou *zona pellucida*. *Zona pellucida* zohráva rozhodujúcu úlohu pri oplodnení tým, že zabraňuje polyspermii (oplodnenie oocyту viacerými spermiami) (Oktem, Urman, 2010; Hornick *et al.*, 2013).

V tomto štádiu je malý rastúci folikul zásobovaný jednou resp. dvoma artériami, ktoré vytvárajú sieť kapilár siahajúcu po bazálnu membránu. Tým je zabezpečená cirkulácia faktorov potrebných pre ďalší vývoj folikulu.

Sekundárny folikul postupne rastie a bunky priliehajúce z vonkajšej plochy na bazálnu membránu sa diferencujú do dvoch vrstiev: *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. Bunky *theca interna* postupne nadobúdajú charakter

steroido-sekrečných buniek. Bunky periférne od *theca externa* majú vretenovitý tvar a splývajú s okolitou strómou.

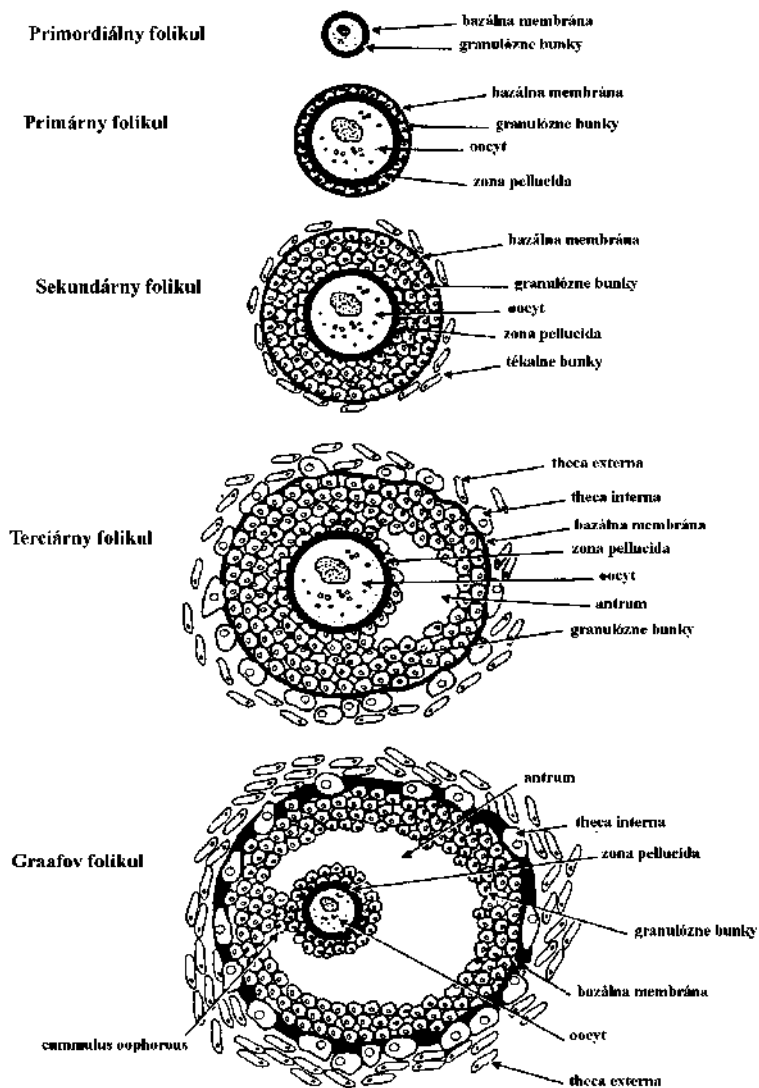
Ako folikul rastie, vytvárajú sa medzi granulóznymi bunkami dutinky vyplnené tekutinou, ktoré sú základom antra - vzniká antrálny folikul (Oxeneder *et al.*, 1979). V antrálnom folikule sa diferencovali granulózne bunky na: *cumulus oophorus* - bunky obklopujúce oocyt, antrálne granulózne bunky - bunky obklopujúce antrum, bunky *theca interna a externa* - bunky v blízkosti bazálnej membrány folikulu. Rýchlym rastom malých antrálnych folikulov dochádza k nahromadeniu tekutiny v antrálnej dutine. Tento proces je ukončený gonadotropínmi, ktoré spôsobia ovuláciu oocytu. Graafove folikuly začínajú vaskularizovať a zhruba 1 hodinu pred ovuláciou sa uvoľní bazálna membrána a kapiláry začínajú prenikať hlbšie do štruktúr folikulu.

K ovulácii dochádza, keď zrelý folikul praskne, čím sa oocyt uvoľní do vajcovodu. Ovulácia prebieha v troch štádiách: folikulárna fáza, samotná ovulácia a luteálna fáza. Folikulárna fáza je charakterizovaná vznikom Graafovho folikulu, v ktorom je umiestnený oplodnenia schopný oocyt. Prudký nárast LH spúšťa samotnú ovuláciu. Zrelý oocyt sa uvoľní z dominantného folikulu a putuje vajcovodom smerom k maternici. Oocyt má životnosť asi 24 hodín, počas ktorých môže byť oplodnený spermiami. Tretím štádiom ovulácie je luteálna fáza. Po ovulácii sa prasknutý folikul vo vaječníku premení na štruktúru nazývanú žlté teliesko, ktoré produkuje progesterón. Progesterón pomáha ďalej zahusťovať výstelku maternice a pripravuje ju na potenciálne tehotenstvo. Ak oocyt nie je oplodnený, žlté teliesko sa rozpadne a hladina estrogénu a progesterónu sa zníži, čo vedie k odlupovaniu výstelky maternice a začiatku nového menštruačného cyklu.

Zaujímavé je spojenie gap junction medzi granulóznymi bunkami a oocytom naprieč *zona pellucida*. Toto spojenie sprostredkováva intracelulárnu komunikáciu a transport malých molekúl medzi bunkami (syncytium) a zároveň poskytuje granulóznym bunkám i kontrolu nad pokračovaním meiózy (Wiesen, Midgley, 1994; Kidder, Mhawi, 2002).

Rast folikulu nie je lineárny proces. Vo vaječníkoch existujú tri štádia folikulogenézy: preantrálne rastové, základné a exponenciálne štádium. Preantrálne rastové štádium začína premenou primordiálneho folikulu na primárny a končí formovaním preantrálneho folikulu. U človeka nie je dosiaľ známe časové rozpätie tejto rastovej fázy. Na základe porovnania u opíc (Zeleznik *et al.*, 1980) a potkanov (Hirshfield, 1985), kde je tento proces veľmi pomalý sa odhaduje, že u ľudí trvá až niekoľko mesiacov. Základná rastová fáza sa začína preantrálnym folikulom a končí terciárnym folikulom. U

človeka tento proces trvá asi dva mesiace a na konci tohto procesu dosahujú folikuly v priemere 2-5 mm (Govan, Black, 1975). Exponenciálna rastová fáza trvá u človeka 21 dní, počas ktorých niektoré antrálne folikuly začínajú dozrievať v luteálnej fáze menštruačného cyklu. Výsledkom je dominancia určitých folikulov, ktoré sú predurčené k ovulácii. Počet dominantných folikulov je druhovo špecifický. Typické pre tieto folikuly je vysoká mitotická aktivita granulóznych buniek, vysoká estrogénová a androgénová hladina a väčšie rozmery.



Obrázok č. 4: Folikulogenéza  
(Zdroj: Upravené z Vantman, Vega, 2010)



## 2.3 Regulácia meiotickej maturácie *in vivo*

Maturácia oocytov je zložitý proces, ktorý je regulovaný rôznymi hormónmi a signálnymi dráhami. Maturáciu oocytov je možné charakterizovať z pohľadu bunkového cyklu ako prechodnú fázu medzi diakinézou a metafázou prvého meiotického delenia (Fan, Sun, 2013). Počas meiotickej maturácie dochádza k získavaniu oocytárnej vývinovej kompetencie, pričom narušenie tohto procesu je rozhodujúce pre úspešné oplodnenie a embryonálny vývoj. Regulácia maturácie môže byť rozdelená na:

- reguláciu oocytárnej maturácie: je to zložitý a vysoko koordinovaný proces, ktorý zahŕňa rôzne bunkové a molekulárne mechanizmy zodpovedné za formáciu kvalitného a oplodnenia schopného oocytu.
- reguláciu folikulárneho rastu

### 2.3.1 Regulácia meiotickej maturácie oocytov

U samíc cicavcov dochádza k iniciácii maturácie oocytov už počas vývoja plodu. Meióza, proces bunkového delenia, produkuje haploidné gaméty a je zahájená už pred narodením. Maturácia sa zastavuje v diplotennom štádiu profázy prvého meiotického delenia, v štádiu primárnych oocytov. Zastavenie maturácie možno označiť za tzv. meiotický blok, ktorý je regulovaný cyklickým adenozinmonofosfátom (cAMP) a systémom natriuretického peptidového prekursora typu C/natriuretického peptidového receptora (NPR2) (He *et al.*, 2021).

cAMP je syntetizovaný nie len samotnými oocytmi, ale aj somatickými bunkami. Počas maturácie oocytov prechádzajú hladiny cAMP dynamickými zmenami, ktoré sú prísne regulované. Spočiatku vysoké hladiny cAMP udržiavajú oocyt v meiotickom bloku, čo vedie k zabezpečeniu správnej synchronizácie a rozdeleniu genetického materiálu oocytu. Zníženie hladín cAMP vedie k obnoveniu meiotickej maturácie. Tento pokles je primárne sprostredkovaný enzýmom fosfodiesterázou 3A (PDE3A), ktorý hydrolyzuje cAMP na jeho neaktívnu formu, AMP. Zníženie hladín cAMP zmierňuje inhibíciu faktora podporujúceho maturáciu (MPF) a komplexu proteínov, ktoré napomáhajú maturácii. Aktivácia MPF vedie k rozpadu jadrového obalu, preskupeniu cytoskeletálnych komponentov a ďalším bunkovým zmenám nevyhnutných pre dozrievanie oocytov (Jaffe, Egbert, 2017; He *et al.*, 2021).

NPPC/NPR2 systém je zložený z NPPC (natriuretický peptidový prekursor typu C), člena rodiny natriuretických peptidov a natriuretického peptidového

receptora 2 (NPR2), ktorý je exprimovaný v oocytoch a kumulárnych bunkách, ktoré ho obklopujú. NPPC bol pôvodne identifikovaný ako regulátor kardiovaskulárnej funkcie, avšak viaceré štúdie odhalili jeho vplyv aj na dozrievanie oocytov. NPPC prostredníctvom svojho receptora, NPR2 vedie k zvýšeniu hladín cyklického guanozínmonofosfátu (GMP), ktorý inhibuje aktivitu PDE3A. To má za následok udržiavanie vysokých hladín cAMP a meiotické zastavenie v oocyte. Prítomnosť NPPC vo folikulárnej tekutine obklopujúcej oocyt naznačuje jeho lokálnu produkciu a parakrinný účinok na kumulus-oocytárny komplex (Liu *et al.*, 2017).

Obnovenie maturácie je sprevádzané dosiahnutím pohlavnej dospelosti, ktorá je na hormonálnej úrovni sprevádzaná ovulačnou vlnou luteinizačného hormónu. LH, hormón vylučovaný prednou hypofýzou, je kľúčovým regulátorom maturácie oocytov. LH sa viaže na svoj špecifický receptor (LHR) prítomný v granulóznych bunkách, čím spúšťa kaskádu udalostí. Prostredníctvom parakrinnej signalizácie dochádza v kumulus-oocytárnych komplexoch (COCs) k zníženiu expície NPR2 v kumulárnych bunkách, narušením gap junctions epiregulínom a ampiregulínom a k poklesu cGMP. Zníženie koncentrácie cGMP zmierňuje inhibíciu meiotickej progresie, čo umožňuje oocytom obnoviť meiózu.

Znížením koncentrácie cGMP dochádza aj k zníženiu cAMP, čo má za následok aktiváciu MPF. MPF možno charakterizovať ako komplex zložený z dvoch kľúčových zložiek: cyklín-dependentná kináza 1 (CDK1) a cyklín B. Aktivácia MPF je kritickým krokom pri obnovení maturácie oocytov. Poklesom cAMP dochádza k zastaveniu inhibičnej fosforylácie CDK1, čo vedie k aktivácii MPF a sérii udalostí ako fosforylácia substrátov, vrátane proteínov zapojených do rozpadu jadrového obalu, zostavenia vretienka a kondenzácie chromozómov. Tieto udalosti spoločne podporujú ukončenie prvého meiotického delenia, ktorého výsledkom je oocyt s vylúčeným prvým pólovým telieskom (PB1). Vylúčením PB1 sa znižuje aktivita MPF degradáciou sekurínu a cyklínu B a je možné detegovať segregáciu homológov riadenú spindle assembly checkpointom (SAC) a anaphase promoting complexom (APC) (Fan, Sun, 2019).

SAC zabezpečuje presnú segregáciu chromozómov počas delenia buniek a monitoruje pripojenie chromozómov k vretenovému aparátu, čím oneskoruje anafázu, kým nie sú všetky chromozómy správne zarovnané. SAC je sprostredkovaný skupinou proteínov vrátane Mad1, Mad2, Bub1, BubR1 a Mps1. SAC inhibuje APC vytváraním difúzneho inhibítora nazývaného komplex mitotických kontrolných bodov (MCC). MCC sa viaže na APC a

inhibuje ho, čím bráni degradácii cyklínov a sekurínov. Akonáhle sú všetky chromozómy správne zarovnané, MCC degraduje, čo umožňuje aktiváciu APC (Blengini *et al.*, 2021).

Komplex podporujúci anafázu (APC) je multi-podjednotková E3 ubikvitín ligáza, ktorá riadi progresiu bunkového cyklu cielenou degradáciou špecifických proteínov, vrátane cyklínov a sekurínov. Aktivácia APC je zahájená degradáciou inhibičného proteínu Emil a vedie k degradácii cyklínov (CDK1) a sekurínov, čo spúšťa nástup anafázy a ukončenie dozrievania oocytov (Yamano, 2019).

Dovršenie oocytárnej maturácie v prípade cicavcov nastáva až po oplodnení a práve preto je tento proces prísne regulovaný viacerými bunkovými a molekulárnymi regulátormi. Aktivácia mitogén-aktivovanej proteín kinázy (MAPK), zapojenie MPF, regulácia cAMP a vápniková signalizácia patria medzi kľúčové mechanizmy, ktorými sa riadi toto kritické štádium reprodukcie. Po oplodnení prienik spermie spustí sériu vápnikových oscilácií v cytoplazme oocytov. Tieto oscilácie sú sprostredkované uvoľňovaním vápnika z vnútrobunkových zásob a prílevom vápnika z extracelulárneho prostredia. Vápnikové oscilácie aktivujú downstream efekty, vrátane vápnikovo závislých kináz a fosfatáz. Meiotická maturácia sa po oplodnení oocytu obnoví a výsledkom je vylúčenie polovice sesterských chromatíd v podobe druhého pólového telieska (Ma *et al.*, 2017; Wassarman, Litscher, 2022).

### **2.3.2 Regulácia folikulárneho rastu**

Hormóny hrajú kľúčovú úlohu aj pri regulácii rastu folikulov u cicavcov. Os hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) riadi tento proces prostredníctvom série zložitých hormonálnych interakcií. Hypotalamus vylučuje gonadotropín uvoľňujúci hormón (GnRH), ktorý stimuluje prednú hypofýzu k uvoľňovaniu FSH a LH.

LH indukuje konečné dozrievanie oocytu, zatiaľ čo FSH stimuluje rast a vývoj ovariálnych folikulov. Formovanie primordiálnych folikulov prebieha aj bez účasti gonadotropínov, vzhľadom nato, že u žien s Kallmanovým syndrómom boli folikuly prítomné aj pri absencii gonadotropínového receptora (Sungurtekin *et al.*, 1995). Jedným z rozhodujúcich momentov folikulogenézy je vstup do rastovej fázy, kedy premena plochých pregranulóznych buniek primordiálneho folikulu v kubické granulózne bunky je riadená na základe koncentrácie gonadotropínov (Sungurtekin *et al.*, 1995). Gonadotropíny taktiež zodpovedajú za premenu primárneho folikulu do

podoby skorého antrálneho folikulu. Najviac regulovanou fázou je exponenciálna fáza zahŕňajúca prechod antrálneho folikulu do ovulačného folikulu, delenie granulóznych buniek a zvýšenie steroidogenézy. Je pravdepodobné, že gonadotropíny sú synergistami so steroidnými hormónmi. Granulózne bunky zväčšujú svoju proliferáciu, čo koreluje so zvýšenou hladinou FSH.

Okrem gonadotropínov sa na regulácii folikulárneho rastu podieľa aj estrogén a progesterón, ktoré sú produkované vyvíjajúcimi sa folikulmi a žltým telieskom. Oba pôsobia ako spätná kontrola pre funkciu HPG osi. Estrogén inhibuje sekréciu GnRH a FSH, čím bráni nadmernému vývoju folikulov. Zníženie FSH vedie k atrézii nedominantných folikulov. Tým pádom gonadotropíny nestimulujú iba rast, ale ich absencia spôsobuje aj atréziu folikulov (Grady, Greenwald, 1968). Naproti tomu progesterón inhibuje sekréciu LH, čím zabraňuje predčasnej ovulácii. Táto jemná rovnováha medzi stimulačnými a inhibičnými hormónmi zabezpečuje riadenú progresiu rastu folikulov (Wu, Xu, Wang, 2007; Ding *et al.*, 2022).

Okrem hormonálnej regulácie zohrávajú v regulácii rastu folikulov kľúčovú úlohu aj parakrinné a autokrinné faktory v rámci ovariálneho mikroprostredia. Tieto faktory zahŕňajú rôzne rastové faktory, cytokíny a chemokíny vylučované bunkami granulózy, bunkami theca a samotnými oocytmi. Jedným z kľúčových rastových faktorov podieľajúcich sa na vývoji folikulov je superrodina transformujúceho rastového faktora beta (TGF- $\beta$ ). Členovia tejto rodiny, ako sú kostné morfogenetické proteíny (BMP) a rastové diferenciačné faktory (GDF), ktoré regulujú proliferáciu, diferenciáciu a steroidogenézu buniek granulózy. Rastový diferenciačný faktor 9 a kostný morfogenetický proteín 15 zohrávajú kľúčovú úlohu pri regulácii proliferácie granulóznych buniek a kvality oocytov. Zložitá súhra medzi týmito parakrinnými a autokrinnými faktormi zabezpečuje správny rast a dozrievanie folikulov (Trombly, Woodruff, Mayo, 2009; Patton, Madadi, Pangas, 2021).

Rastové faktory podobné inzulínu (IGF) a ich väzbové proteíny (IGFBP) sú taktiež rozhodujúce pre rast folikulov a maturáciu oocytov. Na regulácii rastu folikulov u cicavcov sa podieľa viacero signálnych dráh. Jednou z kľúčových dráh je dráha fosfatidylinozitol 3-kináza (PI3K)/proteínkináza B (Akt). Aktivácia tejto dráhy podporuje prežitie buniek granulózy, proliferáciu a steroidogenézu. Okrem toho dráha MAPK reguluje proliferáciu a diferenciáciu granulóznych buniek. Ďalšou kritickou signálnou dráhou zapojenou do rastu folikulov je dráha Wnt/ $\beta$ -katenínu. Aktivácia tejto dráhy podporuje proliferáciu granulóznych buniek a inhibuje apoptózu. Signálna

dráha Notch navyše hrá úlohu pri určovaní osudu granulóznych buniek a folikulárnej selekcii (Zhang *et al.*, 2011; Vanorny *et al.*, 2014).

Epigenetické modifikácie, vrátane metylácie DNA a modifikácií histónov môžu tiež ovplyvniť reguláciu rastu folikulov. Tieto modifikácie môžu zmeniť vzorce génovej expresie, čo má vplyv na vývoj a dozrievanie folikulov (LaVioe, 2012).

## **2.4 *In vitro* maturácia oocytov**

Dosiahnutie vývinovej kompetencie oocytov je možné aj v *in vitro* podmienkach pomocou *in vitro* maturácie (IVM). *In vitro* maturácia oocytov je technika, ktorá zahŕňa dozrievanie oocytov mimo tela, v laboratórnom prostredí. Na rozdiel od tradičných superovulačných metód, si IVM nevyžaduje hormonálnu stimuláciu samíc (Hatirnaz *et al.*, 2018). Táto metóda preto predstavuje potenciálnu metódu ART a slúži aj na výskumné účely spojené s liečbou neplodnosti, ktorá postihuje milióny párov na celom svete.

Aktuálne však nedochádza k rozšíreniu tejto metodológie a skôr sa pozornosť presúva na optimalizáciu *in vitro* prostredia s cieľom zvýšiť mieru úspešnosti produkcie embryí ako alternatívne riešenie problémov s neplodnosťou súvisiacimi s polycystickými vaječníkmi (PCOS) alebo chemoterapiou (de Ziegler *et al.*, 2012).

Hlavným znakom IVM je, že na produkciu kompetentných oocytov využíva nezrelé oocyty, ktoré sa získajú z vaječníkov pred dokončením maturácie. Tieto nezrelé oocyty potom dozrievajú v laboratórnych podmienkach, kde sú vystavené kultivácii v špecifických médiách doplnených o hormóny a rastové faktory. Použitie suboptimálnych kultivačných podmienok počas IVM môže ovplyvniť kompetenciu oocytov a celkovú životaschopnosť embryí. Získanie pochopenia kritických a kľúčových aspektov technológie IVM by mohlo podporiť vývoj a zlepšenie kultivačných podmienok, ktoré vedú k získaniu oplodnenia schopných oocytov (Obr.5) (Bahrami, Cottee, 2022).

Proces IVM zvyčajne zahŕňa tri fázy: získanie oocytov, *in vitro* maturácia oocytov a oplodnenie. Počas fázy získavania oocytov sa nezrelé oocyty odoberajú z vaječníkov živých jedincov pomocou ultrazvukom riadenej aspirácie. V prípade výskumu a vaječníkov odobratých z modelových organizmov, z bitúnkov, dochádza k izolácii oocytov aspiráciou folikulov. Následne sa nezrelé oocyty prenesú do laboratórnej misky obsahujúcej špeciálne kultivačné médium, ktoré obsahuje potrebné hormóny a rastové

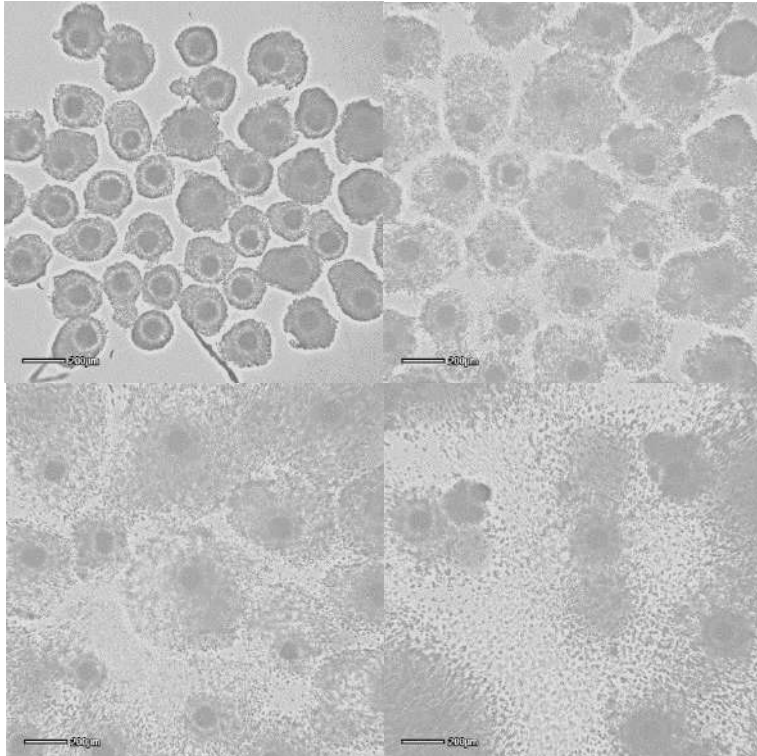
faktory na ich dozrievanie. Po období dozrievania sa oocyty oplodnia buď konvenčným IVF alebo intracytoplazmatickou injekciou spermii (ICSI).

Jednou z hlavných výhod IVM je, že nevyžaduje použitie vysokých dávok hormónov na stimuláciu vaječníkov, čo môže viesť ku komplikáciám, ako je syndróm ovariálnej hyperstimulácie. Vďaka tomu je IVM bezpečnejšou a menej invazívnou alternatívou k IVF, najmä pre ženy, ktoré sú vystavené riziku vzniku týchto komplikácií. IVM má tiež potenciál byť nákladovo efektívnejšie ako IVF. Pretože IVM nevyžaduje použitie vysokých dávok hormónov, môže sa vykonať v kratšom čase a s menším počtom stimulujúcich liečiv, čo môže znížiť celkové náklady na liečbu. Vzhľadom nato, že IVM používa nezrelé oocyty, ktoré sa získajú z vaječníkov pred ich úplným dozretím, je možné získať viac oocytov za cyklus ako pri konvenčnom IVF, čo môže zvýšiť šance na úspech.

Ďalšou potenciálnou výhodou IVM je, že môže byť vhodnou možnosťou pre ženy, ktoré majú určité zdravotné ťažkosti, ktoré z nich robia zlých kandidátov na konvenčné IVF. Napríklad ženy s PCOS môžu mať zvýšené riziko vzniku ovariálneho hyperstimulačného syndrómu s IVF, ale môžu byť schopné podstúpiť IVM bez týchto rizík. U žien s diagnostikovanou rakovinou môže mať chemoterapia alebo rádioterapia škodlivé účinky na ich reprodukčné zdravie. IVM tak ponúka riešenie tým, že na rozdiel od tradičného IVF, prebieha bez hormonálnej stimulácie. To znamená, že ženy môžu podstúpiť daný proces odobratia oocytov bez toho, aby odložili liečbu a tým si zabezpečili šancu na založenie rodiny.

Zatiaľ čo IVM má mnoho potenciálnych výhod, existuje aj niekoľko obmedzení tejto techniky. Jedným z hlavných obmedzení je, že miera úspešnosti IVM je vo všeobecnosti nižšia ako pri konvenčnom IVF. Je to preto, že nie všetky nezrelé oocyty v laboratórnych podmienkach správne dozrejú a sú úspešne oplodnené.

Ďalším obmedzením IVM je, že nemusí byť vhodné pre všetky ženy s neplodnosťou. Ženy, ktoré majú nízky počet oocytov alebo zlú kvalitu oocytov, nemusia byť dobrými kandidátkami na IVM, pretože miera úspešnosti tejto techniky je v týchto populáciách vo všeobecnosti nižšia.



*Obrázok č.5: IVM*

*priebeh IVM (oocyty ošípanej): GV, MI a MII štádia  
s príslušnými zmenami na úrovni kumulárnych buniek*

*(Zdroj: Alexandra R.Bartková, 2023)*

#### **2.4.1 Maturačné médiá**

Hlavným znakom IVM je dozrievanie nezrelých oocytov, ktoré zahŕňa kultiváciu oocytov v laboratórnych podmienkach. Napodobnenie *in vivo* podmienok môže byť v laboratórnych podmienkach komplikované. V takom prípade treba zobrať do úvahy viaceré faktory ako sú inkubačné podmienky (vlhkosť, podiel CO<sub>2</sub>, pH), manipulačné podmienky (rýchlosť, presnosť a precíznosť manipulácie s oocytmi) či zloženie a suplementy maturačných médií.

Maturačné médiá zohrávajú rozhodujúcu úlohu pri iniciácii a kompletizácii maturácie oocytov a zvyčajne obsahuje druhovo špecifické zložky, ktoré sú zodpovedné za dosiahnutie optimálnych výsledkov. Patria sem zložky zdôraznené štúdiami, ako sú (Pereira *et al.*, 2013; Do *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2022; Arias, 2022; Němcová *et al.*, 2023):

- Hormóny: HCG (ľudský choriový gonadotropín), PMSG (sérový gonadotropín pre tehotné kobyly), FSH (folikuly stimulujúci hormón), LH (luteinizačný hormón), melatonín, E2 (estradiol)
- Rastové faktory: EGF (Epidermal Growth Factor), IGF-1 (Inzulínu podobný rastový faktor), FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), LIF (leukemia inhibitory factor)
- Sérum: BSA (hovädzí sérový albumín), FBS (fetálne bovinné sérum), FCS (fetálne teľacie sérum), HSA (ľudský sérový albumín)
- Antioxidanty: L-cysteín, lycopén, L-karnitín, resveratrol, astaxantín, vitamín C, E, B3

Jedným z najbežnejšie používaných maturačných médií je TCM-199. Toto médium obsahuje zmes aminokyselín, vitamínov a minerálov, ktoré poskytujú potrebné živiny pre rast a vývin oocytov. TCM-199 je obzvlášť užitočný pri podpore dozrievania oocytov u žien so syndrómom polycystických ovárií. Štúdie ukázali, že TCM-199 môže zlepšiť kvalitu oocytov a zvýšiť počet zreých oocytov produkovaných počas IVM. Využívanie TCM-199 má aj určité obmedzenia. Má relatívne nízke pH, čo môže byť škodlivé pre vývin oocytov. Okrem toho mu chýbajú niektoré základné rastové faktory, ktoré sú nevyhnutné pre optimálne dozrievanie oocytov (Gandhi *et al.*, 2000; Russel *et al.*, 2006).

SAGE maturačné médium obsahuje rôzne zložky nevyhnutné pre dozrievanie oocytov. Zloženie maturačných médií SAGE zahŕňa glukózu, pyruvát, aminokyseliny, vitamíny, minerály a hormóny. Médium obsahuje aj fetálne bovinné sérum (FBS). Glukóza a pyruvát sú primárnymi zdrojmi energie, aminokyseliny sú nevyhnutné pre syntézu bielkovín, zatiaľ čo vitamíny a minerály sú potrebné pre rôzne metabolické procesy (Nabi, Oliver, 2009; Pongsuthirak *et al.*, 2015).

Maturačné médium Ham's F 10 bolo pôvodne využívané len na bunkové kultúry. Optimalizáciou zloženia sa začalo využívať aj v rámci IVM. Jednou z hlavných výhod je, že podporuje rast a dozrievanie oocytov bez potreby suplementácie séra, ktoré môže viesť k výskytu kontaminácie. Ďalšou výhodou používania Ham's F 10 je, že obsahuje vysoké hladiny glukózy a pyruvátu, aminokyseliny, vitamíny a minerály. Okrem pozitív má využívanie Ham's F 10 aj nevýhody. Jednou z hlavných nevýhod je, že ide o zložité a na výrobu nákladné médium obsahujúce množstvo rastových faktorov a živín, ktoré sa ťažko syntetizujú a vyžadujú si špeciálne vybavenie a odborné



znalosti. To môže menším klinikám alebo výskumným laboratóriám sťažiť používanie Ham's F 10. Ďalšou nevýhodou použitia tohto média je, že nemusí byť vhodný pre všetkých pacientov, vzhľadom na vysoké hladiny glukózy a pyruvátu, čo môže byť problematické pre pacientov s inzulínovou rezistenciou alebo cukrovkou (Hassouna *et al.*, 2018; Aghaz *et al.*, 2021).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) je typ média využívaný na kultiváciu buniek. Bolo prvýkrát vyvinuté v 50. rokoch minulého storočia a v dnešnej dobe sa využíva aj v prípade IVM. DMEM obsahuje množstvo živín a rastových faktorov, ktoré sú nevyhnutné pre dozrievanie oocytov, vrátane glukózy, aminokyselín, vitamínov a minerálov. Jedná sa o štandardizované médium, ktorého príprava nie je náročná a je komerčne dostupné od rôznych dodávateľov. Medzi nevýhody využitia tohto média možno zaradiť variabilitu v zložení v rámci rôznych šarží, druhovú špecifitu a vysokú cenu (Feyen *et al.*, 2020; Bartkova *et al.*, 2020).

Výskumníci z USA vyvinuli nové médium North Carolina State University-23 (NCSU-23). NCSU-23 je optimalizovaná verzia pôvodného média, ktoré bolo navrhnuté pre kultiváciu embryí hovädzieho doby a ošípanej. NCSU-23 obsahuje množstvo živín a rastových faktorov, ktoré sú nevyhnutné pre dozrievanie oocytov. Patria sem aminokyseliny, vitamíny, minerály, hormóny (FSH, LH) a sérum (Hyun *et al.*, 2003; Pyoos *et al.*, 2018).

Posledným optimalizovaným médium je **FLI**. Jedná sa o špecializované maturačné médium určené na dozrievanie oocytov *in vitro*. Obsahuje rôzne živiny, rastové faktory a hormóny, ktoré podporujú rast a vývin oocytov. Zloženie dozrievacieho média FLI je optimalizované tak, aby napodobňovalo prirodzené prostredie folikulu a poskytovalo potrebné podmienky na dozrievanie oocytov. Kľúčovými zložkami média, na základe ktorých je aj pomenované, sú tri cytokíny a to FGF2, LIF a IGF-1 (Albal *et al.*, 2022).

#### **2.4.2 Vplyv maturačných médií na *in vitro* maturáciu**

*In vitro* maturácia oocytov predstavuje jednu z možností liečenia neplodnosti. Prestavuje jeden z kľúčových krokov *in vitro* produkcie embryí. (IVP) vo všeobecnosti prináša nižšiu mieru úspešnosti v porovnaní s *in vivo*. Existuje mnoho faktorov, ktoré prispievajú k tomuto výsledku, z ktorých jeden sme skúmali v našej štúdií - vplyv rôznych maturačných médií, konkrétne TCM-199, DMEM a FLI.

Naše výskumné úsilie bolo zamerané na zlepšenie a optimalizáciu IVM oocytov, ktorá slúži ako základný proces na dosiahnutie vývinovej kompetencie a celkovej produkcie embryí *in vitro*. Naše experimenty sme

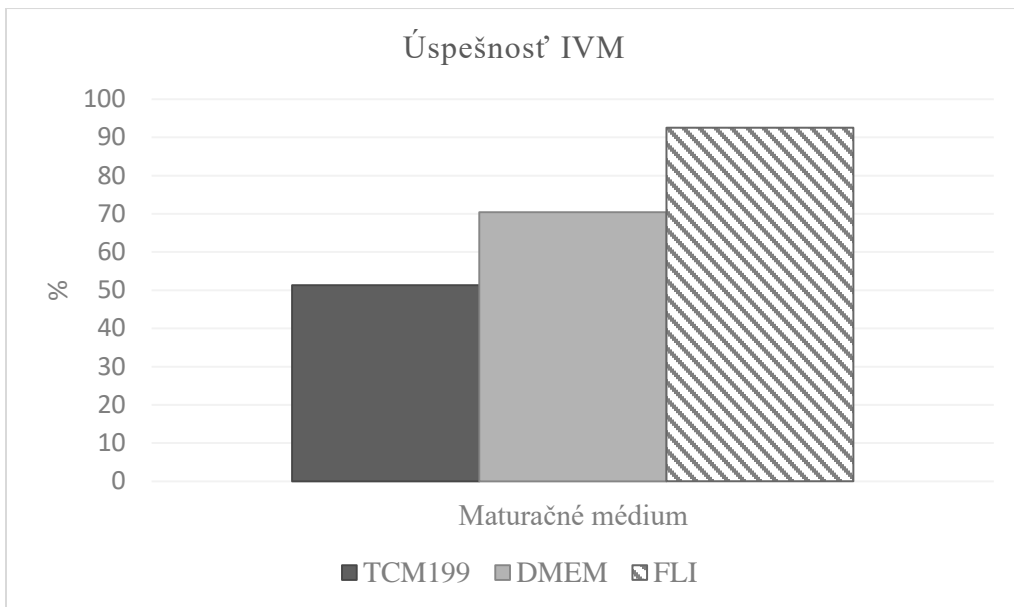
uskutočnili v laboratórnych podmienkach s využitím modelového organizmu, ošípanej. Ošípaná patrí na základe fyziológie medzi vhodné modelové organizmy s možnosťou aplikovaného výskumu zameraného na humanitnú oblasť.

V tejto časti experimentov sme porovnávali úspešnosť dosiahnutia MII fázy v oocytoch s využitím troch maturačných médií. Pred zahájením experimentu sme získali oocyty aspiráciou folikulov s priemerom 3-6mm. Oocyty boli vyselektované na základe morfológického hodnotenia kvality celého kumulov-oocytárneho komplexu. Následne sme kvalitatívne zhodné COCs rozdelili do troch experimentálnych skupín. IVM prebiehala v rovnakých podmienkach, a to 50 COCs maturovalo v 500  $\mu$ l maturačného média v inkubačných podmienkach 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> po dobu 44h.

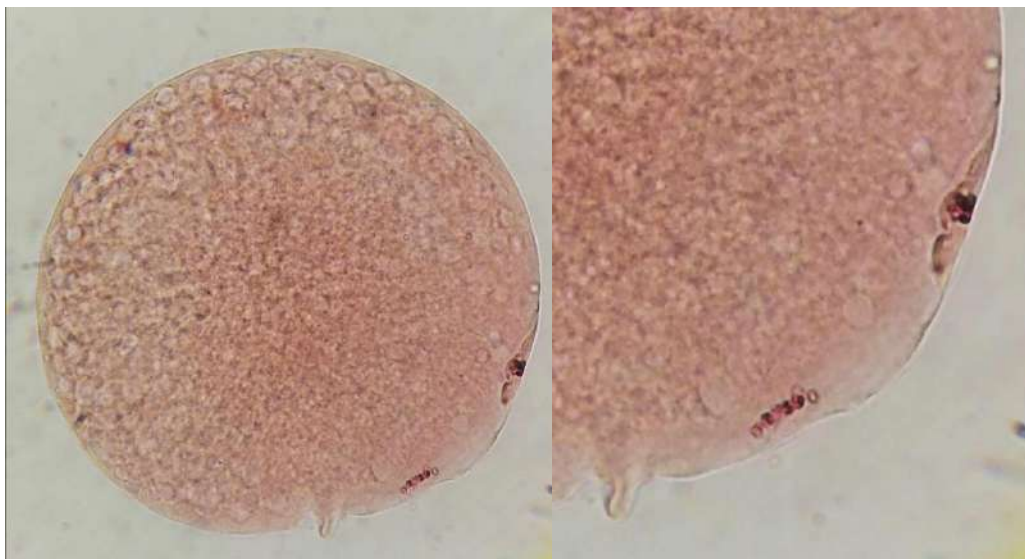
V našich laboratórnych podmienkach sme dosiahli úspešnosť maturácie oocytov do štádia MII v TCM-199 v 51,3% oocytov, v DMEM v 70,4% oocytov a v médiu FLI v 92,5% oocytov (Tab. 1, Graf 1). Naše výsledky získané v rámci FLI experimentálnej skupiny korelujú s výsledkami opublikovanými v štúdií Yuan, Krisher (2012), ktorí sledovali v *in vitro* podmienkach úspešnosť maturácie oocytov do MII štádia v NCSU23 maturačnom médiu v 85% oocytov. Získané výsledky z DMEM skupiny sú podobné výsledkom, ktoré publikoval Zhang *et al.* (2015), kde v kontrolnej skupine dosiahli úspešnosť maturácie v TCM-199 až v 89,7% oocytov. Avšak v rámci TCM-199 sme v našom prípade sledovali nižšiu úspešnosť. V porovnaní s Kumar *et al.* (2015), ktorí dosiahli úspešnosť maturácie 80% v DMEM médiu sme v našich laboratórnych podmienkach dosiahli využitím rovnakého média menšiu úspešnosť. Naše výsledky z IVM v DMEM médiu korelujú so Su *et al.* (2012), ktorí vo svojej štúdií dosiahli v prípade hovädzieho dobytku úspešnosť maturácie do MII štádia v 73%.

Tabuľka č. 1: Úspešnosť maturácie oocytov ošípanej v DMEM a FLI médiu

Typ maturačného média	Počet oocytov	Počet oocytov v MII
TCM-199	750	385 (51,3%)
DMEM	750	528 (70,4%)
FLI	750	694 (92,5%)



*Graf č. 1: Úspešnosť maturácie oocytov ošípanej v DMEM a FLI médiu.*



*Obrázok č.6: Dosiahnutie metafázy II (oocyt ošípanej)  
(Zdroj: Alexandra R.Bartková, 2023)*

## 2.5 Kvalita oocytu

Kvalita oocytov predstavuje jeden z kľúčových faktorov zodpovedných za úspešnosť oplodnenia a je rozhodujúcim faktorom samičej plodnosti. Kvalita oocytov sa preto vzťahuje na schopnosť oplodnenia a vyvinutia sa do podoby zdravého embrya. Vysokokvalitné oocyty možno definovať ako zrelé, vývinovo kompetentné bunky s haploidným počtom chromozómov (Coticchio *et al.*, 2004; Sciorio *et al.*, 2022).

Existuje niekoľko faktorov, ktoré ovplyvňujú kvalitu oocytov, vrátane veku, genetiky, životného štýlu a environmentálnych faktorov. Vek je najvýznamnejším faktorom, pretože kvalita a kvantita oocytov s vekom samice klesá. Niektoré genetické mutácie môžu ovplyvniť schopnosť oocytov správne sa vyvíjať, čo vedie k neplodnosti alebo vrodeným chybám. Faktory životného štýlu, ako je fajčenie, konzumácia alkoholu a zlá strava, môžu tiež ovplyvniť kvalitu oocytov. Vystavenie environmentálnym toxínom, ako sú pesticídy a znečisťujúce látky, môže taktiež viesť k poškodeniu oocytov.

Mnohí odborníci tvrdia, že vývinový potenciál oocytov priamo súvisí s ich kvalitou (Lasiene *et al.*, 2009; Hoshimo, 2018). Je známe, že COCs získané zo stredne veľkých alebo veľkých folikulov majú väčší vývinový potenciál a väčšie priemery ako tie izolované z menších folikulov, ako uvádza Boni v roku 2012.

Zachovanie potomstva závisí výlučne od reprodukčnej úlohy a kompetencie oocytov. Kvalita oocytov podmieňuje životaschopnosť embrya a aj výsledky IVF. Kvalita oocytov je závislá nielen od jadrového a mitochondriálneho genómu, ale výrazne sa na tomto procese podieľa a ovplyvňuje ho aj mikroprostredie samotného oocytu. Vaječníky a predovulačné folikuly silne ovplyvňujú dozrievanie cytoplazmy oocytov tým, že ovplyvňujú ich transkripčné a translačné procesy.

Samotné dosiahnutie jadrovej zrelosti nestačí na určenie kvality oocytov. Jadrové aj cytoplazmatické dozrievanie musia byť synchronizované v optimálnych podmienkach, ktoré podporujú úspešné oplodnenie (Swain, Pool, 2008). Keď oocyt dosiahne úplnú vývinovú kompetenciu počas oogenézy stane sa vhodným na oplodnenie. Takýto oocyt vykazuje charakteristiky, ako je úplná jadrová a cytoplazmatická zrelosť, vylúčenie pólového telieska, rovnomerné granulárne zloženie v cytoplazme oocytu, ostro ohraničená *zona pellucida* s minimálnym periviteliným priestorom a viacnásobné vrstvy zdravých kumulárnych buniek, ktoré sú intaktné (Robker, 2008; Hoshimo, 2018).

### 2.5.1 Spôsoby hodnotenia oocytárnej kvality

Na detekciu kvality oocytov sú dostupné rôzne techniky, niektoré sú invazívne a iné neinvazívne. Moderné technológie ako mikročipy, konfokálna mikroskopia a RT-qPCR uľahčili metódy molekulárnej biológie. Aj keď tieto parametrické metódy ponúkajú vysokú objektivitu, vyžadujú si úplnú deštrukciu buniek. V dôsledku toho rastie záujem o objavenie vitálnych, ale spoľahlivých prístupov k hodnoteniu kvality oocytov.

#### *Morfologické hodnotenie*

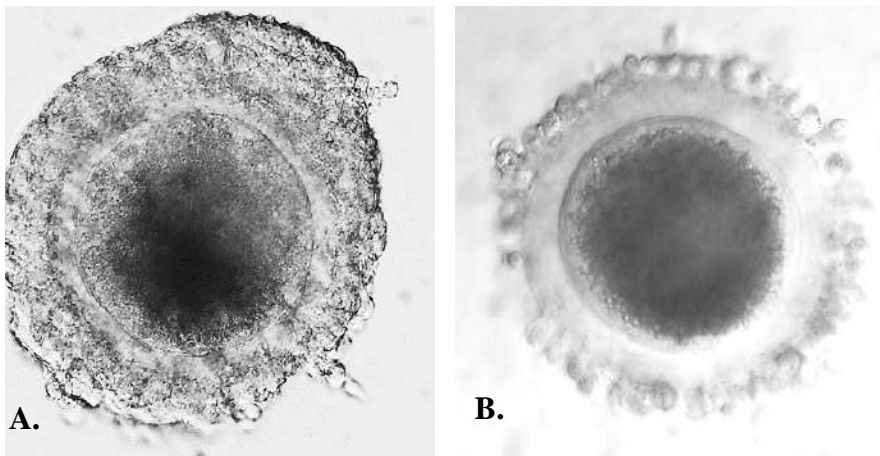
Morfologické hodnotenie kvality oocytov je kľúčovým krokom v technológiách asistovanej reprodukcie (ART), ako je oplodnenie *in vitro*. Morfologické hodnotenie zahŕňa vyšetrenie základných charakteristík oocytu, ako je veľkosť, tvar a cytoplazmatické znaky. Morfologické hodnotenie kvality oocytov poskytuje cenné informácie o vývinovom potenciáli oocytov a môže pomôcť identifikovať najlepšie oocyty na oplodnenie. Morfologické hodnotenie je tiež nevyhnutné pri výbere najlepších oocytov na kryokonzerváciu. Kryokonzervácia je technika používaná na zmrazenie a uskladnenie oocytov pre budúce použitie. Kvalita oocytu v čase kryokonzervácie je rozhodujúca pri určovaní jeho životaschopnosti po rozmrazení. Preto je výber najkvalitnejších oocytov na kryokonzerváciu kľúčový na zabezpečenie ich úspešného použitia v budúcich cykloch ART (Combelles, Rasowsky, 2005; Goovaerts *et al.*, 2010).

Morfologické hodnotenie kvality oocytov zahŕňa vyšetrenie vlastností oocytu pod mikroskopom. Hodnotenie zvyčajne vykonáva embryológ, ktorý prešiel špecializovaným školením v oblasti hodnotenia oocytov. Hodnotenie zahŕňa vyhodnotenie veľkosti, tvaru a cytoplazmatických vlastností oocytu. Veľkosť a tvar oocytu sa hodnotí na základe vopred definovaných kritérií. Hodnotia sa aj cytoplazmatické znaky, ako je prítomnosť granúl, vakuol a homogenita cytoplazmy. Okrem vizuálneho hodnotenia možno na posúdenie kvality oocytov použiť aj iné metódy, ako je mikroskopia s polarizovaným svetlom a časozberné zobrazovanie. Mikroskopia v polarizovanom svetle môže poskytnúť informácie o meiotickom vretienku oocytu, ktoré je nevyhnutné pre správnu segregáciu chromozómov počas oplodnenia. Časozberné zobrazovanie môže poskytnúť informácie o vývinovom potenciáli oocytu sledovaním jeho rastu v reálnom čase.

Hodnotenia celkovej morfológie COCs patrí už od 19. storočia k najviac využíwanej metóde, ktorá na základe prísnych kritérií selektuje oocyty do troch kvalitatívnych typov a to (Obr.7):

- Prvý typ: jedná sa o najkvalitnejší typ. Kumulárne bunky sú veľké, rovnomerne rozmiestnené okolo oocyту a vytvárajú najmenej päť vrstiev. Ooplazma oocyту je transparentná a homogénna. V samotnom oocyte sledujeme prvé pólové teliesko.
- Druhý typ: v tomto type pozorujeme kumulárne bunky s priemernou veľkosťou. Vrstvy kumulárnych buniek sú menej kompaktné. Ooplazma je tmavá, mierne zrnitá.
- Tretí typ: vrstva kumulárnych buniek je omnoho tenšia a výrazne menej kompaktná. Ooplazma je tmavá a granulovaná. Tieto kumulusy oocyturné komplexy sú najnižšej kvality (Wang, Sun, 2007; Lasiene *et al.*, 2009; Bukowska *et al.*, 2012).

Hoci je morfológické hodnotenie cenným nástrojom pri hodnotení kvality oocytov má určité obmedzenia. Hodnotenie je subjektívne a môže sa líšiť medzi embryológmi. Štandardizácia hodnotiacich kritérií a školenie embryológov sú preto nevyhnutné na zabezpečenie konzistentnosti v procese hodnotenia. Morfológické hodnotenie tiež neposkytuje informácie o genetickej kvalite oocyту. Chromozomálne abnormality v oocyte môžu viesť k zlyhaniu implantácie alebo potratu. Preto môže byť na vyhodnotenie genetickej kvality oocyту potrebné ďalšie testovanie, ako je preimplantačné genetické testovanie (PGT) (Bukowska *et al.*, 2012).



Obrázok č. 7: Kvalita oocytov (ošípaná)  
 A. kvalitný oocyt; B. nekvalitný oocyt  
 (Zdroj: Alexandra R.Bartková, 2021)

## ***Vitálne hodnotenie***

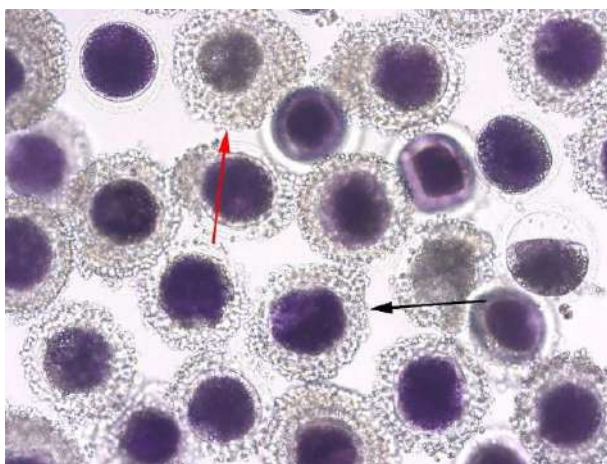
Vitálne farbenie oocytov je technika používaná na hodnotenie životaschopnosti a kvality oocytov vo výskume a v technológii asistovanej reprodukcie. Táto technika zahŕňa použitie farbív, ktoré môžu preniknúť cez membránu oocyту a zafarbiť cytoplazmu, čo umožňuje vizualizáciu rôznych štruktúr v oocyte. Hodnotenie kvality oocytov je v ART kľúčové, pretože môže významne ovplyvniť mieru úspešnosti postupov a metód v rámci IVF.

Na hodnotenie kvality oocytov je dostupných niekoľko farbív, vrátane trypanovej modrej, eozínu Y a propidium jodidu. **Trypanová modrá** je farbivo, ktoré farbí mŕtve alebo poškodené bunky na modro, vďaka čomu je užitočné na identifikáciu neživotaschopných oocytov. **Eozín Y** je farbivo, ktoré farbí cytoplazmu do ružova a je užitočné na hodnotenie zrelosti oocytov. **Propidium jodid** je farbivo, ktoré farbí jadrá mŕtvych alebo poškodených buniek na červeno, vďaka čomu je užitočné na identifikáciu neživotaschopných oocytov (Makarevich, 2012).

Ďalším vitálnym farbivom bežne používaným pri hodnotení kvality oocytov je **fluoresceíndiacetát** (FDA). FDA je netoxické farbivo, ktoré môže preniknúť cez membránu oocytov a intracelulárnymi esterázami sa premieňa na fluorescenčnú zlúčeninu. Táto konverzia vytvára zelenú fluorescenciu, ktorú je možné vizualizovať pod mikroskopom. Intenzita fluorescencie je úmerná metabolickej aktivite oocyту, čo z neho robí užitočný nástroj na hodnotenie kvality oocytov.

Jedným z najviac využívaných vitálnych farbív je **brilantná krezylová modrá** (BCB, Brilliant Cresyl blue). BCB sa bežne používa v bunkovej biológii na hodnotenie životaschopnosti buniek a mitochondriálnej aktivity. BCB je kationové farbivo, ktoré selektívne farbí živé bunky s neporušenou mitochondriálnou funkciou. Farbivo preniká cez plazmatickú membránu a hromadí sa v mitochondriách. Akumulácia BCB v mitochondriách indukuje aktívnu mitochondriálnu funkciu na stanovenie aktivity enzýmu glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH), ktorý je nevyhnutný pre bunkový metabolizmus a produkciu energie. Oocyty, ktoré zachytili BCB farbenie sa považujú za bunky s aktívnou mitochondriálnou funkciou a sú klasifikované ako BCB+ oocyty. Na druhej strane, oocyty, ktoré nezachytili farbenie, sa považujú za bunky s nízkou mitochondriálnou funkciou a sú klasifikované ako BCB- oocyty, teda tie menej kvalitné (Opiela, Kątska, Książkiewicz, 2013). Ako prvý metodiku na oocytoch ošipaných vyskúšal Roca *et al.* (1998). V prvých BCB experimentoch s oocytmí ošipaných bola používaná koncentrácia

26 $\mu$ M BCB. Neskôr sa ale zistilo, že je dostačujúca až o polovicu nižšia koncentrácia a teda 13 $\mu$ M BCB (Obr.8) (Coy *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2020).

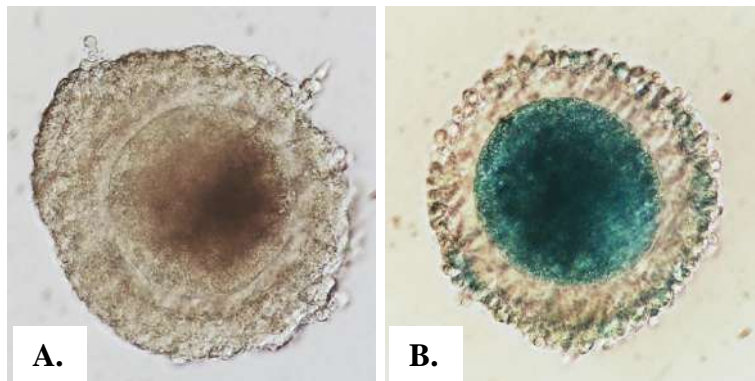


Obrázok č. 8: BCB+ a BCB- oocyty ošipanej. Čierna šípka znázorňuje BCB+ oocyt a červená šípka BCB- oocyt, zväčšenie 200x  
(Zdroj: Murín *et al.*, 2019)

**Lissamine Green B (LB)** inak aj lissamínová zelená predstavuje netoxické farbivo zložené zo syntetických kyselín. Toto neinvazívne farbenie slúži na detekciu poškodenia buniek a využíva sa v oftalmológii na vyhodnotenie integrity očnej membrány. V prípade reprodukčnej medicíny a embryotechnológii slúži LB farbenie ako rýchly, efektívny a objektívny spôsob vizualizácie poškodenia membrány oocytov *in vitro*.

LB funguje na princípe prenikania farbiva do poškodených kumulárnych buniek a cez membrány. Týmto spôsobom dochádza k vizuálnej selekcii zafarbených, poškodených kumulus-oocytárnych komplexov a nezafarbených, najkvalitnejších kumulus-oocytárnych komplexov (Obr.9). Plazmatická membrána oocytu hrá rozhodujúcu úlohu v jeho fertilizačnom potenciáli. Membrána musí byť neporušená a funkčná, aby umožnila spermiami preniknúť do oocytu a oplodniť ho. Farbenie lissamínovou zelenou pomáha vyhodnotiť integritu plazmatickej membrány farbením poškodených alebo narušených oblastí. Farbivo preniká membránou a farbí cytoplazmatickú membránu, čím odhaľuje akékoľvek oblasti poškodenia alebo narušenia. To umožňuje embryológom posúdiť kvalitu oocytu a určiť jeho fertilizačný potenciál (Dutta *et al.*, 2016; Bartková *et al.*, 2020).





Obrázok č. 9: Vitálne farbenie Lissamine Green B oocytov ošípanej  
 A. kvalitný oocyt - LB negatívny; B. nekvalitný oocyt - LB pozitívny  
 (Zdroj: Bartková et al., 2020)

### 2.5.2 Vplyv vitálnej selekcie na *in vitro* maturáciu oocytov

Hodnotenie kvality oocytov je kľúčové pre úspešné oplodnenie a ranú embryogenézu v rámci procesu *in vitro* produkcie embryí. V súčasnosti je primárnou metódou využívanou na hodnotenie kvality oocytov morfológické hodnotenie kvality, ktoré je však veľmi subjektívne a závisí na praxi manipulátora. Vzhľadom na subjektívny charakter tejto metódy si viaceré výskumných tímov kladlo otázku ako čo najefektívnejšie a najobjektívnejšie zhodnotiť kvalitu oocytov.

Aby sme mohli posúdiť kvalitu jednotlivých COCs, náš prístup spočíval v použití dvoch vitálnych farieb a to brilant krezylovej modrej (BCB) a lissamínovej zelenej B (LB). BCB je založené na hodnotení aktivity glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (G6PDH) ako markera cytoplazmatického zrenia. Tento enzým je syntetizovaný v BCB negatívnych (BCB-) oocytoch, ktoré sú stále vo fáze rastu. V oocytoch, ktoré ukončili svoj rast (BCB pozitívne oocyty, BCB+) tento enzým je inaktivovaný a oocyty sa preto sfarbia na modro.

Na základe morfológie sme izolovali len najkvalitnejšie COCs. Následne sme použili BCB farbenie, na základe ktorého sme klasifikovali rastúce oocyty (BCB-) a plne zrelé oocyty (BCB+). Na vyhodnotenie dozrievania oocytov sme sa rozhodli pre médium FLI. V našich laboratórnych podmienkach sme sledovali úspešnosť IVM v troch experimentálnych skupinách, a to v kontrolnej skupine, ktorá bola tvorená najkvalitnejšími COCs v rámci morfológického hodnotenia. V BCB- skupine, ktorá bola

tvorená negatívne sfarbenými COCs. Poslednou skupinou bola BCB+ tvorená morfológicky najkvalitnejšími COCs, ktoré vykazovali pozitívne BCB sfarbenie. Celkovo sme analyzovali 450 COCs v každej experimentálnej skupine. V rámci kontrolnej skupiny sme pozorovali MII fázu v 89% oocytov. V rámci BCB- skupiny v rámci 39,11% a v rámci BCB+ v 79,7% (Tab. 2, Graf 2).

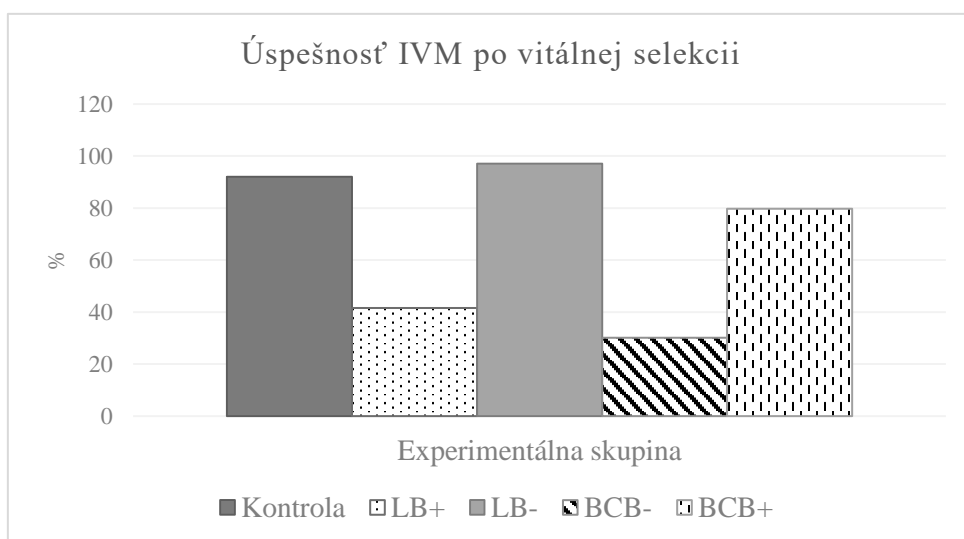
LB je taktiež neškodné farbivo, ktoré sa pôvodne používalo v roku 1990 na identifikáciu poškodenia buniek. Funkčnosť LB závisí od schopnosti farbiva prenikať cez poškodené bunkové membrány. Kim *et al.* v roku 2000, uskutočnili štúdiu demonštrujúcu úspešné farbenie králičích a ľudských rohovkových epiteliálnych buniek pomocou LB *in vitro*. Táto konkrétna aplikácia LB potvrdila svoj bezpečný profil odhalením absencie karcinogénnych alebo toxických účinkov.

Po vyhodnotení morfológie sme použili LB na identifikáciu COCs najvyššej kvality, ktoré sme následne využili pre naše experimenty. Na vyhodnotenie dozrievania oocytov sme sa rozhodli pre využitie maturačného média FLI. V našich laboratórnych podmienkach sme sledovali úspešnosť IVM v troch experimentálnych skupinách, a to v kontrolnej skupine, ktorá bola tvorená najkvalitnejšími COCs v rámci morfológického hodnotenia. LB+ skupiny, ktorá bola tvorená pozitívne sfarbenými COCs, ktoré z morfológického hodnotenia dosahovali najvyššiu kvalitu. Poslednou skupinou bola LB- tvorená morfológicky najkvalitnejšími COCs, ktoré vykazovali negatívne LB sfarbenie. Celkovo sme zanalyzovali 750 COCs v každej experimentálnej skupine. V rámci kontrolnej skupiny sme pozorovali MII fázu v 92% oocytov. V rámci LB+ skupiny v rámci 41,6% a v rámci LB- v 97,1% (Tab. 2, Graf 2).

V rámci porovnania využitia BCB a FLI média dosiahli naše výsledky lepšie hodnoty v rámci porovnania s Murín *et al.* (2019). Využitím BCB a DMEM média sledovali úspešnosť dosiahnutie metafázy II v 49,52% v rámci BCB+ a 13,68% v rámci BCB-. V roku 2016 boli podobné výsledky zistené pri použití LB selekcie oocytov. Dutta *et al.* (2016) uviedli 79,9 % úspešnosť dosiahnutia štádia MII v rámci ich kontrolnej skupiny, čo je porovnateľné s výsledkami získanými pri použití podávania DMEM na dozrievanie. Porovnaním experimentálnych skupín na základe LB selekcie možno dospieť k záveru, že obe štúdie pozorovali značné rozdiely v dozrievaní LB- verusus LB+ oocytov (84,7% vs. 62,3%). Naše vlastné experimenty taktiež potvrdili pozitívny vplyv výberu LB na úspešné výsledky maturácie v porovnaní s využitím BCB farbenia.

Tabuľka č.2: Úspešnosť dosiahnutia MII fázy v jednotlivých experimentálnych skupinách oocytov ošípanej (K – kontrolna skupina)

Experimentálna skupina	Počet oocytov	Počet oocytov v MII
K	750	690 (92%)
LB+	750	312 (41,6%)
LB-	750	728 (97,1%)
BCB-	450	176 (30,11%)
BCB+	450	359 (79,7%)



Graf č.2: In vitro maturácia oocytov ošípanej po vitálnej selekcii pomocou LB a BCB

### 2.5.3 Vplyv vitálnej selekcie na cytoplazmatické dozrievanie oocytov

V rámci maturácie oocytov je okrem jadrového dozrievania sprevádzaného zmenami na úrovni jadra dôležité aj cytoplazmatické dozrievanie. Jednou z metódik využitých v našich laboratórnych podmienkach bola analýza distribúcie štruktúry mitochondrií prostredníctvom Mitotracker Orange.

Mitochondrie sme analyzovali v troch experimentálnych skupinách, pričom každá skupina bola tvorená 150 oocytmi. V 0-tej hodine, čiže hneď po izolácii oocytov, sme sledovali najväčšie zastúpenie homogénnej distribúcie, ktorú sme v prípade kontrolnej skupiny detegovali v 70,7% oocytov, LB-skupine v 74,8% oocytov a v LB+ skupine v 70,6% oocytov. Počas IVM vo

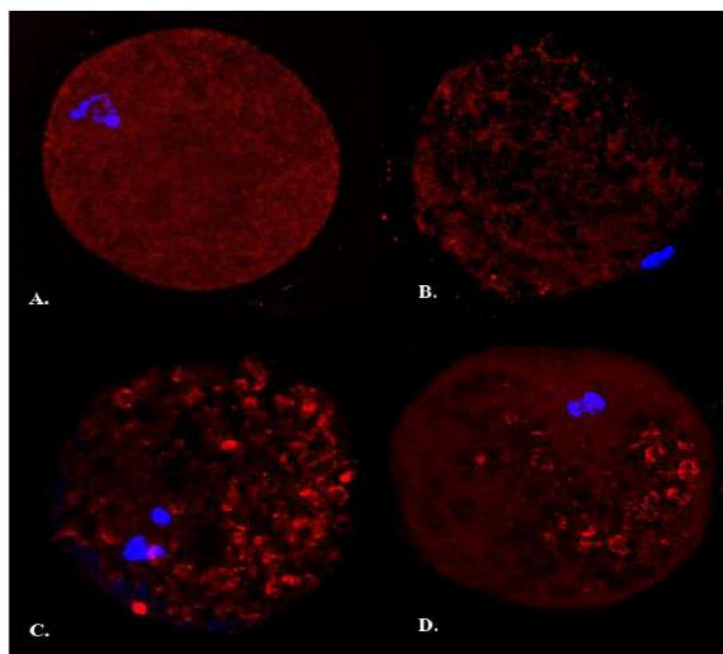
FLI médiu bol vo všetkých troch skupinách sledovaný nárast granulóznej distribúcie, pričom v kontrolnej skupine a LB- skupine sme detegovali klastrovanie už po 24 hodinách (CG 7,7%; LB- 8,9%). Po 44 hodinách IVM došlo v týchto dvoch experimentálnych skupinách k výraznému zníženiu homogénnej distribúcie, nárastu granulóznej a klastrovej distribúcie. V prípade LB+ skupiny sme sledovali menší nárast granulóznej distribúcie, výskyt klastrovania, pričom homogénna distribúcia prevažovala počas celej IVM (Obr.10, Tab. 3).

Podľa Nishiho *et al.* (2003) a Tornera *et al.* (2004) je homogénna distribúcia mitochondrií v cytoplazme bežne prítomná práve v štádiu GV, čiže v 0-tej hodine IVM. V priebehu maturácie sa však rozširuje prítomnosť heterogénnej distribúcie, ktorá je najčastejšia v oocytoch v štádiu MI a MII. Zvýšená úroveň agregácie mitochondrií okolo jadra naznačuje úspešnú IVM oocytov, čo sme sledovali práve v prípade kontroly a LB-. V prípade výsledkov pozorovaných v LB+ skupine môžeme povedať, že ako uviedol Wildeing *et al.* (2001), menej kvalitné oocyty a embryá sa vyznačujú vyšším podielom homogénnej distribúcie mitochondrií. Zaujímavým poznatkom bola detekcia tzv. klastrovania.

Naše výsledky možno porovnať s výsledkami v rámci vitálnej selekcie prostredníctvom BCB farbenia oocytov. V rámci BCB selekcie Egerszegi *et al.* (2010) uviedol, že počas IVM sa homogénne usporiadanie mitochondrií zmenilo na granulóznu formu. V prípade BCB- oocytov potvrdili nízku úroveň mitochondriálnej aktivity bez akejkoľvek zmeny počas 44 hodín maturácie. Táto časť koreluje s našimi výsledkami, kde sme v LB+ skupine sledovali konštantné zastúpenie homogénnej distribúcie. Výsledky BCB+ oocytov, ktoré by mali korelovať s našou LB- skupinou sú však odlišné. V našom prípade naše zistenia korelujú skôr s výsledkami experimentov *in vivo* na ošípaných (Torner *et al.*, 2004), pri ktorých bola respiračná aktivita a zmena distribúcie mitochondrií úmerná priebehu IVM. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že BCB+/LB- oocyty počas maturácie zvyšujú svoju respiračnú aktivitu možnou zmenou mitochondriálnej distribúcie, ktorú využívajú na zabezpečenie ATP potrebného pre energeticky náročné procesy ako je GVBD, následná kondenzácia chromatinu a dosiahnutie MII. Naopak, BCB-/LB+ oocyty nevykazovali žiadne výrazné zmeny v metabolickej aktivite či distribúcií mitochondrií, čo môže súvisieť so skutočnosťou, že len malý podiel týchto oocytov dosiahne MII štádium.

Tabuľka č.3: Distribúcia mitochondrií v jednotlivých experimentálnych skupinách oocytoch ošípanej

Experimentálna skupina	Čas	Počet oocytov	Distribúcia mitochondrií		
			Homogénna distribúcia	Heterogénna distribúcia	Klastrovanie
Kontrola	0 hod.	150	106 (70,6%)	44 (29,3%)	0
	24 hod.	150	64 (42,6%)	74 (49,3%)	12 (8%)
	44 hod.	150	46 (30,6%)	69 (46%)	35 (23,3%)
LB+	0 hod.	150	112 (74,6%)	38 (25,3%)	0
	24 hod.	150	56 (37,3%)	80 (53,3%)	14 (9,3%)
	44 hod.	150	32 (21,3%)	70 (46,6%)	48 (32%)
LB-	0 hod.	150	106 (70,6%)	44 (29,3%)	0
	24 hod.	150	102 (68%)	48 (32%)	0
	44 hod.	150	100 (66,6%)	42 (28%)	8 (5,3%)



Obrázok č. 10: Distribúcia mitochondrií v oocytoch ošípanej v priebehu IVM vo FLI;

A. Homogénna distribúcia v 0h B. Heterogénna distribúcia v 24h IVM

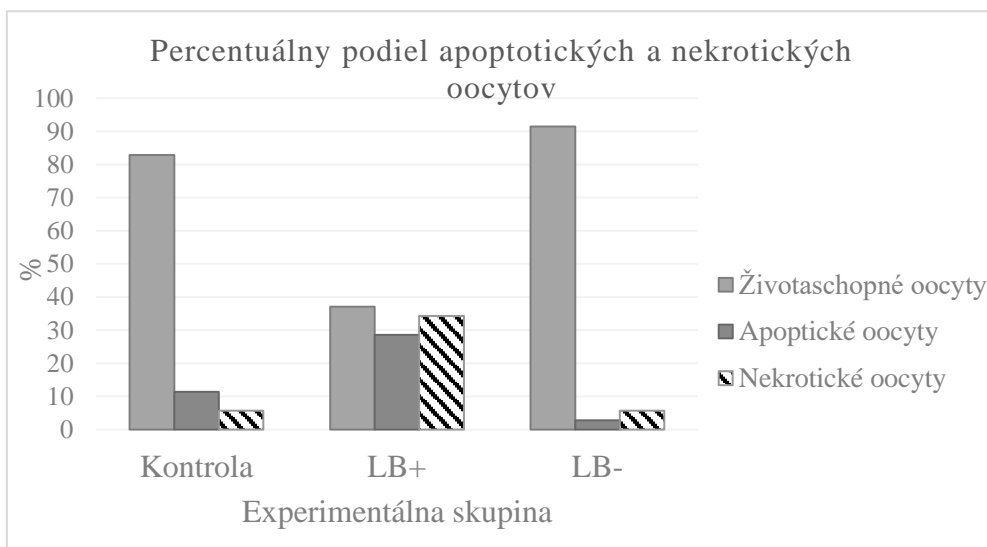
C.D Klastrovanie mitochondrií v 44h IVM

(Zdroj: Bartková, 2021)

## 2.5.4 Vplyv vitálnej selekcie na detekciu apoptózy

Vzhľadom na získané výsledky ohľadom LB+ skupiny, sme sa rozhodli analyzovať prítomnosť apoptózy. Apoptóza je rozhodujúci biologický proces, ktorý hrá významnú úlohu pri normálnom vývoji, homeostáze tkanív a imunitnej odpovedi. Schopnosť presne detegovať a kvantifikovať apoptózu je dôležité nie len vo výskume, ale aj v klinickom prostredí. Farbenie annexinom V a propídium jodidom (PI) je široko používaná metóda na detekciu apoptózy vzhľadom nato, že annexin V má vysokú afinitu k fosfatidylserínu (PS), ktorý je exponovaný na vonkajšom cípe plazmatickej membrány počas zahájenia apoptózy. Na druhej strane PI je farbivo viažuce DNA, ktoré dokáže rozlíšiť medzi apoptotickými a nekrotickými bunkami na základe ich integrity.

Na základe dvojitého farbenia sme získali výsledky, kde sme v prípade kontrolnej skupiny detegovali 11,4% skorých apoptotických oocytov a 5,7% nekrotických. V prípade druhej experimentálnej LB- sme sledovali prítomnosť skorých apoptotických oocytov v 2,8%, pričom podiel nekrotických oocytov dosiahol 5,7%. V tretej experimentálnej LB+ skupine boli skoré apoptotické oocyty zastúpené v 28,6% a nekrotické oocyty v podiele 34,3% (Graf 3). Khaki *et al.* (2014) sa vo svojej štúdií venovali vplyvu leptínu na IVM a priebeh apoptózy oocytov izolovaných z bizónich vaječníkov. V prípade kontrolnej skupiny pomocou rovnakého dvojitého farbenia sledovali apoptózu v 9,8% oocytov, čo sa približuje našim výsledkom. Zhang *et al.* (2020) detegoval apoptózu len v 3,53% kontrolných oocytoch, čo koreluje s našou druhou experimentálnou skupinou.



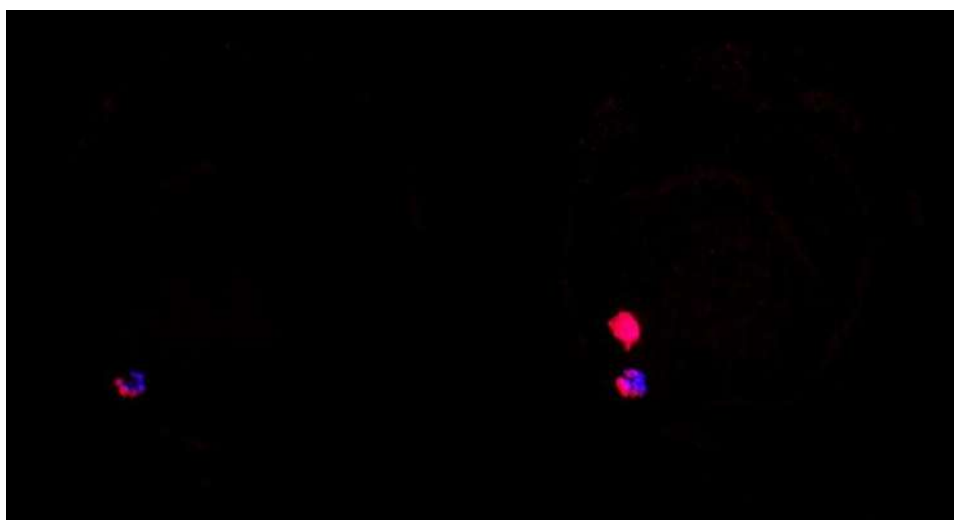
Graf č. 3: Úspešnosť detekcie apoptózy v oocytoch ošípanej

Získané výsledky sme potvrdili aj TUNEL metódou. Test TUNEL je založený na schopnosti terminálnej deoxynukleotidyltransferázy (TdT) značiť 3'-hydroxylové konce fragmentov DNA generovaných počas neskorých štádií apoptózy. TdT katalyzuje adíciu značených nukleotidov na voľné 3'-OH konce zlomov DNA, čo vedie k inkorporácii fluorescenčných alebo chromogénnych značiek. To umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu apoptotických buniek pod mikroskopom alebo inými detekčnými metódami (Tab.4, Obr. 11).

TUNEL farbenie sme zrealizovali po 44 h IVM a celkovo opakovali päťkrát. Naše výsledky sa zhodovali s výsledkami s využitím dvojitého farbenia Annexin V a PI. Aplikáciou Click-it reakcie sme v prípade kontrolnej skupiny detegovali apoptózu v 10,3%. V experimentálnych skupinách, vzniknutých po vitálnom farbení LB, sme v prípade LB- oocytov sledovali apoptózu v 1,8% a v LB+ oocytov až v 30,5%.

*Tabuľka č.4: Detekcia apoptózy v jednotlivých experimentálnych skupinách*

Experimentálna skupina	Počet oocytov	Negatívna detekcia	Pozitívna detekcia
Kontrola	58	52 (89,7%)	6 (10,3%)
LB+	55	38 (69,5%)	17 (30,5%)
LB-	50	49 (98,2%)	1 (1,8%)



*Obrázok č. 11: Pozitívne TUNEL značenie LB+ oocytov ošípanej (Zdroj: Bartková, 2021)*

### 2.5.5 Vplyv vitálnej selekcie na expresiu génov

Stanovenie expresse génov LB oocytov prostredníctvom RT-qPCR sme zamerali na vybrané gény súvisiace s kvalitou a úspešnou maturáciou COCs (Tab. 5). Okrem toho sme zvažili aj gény zodpovedné za komunikáciu medzi oocytmi a kumulárnymi bunkami či apoptózu, ktorej pozitívne značenie sme analyzovali v rámci imunocytochemického značenia.

Tabuľka č.5: PCR mix

Zložka	Objem
H <sub>2</sub> O	4,4 µl
QIAGEN OneStep RT-qPCR pufor	2 µl
dNTP	0,4 µl
Forward/ reverse primer	0,2/0,2 µl
EVA green	0,4 µl
enzýmová zmes QIAGEN OneStep RT-qPCR	0,4 µl
RNA	2 µl
<b>Celkový objem 1 reakčnej zmesi</b>	<b>10 µl</b>

Počas IVM sme v oboch oocytárnych skupinách sledovali rozdielnú expresiu *GDF9* a *BMP15*. Ukázalo sa, že počas IVM dochádza k zníženiu expresse *BMP15* a *GDF9* (Zhu *et al.*, 2008). V priebehu maturácie klesala expresia *GDF9* konkrétne v LB+ oocytoch. Tieto výsledky sú v súlade s Li *et al.* (2008), ktorí taktiež sledovali postupný pokles expresse tohto génu počas maturácie. Zhu *et al.* (2008) realizovali analýzu časových a priestorových vzorcov génovej expresse *GDF9* a zistili, že bola vysoko transkribovaná v GV oocytoch, ale počas IVM sa postupne znižovala. V LB- oocytoch sme po 24h maturácii zaznamenali zvýšenie expresse *GDF9*. Predpokladáme, že toto zvýšenie expresse by mohlo súvisieť s výrazným zväčšením kumulárnej vrstvy. V rámci *BMP15* prítomného v našich vzorkách sme po 24h sledovali mierny nárast expresse, ktorá sa však následne znížila. Predpokladáme, že tento počiatočný nárast môže súvisieť taktiež s expanziou kumulu počas IVM. Podobne ako my, tak aj Li *et al.* (2008) a Assou *et al.* (2010) pozorovali mierné zvýšenie *BMP15* počas IVM.

*GJA4* bol identifikovaný v oocytoch ako súčasť procesu intracelulárnej komunikácie s bunkami kumulu. Tento proteín uľahčuje pasívnu difúziu malých molekúl, ako sú ióny, metabolity a živiny. Efektívna obojsmerná komunikácia medzi bunkami oocytu a kumulu je rozhodujúca pre expanziu kumulu a úspešné dozrievanie oocytov (Kempisty *et al.*, 2014). V rámci



expresie tohto génu sme pozorovali počiatkové zvýšenie a nasledovné zníženie expresie v LB-oocytoch po 24h IVM. Pokiaľ ide o LB+ oocyty, úroveň expresie *GJA4* sa v 24h znížila, no po 44h sa významne zvýšila. Sasseville *et al.* (2009) potvrdili, že sa expresia *GJA4* zvýši na začiatku maturácie. No medzi 18 a 22 hodinami klesne a zostane nízka až do konca IVM. Naše výsledky naznačujú, že rozdielnu expresiu *GJA4* v prípade LB+ oocytov by mohla vysvetliť nedostatočná expanzia buniek kumulu. Môže to byť spôsobené tým, že COCs majú nižšiu kvalitu, čo vedie k tomu, že oocyty vyžadujú viac živín distribuovaných kumulárnymi bunkami.

Kvalita oocytov priamo súvisí s bunkovou smrťou, čo bolo overené dvojitým farbením a TUNEL. Rodina Bcl-2 bunkových proteínov (B-bunková leukémia/ lymfóm-2), ktoré hrajú úlohu v regulačnej dráhe mitochondriálnej apoptózy, sú jednou z najvýznamnejších skupín regulátorov apoptózy. Funkciou *BCL2* je zabrániť apoptóze a udržať prežitie buniek reguláciou uvoľňovania cytochrómu C z mitochondrií (Yang *et al.*, 1997). Na druhej strane *BAX* pôsobí ako apoptotický proteín, ktorý môže inhibovať pôsobenie *BCL2* (Jurgensmeier *et al.*, 1998). V dôsledku toho je určovanie zraniteľnosti voči apoptotickým signálom v bunkách závislé od rovnováhy medzi pro- a antiapoptickými členmi v rámci tejto rodiny. Na základe daného pomeru možno usúdiť, že LB+ oocyty po 44h IVM nadmernou expresiou génu *BAX* podľahli apoptóze. Porovnateľný pomer bol pozorovaný v procese dozrievania hovädzích COCs, ako uvádza Boldura *et al.* (2016).

V prípade vzoriek buniek kumulu sme pozorovali identické výsledky týkajúce sa pomeru *BAX/BCL2* ako pri vzorkách oocytov. Predpokladáme, že proces apoptózy vo vzorkách LB+ je spustený signálom z buniek kumulu, ktorý je potom prenášaný do oocytov prostredníctvom zvýšenej expresie gap junctions proteínov.

Porovnaním expresie *GJA10* a *GJC1* je možné sledovať rozdiel a to, že v prípade LB- oocytov je expresia týchto génov nižšia. Tak ako Li *et al.* (2015) a Shao *et al.* (2015), tak aj my sme preukázali, že CCs zrelých oocytov exprimujú nižšie hladiny týchto génov.

Druhým významným výsledkom v rámci porovnania LB oocytov bola expresia *ITGAV*, proteínu nevyhnutného pre integrínovú a aktínovú cytoskeletálnu signalizáciu. Tento proteín možno nájsť vo folikulárnej bazálnej membráne, ako aj v okolí folikulárnych buniek. Jeho funkcia zahŕňa uľahčenie prichytenia buniek k matrici a prenos mechanických a chemických signálov (Monniaux *et al.*, 2006; Peddinti, Memili, Burgess, 2010). Tieto signály následne prispievajú k regulácii aktivity rôznych bunkových

komponentov, ako sú cytoplazmatické kinázy, receptory rastových faktorov a iónové kanály, ktoré sú zodpovedné za riadenie organizácie vnútrobunkového aktívneho cytoskeletu. Jeho expresia sa v našich vzorkách po 24h IVM zvýšila, čo môže súvisieť s expanziou kumulu a maturáciou oocyty. Preto bolo toto zvýšenie expresie výrazne vyššie v prípade vysoko kvalitných LB-oocytov. Po 44h IVM boli hladiny expresie znížené v oboch skupinách.

### 2.5.6 Vplyv vitálnej selekcie na proteomický profil oocytov

Na základe výsledkov v rámci expresie génov sme zrealizovali aj proteomické hodnotenie LB oocytov. Proteomika zahŕňala komplexnú analýzu proteínov exprimovaných oocytom, ktorá poskytuje cenné informácie o bunkových procesoch, mechanizmoch ochorení či potenciálnych terapeutických cieľoch. V tejto časti výskumu sme sa rozhodli identifikovať proteíny, ktoré sa diferencielne exprimujú počas dozrievania LB oocytov. Kvôli menšiemu množstvu vstupného biologického materiálu sa použil off-gélový proteomický prístup, ktorý prostredníctvom tandemovej hmotnostnej spektrometrie zanalyzuje celý proteínový extrakt.

V kompletom zozname identifikovaných proteínov izolovaných z LB- (n= 67) a LB+ (n= 19) oocytov sme sa zamerali na 25 proteínov (Tab.6). Táto skupina proteínov bola dôležitá hlavne pre procesy oplodnenia, transkripcie, translácie a posttranslačných úprav. Okrem zhodných proteínov *zona pellucida* (ZP2-ZP4), ktoré sú rozhodujúce pre väzbu spermií, akrozómovú reakciu a prevenciu polyspermie, sme pozorovali, že oocyty skupiny LB- vykazujú zvýšenú variabilitu proteínov (n=22) zapojených hlavne do procesov génovej expresie. V porovnaní LB- a LB+, sme v LB+ oocytoch detegovali len 6 zhodných proteínov s rovnakými funkciami. Pri LB+ oocytoch môžeme predpokladať, že tieto proteíny buď neboli vôbec exprimované v čase hodnotenia alebo ich množstvá boli pod minimálnou úrovňou detekčného limitu nami využitých nástrojov. Tieto získané dáta a rozdiely v proteínovom zložení kvalitatívne odlišných experimentálnych skupín oocytov (LB- vs. LB+) zodpovedajú tým, ktoré pozorovali Ellederova *et al.*(2004) v oocytoch v štádiu ošipaných GV, MI a MII.

Na základe hypotézy, že s narastajúcim časom maturácie dochádza k zvýšeniu kvality a vývinovej kompetencie oocytov zo štádia GV do MII, sme na analýzu oocytov použili komparatívny proteomický prístup. Tento prístup je vhodný na charakterizáciu kandidátskych proteínov, ktoré sa diferencielne exprimovali počas IVM. Výsledky proteomického hodnotenia LB oocytov ukázali, že niektoré z identifikovaných proteínov boli viac

exprimované v kvalitných oocytoch v MII štádiu ako v GV oocytoch. Podobné výsledky dosiahol tím Vitale *et al.* (2007) a Virant-Klun *et al.* (2016), ktorí sledovali proteomický profil oocytov (myš, človek) počas maturácie *in vitro*. V obidvoch prípadoch proteomická analýza oocytov v GV a MII štádiu identifikovala výber jedinečných proteínov, ktoré sa javili byť rozdielne regulované počas dozrievania oocytov.

Tabuľka č. 6: Výber proteínov proteomickej analýzy (Bartková, 2021)

Funkcia	Prístupové číslo <sup>*</sup>	Názov proteínu	MW (kDa)	LB-	LB+
zona pellucida proteíny	P42099	Zona pellucida sperm-binding protein 2		+	+
	P42098	Zona pellucida sperm-binding protein 3	46,20	+	+
	Q07287	Zona pellucida sperm-binding protein 4	59,29	+	+
enzymatická aktivita	A0A287A1A8	Acyl-coenzyme A oxidase	66,47	+	+
	F1SUQ9	Protein-arginine deiminase type-6	76,87	+	+
	I3LBD5	Serine/threonine-protein kinase 10	112,01	+	+
	Q9GL50	Metalloreductase STEAP1	39,89	+	-
	F1SAN1	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	27,70	+	-
RNA Pol II and RNA Pol III regulačná aktivita	F2Z5J6	Transcription initiation factor IIB		+	-
	F1SPQ0	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	122,58	+	-
	A0A287BRQ3	ETS domain-containing protein	55,80	+	-
	F1RUB7	Transcriptional regulator Kaiso	74,24	+	-
	A0A286ZZH2	Storkhead box 1	110,23	+	+
	A6N8P5	Multiprotein bridging factor 1	16,38	+	-
	A0A287B954	Transcriptional repressor p66-beta isoform X1	65,21	+	-
	I3L8J9	Zinc finger protein 77	58,76	+	+
	A0A286ZMX7	ANK_REP_REGION domain-containing protein	116,67	+	-
	A0A286ZJG5	GYF domain-containing protein	151,40	+	-
I3LLE2	GLTSCR1 domain-containing protein	147,02	+	-	
chaperone activity, protein folding, proteosyntéza	P63053	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14,71	+	+
	I3LQ79	Major vault protein	99,64	+	+
	F1SL22	von Willebrand factor	321,78	+	+
	A0A287BIL8	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	72,22	+	-
	A0A287AQK7	Heat shock protein HSP 90-alpha	90,58	+	-
	A0A286ZK74	RRM domain-containing protein	25,28	+	-

### 3. Oplodnenie

Oplodnenie je proces, pri ktorom dochádza k spojeniu samčej a samičej pohlavnej bunky a vytvorení zygoty. Tento proces je nevyhnutný pre pohlavnú reprodukciu u väčšiny organizmov, vrátane cicavcov. K oplodneniu dochádza prostredníctvom komplexnej série udalostí, ktoré zahŕňajú fúziu gamét a aktiváciu rôznych bunkových procesov. Oplodnenie u cicavcov prebieha v najširšej časti vajcovodu, konkrétne v ampulárnom úseku (Waaserman *et al.*, 2005; Okabe, 2013).

Vzhľadom na komplexnosť tohto procesu je možné definovať jeho jednotlivé časti na :

- **Tvorba gamét:** Pred samotným oplodnením dochádza ku gametogenéze, čiže tvorbe samičích a samčích pohlavných buniek. U samcov prebieha gametogenéza v semenníkoch a výsledkom je produkcia spermíí. U samíc prebieha gametogenéza vo vaječníkoch a výsledkom je produkcia oocytov. Oba procesy zahŕňajú meiózu, čiže typ bunkového delenia, ktorý znižuje počet chromozómov v každej bunke na polovicu. Počas meiózy sa homológne chromozómy spárujú a vymieňajú si genetický materiál prostredníctvom procesu nazývaného crossing over. Výsledkom je genetická diverzita gamét, ktorá zabezpečuje prežitie druhu. Keď sa gaméty vytvoria, uvoľnia sa zo svojich príslušných štruktúr a nasleduje ich transport a aktivácia.

- **Transport a aktivácia gamét:** Transport spermie je náročný proces, ktorý uľahčujú viaceré mechanizmy samičej reprodukčnej sústavy, ako je viskozita hlienu krčka maternice, kontrakcie maternice a vajcovodov, či chemické signály uvoľneného a oplodnenia schopného oocytu. Len malá časť spermíí sa úspešne dostane k blízkosti oocytu a samotný proces oplodnenia tak môže trvať niekoľko hodín až niekoľko dní. Po dosiahnutí úrovni oocytu dochádza k aktivácii gamét charakterizovanou štruktúrnymi a molekulárnymi zmenami na úrovni metabolizmu, čo umožňuje preniknutiu spermie cez ochranné vrstvy oocytu.

- **Fúzia gamét a skorá embryogenéza:** Nastáva po preniknutí spermie do oocytu. Membrány oboch gamét sa spoja, čo umožní zmiešanie genetického materiálu za vzniku diploidnej bunky, zygoty. Fúzia gamét spúšťa sériu bunkových dejov, ktoré zabraňujú vstupu ďalších spermíí do oocytu, čím sa zabránení polyspermii. Po oplodnení zygoty podstupuje deleniu buniek nazývaného ryhovanie. Toto delenie

vedie k vytvoreniu embrya, z ktorého sa postupne vyvinie zrelý organizmus. U cicavcov sa embryo implantuje do steny maternice, kde dostáva živiny a podporu z tela matky.

### 3.1 Morfologické aspekty oplodnenia

Oplodnenie je zložitý proces, ktorý zahŕňa fúziu jadra spermie a jadra oocytu za vzniku primárneho jadra embrya. Dôležitou úlohou spermie v tomto procese je okrem prínosu haploidného genómu aj prínos centriolu, ktorý spôsobuje rekonštrukciu zygotického centrozómu (Obr. 12).

K oplodneniu dochádza vo vajcovodoch, napr. v prípade ošípanej k oplodneniu dochádza v *isthmus* vajcovodu, pričom oocyty dosahujú toto miesto asi 45 min. po ovulácii (Hunter, 1974). Základným krokom je maturácia pohlavných buniek. Zrelý oocyt je vylúčený z folikulu v procese ovulácie, zatiaľ čo zrelé spermie sú uložené v nadsemenníkoch až do ejakulácie. Po ejakulácii sú spermie vystavené samičíemu reprodukčnému traktu, čím dochádza k ich aktivácii a sérií procesov zodpovedných za získanie schopnosti oplodnenia.

Prvým aktivačným krokom je získanie motility, kedy chvost spermie začne kmitať a poháňať ju smerom k oocytu. Spermie tak prechádzajú cez maternicu až do vajcovodu, pričom získavajú schopnosť oplodnenia v procese nazývanom kapacitácia (Stival *et al.*, 2016).

Počiatkové spojenie oocytu a spermie je sprostredkované glykoproteínmi oboch gamét. Na povrchu *zona pellucida* je množstvo vysoko špecifických receptorov, ktoré zabezpečujú druhovo-špecifické spoznávanie gamét a spustenie akrozómovej reakcie t.j. uvoľnenie enzýmov narušujúcich *zona pellucida* (Bailey, 2010).

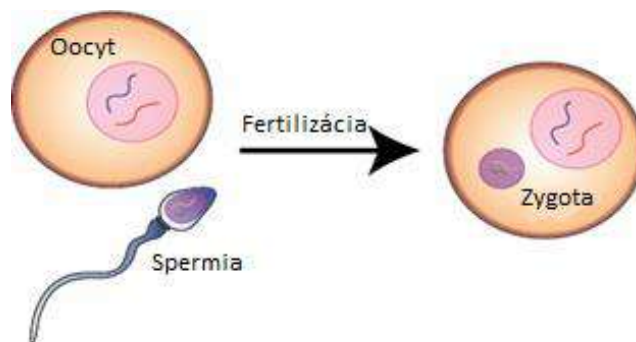
Akrozómová reakcia je rozhodujúcim krokom pri oplodnení, pretože umožňuje spojenie medzi spermiou a vajíčkom. Akrozóm predstavuje výbežok umiestnený na prednom hrote spermii. Pri kontakte s oocytom prechádza akrozóm sériou presne definovaných zmien, ktoré vedú k uvoľneniu enzýmov uľahčujúcich prienik cez ochranné vrstvy oocytu. Akrozómovú reakciu podporuje prísun vápnika a pozostáva z fúzie plazmatickej membrány s vonkajšou akrozomálnou membránou za vzniku mikrovezikul. V nich sa vytvoria otvory, cez ktoré sa uvoľňuje enzýmový obsah akrozínu. Akrozín má hydrofóbne vlastnosti, ktoré sú dôležité pri membránovej afinite (Töpfer-Petersen *et al.*, 1990). Pôsobením akrozínu sú uvoľňované glykoproteíny zo *zona pellucida* a spojenie spermie s vajíčkom je stabilizované.

Fúzia spermíí je následná udalosť, ktorá nastáva po akrozómovej reakcii. Zahŕňa fúziu plazmatických membrán spermíí a oocytu (Flesch, Gadella, 2000). Táto fúzia umožňuje prenos genetického materiálu zo spermie do vajíčka, čím sa iniciuje tvorba zygoty. Zygota obsahuje kombináciu genetického materiálu od oboch rodičov a predstavuje začiatok embryonálneho vývoja. Po prieniku *zona pellucida* sa membrána spermie spája s *membrana vitallina* oocytu. Proti vniknutiu ďalších spermíí vytvára vajíčko „polyspermatiký blok“ t.j. do perivitelinného priestoru je vylúčený obsah kortikálnych granúl. Splynutie gamét spôsobí zvýšený prísun  $Ca^{2+}$ , čím sa uvoľní obsah kortikálnych granúl, pričom pokračuje polymerizácia *zona pellucida* (Cran, Cheng, 1985). Tento proces prebieha postupne, takže sa môže stať, že do oocytu vniknú ďalšie spermie a tým vzniká polyploidný oocyt (Hunter, 1991). Tento sprievodný jav je pozorovaný aj pri ošípaných a spôsobuje neplodnosť (Stival *et al.*, 2016).

S vniknutím hlavičky spermie do vajíčka sa spúšťa druhé meiotické delenie a v priebehu niekoľkých hodín po fúzii gamét vznikajú funkčné prvojadrá (Cran, Cheng, 1985, Laurinčík *et al.*, 1996, 1997, 1998). Pri ošípaných je viditeľné samčie a samičie prvojadro asi po 8 hodinách (Ding *et al.*, 1992). K spojeniu týchto prvojadier dochádza 14-16 hodín po fúzii gamét (Laurinčík *et al.*, 1994).

Krátko po splnutí spermie s vajíčkom začínajú reagovať cytoplazmatické faktory s chromozómami spermie, pričom dochádza k rôznym molekulárnym zmenám a čiastočnej degradácii jadrových proteínov. V tomto štádiu sa tvorí už aj spomínaný MPGF faktor (male pronucleus growth factor/faktor kontrolujúci vývoj samčieho prvojadra), ale aj faktor zodpovedný za aktiváciu spermíí (Motlík, Fulka, 1986).

Zygota prechádza sériou bunkových delení, známych ako štiepenie, za vzniku mnohobunkového embrya. Tieto skoré štádiá vývoja sú rozhodujúce pre vytvorenie základného telesného plánu a začatie diferenciácie rôznych typov buniek. Počas tohto procesu prechádza zygota morfológickými zmenami, ako je kompaktizácia a tvorba blastomér. Kompaktizácia zahŕňa zúženie kontaktov bunka-bunka, čo vedie k vytvoreniu kompaktnej hmoty buniek. Následne sa delením dosiahne finálne štádium blastocysty, charakterizované tvorbou vnútornej bunkovej hmoty a vonkajšej vrstvy buniek nazývanej trofoblast. Tieto morfológické zmeny sú nevyhnutné pre implantáciu a následný embryonálny vývin (Flesch, Gadella, 2000; Schiott *et al.*, 2004).



Obrázok č. 12: Fertilizácia a formovanie zygoty  
(Zdroj: Upravené z Nomikos, Kashir, Lai, 2017)

### 3.2 Aktivácia oocytov

Aktivácia oocytov je dôležitý a prísne regulovaný proces potrebný pre obnovenie a úspešné ukončenie druhého meiotického delenia. Vo všeobecnosti platí, že k aktivácii oocyту dochádza po zvýšení intracelulárnej koncentrácie katiónov vápnika (Miyazaki, Ito, 2006). Uvoľnenie intracelulárnych zásob  $\text{Ca}^{2+}$  tak predstavuje kľúčový faktor zodpovedný za reguláciu širokej škály procesov a bunkových funkcií vedúcich k zahájeniu embryogenézy (Hojnik, Kovačič, 2019).

V *in vivo* prostredí prebieha aktivácia oocytov počas oplodnenia. Po naviazaní a fúzii gamét dochádza k aktivácii oocyту prostredníctvom fosfolipázy C, konkrétne jej izoformy zeta (PLC  $\zeta$ ). V *in vitro* podmienkach prebieha aktivácia prostredníctvom IVF techník alebo s využitím partenogenetickej aktivácie (Yeste, 2013).

#### 3.2.1 Aktivácia oocytov *in vivo*

Dosiahnutím oocytárnej zrelosti v metafáze II dochádza k zastaveniu delenia až do štádia oplodnenia. Jedným z rozhodujúcich krokov oplodnenia je aktivácia oocytu, ktorá predstavuje prirodzenú stimuláciu oocytu potrebnú pre zahájenie embryonálneho vývoja. V *in vivo* podmienkach dochádza k oplodneniu až po kapacitácii spermii. Kapacitácia je zložitý proces pozostávajúci z viacerých biochemických a fyziologických zmien ako je fosforylácia proteínov, iniciácia motility, narušenie membránových proteínov a zvýšenie koncentrácie katiónov vápnika (Aitken, Nixon, 2013). V dôsledku týchto zmien dochádza k výskytu fuzogénneho stavu plazmy spermii

a vonkajších akrozómových membrán, čo umožňuje vyvolanie akrozómovej reakcie (Fissore *et al.*, 2002).

Po úspešnom preniknutí spermie cez *zona pellucida* dochádza k interakcii spermatického proteínu Izumo1 a receptoru oocytov Juno (Bianchi *et al.*, 2014). V dôsledku tejto interakcie dochádza k membránovej fúzii v procese, ktorý ešte nie je úplne objasnený a spermatozón je pohltý cytoplazmou oocytu. Po membránovej fúzii sa oocyt aktivuje, čo je sprevádzané sériou oscilácií  $Ca^{2+}$ . To má za následok kortikálnu reakciu, zahájenie a ukončenie meiózy II a indukciu embryogenézy (Kashir *et al.*, 2012; Hojnik, Kovačič, 2019).

Priebeh oocytárnej aktivácie možno definovať ako zložitú sieť signálnych dráh, ktoré sú ovplyvnené viacerými faktormi, ktoré možno rozdeliť do dvoch skupín a to:

- spermatické faktory,
- oocytárne faktory.

### 3.2.1.1 Spermatické faktory

Spermatické faktory prispievajú k aktivácii oocytu (Obr.14). Spomedzi týchto faktorov si fosfolipáza C zeta (PLC $\zeta$ ) získala značnú pozornosť. PLC $\zeta$  je izoforma fosfolipázy C špecifická pre spermie. PLC $\zeta$  bola prvýkrát identifikovaná v roku 2002 Saundersom *et al.*, ktorí potvrdili jej výskyt výlučne v spermiách viacerých živočíšnych druhov cicavcov vrátane ľudí, hlodavcov, ošípaných a opíc, čo naznačuje, že úloha PLC je zachovaná v celej živočíšnej ríši (Bianchi *et al.*, 2014; Saleh *et al.*, 2020).

Primárna štruktúra PLC $\zeta$  pozostáva zo štyroch domén: N-terminálnej homológnej (PH) domény, katalytickej domény, C2 domény a C-terminálnej domény. PH doména je zodpovedná za fosfoinozítidovú väzbu, zatiaľ čo doména C2 uľahčuje väzbu vápnika. Katalytická doména má enzymatickú aktivitu a je rozhodujúca pre hydrolýzu fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu (PIP2) na inozitoltrifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG) (Obr.13).

Hlavnou úlohou PLC $\zeta$  je iniciácia oscilácií vápnika pri prieniku spermie. Po fúzii spermie a oocytu sa PLC $\zeta$  uvoľní do cytoplazmy oocytu, kde iniciuje sériu vápnikových oscilácií. Mechanizmus, ktorým PLC $\zeta$  indukuje oscilácie vápnika, zahŕňa hydrolýzu PIP2, čo vedie k tvorbe diacylglycerolu a inozitol 1,4,5-trifosfátu. IP3 sa potom viaže na svoj receptor prítomný na endoplazmatickom retikule, čo spôsobuje uvoľnenie iónov vápnika do cytoplazmy. Uvoľnené vápenaté ióny sa viažu na rôzne proteíny ako je napr.



kalmodulín, a spúšťajú kaskádu udalostí, ktoré nakoniec vedú k aktivácii oocytu. Tieto udalosti zahŕňajú exocytózu kortikálnych granúl, obnovenie meiózy a iniciáciu embryonálneho vývoja (Swann *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2010).



Obrázok č. 13: Stavba PLCζ (Zdroj: Nomikos, Kashir, Lai, 2017)

## **PAWP**

Samotná funkciu a činnosť PLCζ je prísne regulovaná. Jedným z kľúčových regulátorov PLCζ je WWP doména viažuci proteín (PAWP) špecifický pre spermie. PAWP interaguje s PLCζ a zvyšuje jej enzymatickú aktivitu, čím podporuje oscilácie vápnika oocytárnej cytoplazmy. Okrem toho PAWP tiež chráni PLCζ pred degradáciou, čím zabezpečuje jej trvalú prítomnosť v cytoplazme oocytu.

PAWP bol prvýkrát identifikovaný v roku 2007, tým že sa potvrdila jeho prítomnosť v postakrozomálnej oblasti spermii, odkiaľ pochádza aj jeho názov. Ďalšie výskumy odhalili, že PAWP je vysoko konzervovaný proteín, čo znamená, že sa nachádza u rôznych živočíšnych druhov.

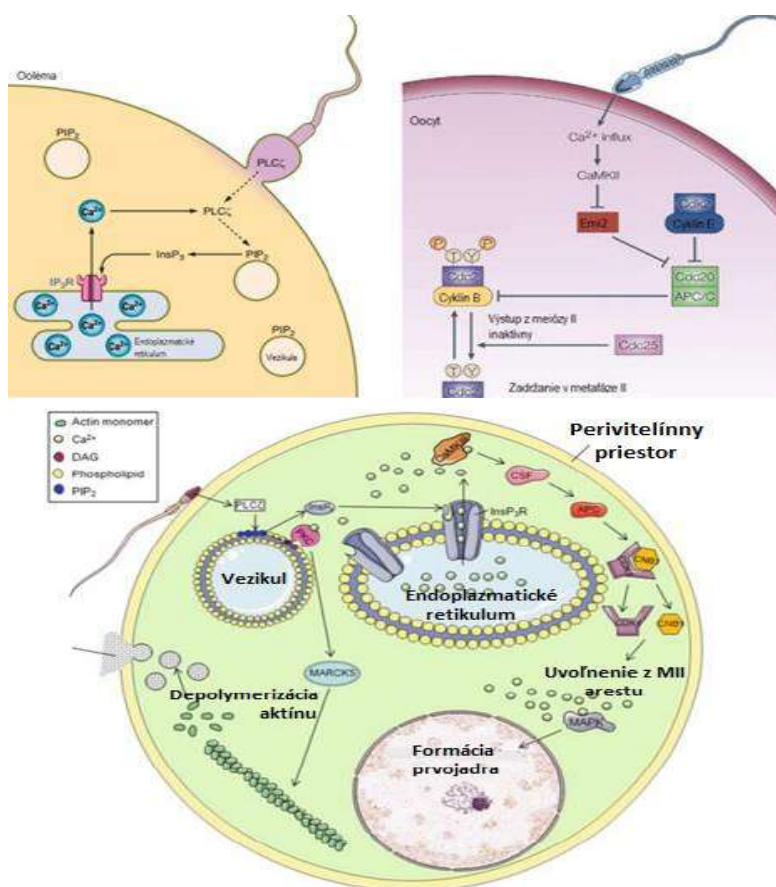
Po fúzii spermie a oocytu sa PAWP prenáša zo spermii do ooplazmy. PAWP prítomný v ooplazme spúšťa sériu signalizačných udalostí, ktoré vedú k uvoľneniu iónov vápnika. PAWP je prítomný v postakrozomálnej oblasti spermii a uvoľňuje sa pri penetrácii spermii. Naproti tomu PLCζ je lokalizovaný v hlavičke spermie a po oplodnení sa uvoľňuje do ooplazmy. Okrem toho štúdie ukázali, že PAWP môže indukovať aktiváciu oocytov aj v neprítomnosti spermii, čo naznačuje jeho potenciál ako samostatného aktivátora. Na druhej strane samotná PLCζ nie je dostatočná na aktiváciu oocytov, pretože na efektívne fungovanie vyžaduje prítomnosť iných faktorov v spermii (Aarabi *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2016).

## **PPP1R12C**

Ďalším dôležitým regulátorom aktivity PLCζ je regulačná podjednotka 12C proteínovej fosfatázy 1 (PPP1R12C). PPP1R12C, tiež známy ako cieľová podjednotka 1 myozínfosfatázy (MYPT1) zohráva rozhodujúcu úlohu pri regulácii udalostí, ktoré vedú k úspešnému oplodneniu. Primárne sa exprimuje v semenníkoch a je lokalizovaný v hlavnej časti chvosta spermie.

Prostredníctvom interakcie s myozínfosfatázou moduluje PPP1R12C fosforyláciu ľahkého reťazca myozínu (MLC), kritickej zložky kontraktilného aparátu v spermiiach (Collin, Lako, 2011; Fan *et al.*, 2014).

Po ejakulácii sú spermie spočiatku v pokojnom stave. Avšak po vystavení samičieho reprodukčného traktu sa PPP1R12C aktivuje, čo vedie k defosforylácii MLC. Táto defosforylácia spúšťa kaskádu udalostí, vrátane hyperaktivácie motility a kapacity spermií, ktoré sú nevyhnutné na to, aby spermie dosiahli a prenikli do oocyty. PPP1R12C interaguje aj s PLC $\zeta$  a defosforyluje ju, čo vedie k jej inaktivácii. Tento regulačný mechanizmus zabraňuje nadmernému uvoľňovaniu vápnika a zabezpečuje správne načasovanie a trvanie oscilácií vápnika počas oplodnenia (Satouh *et al.*, 2015).



Obrázok č.14: Schéma pôsobenia PLC a zahájenia meiotického delenia (Zdroj: Upravené zo Swann, Lai, 2016)

### 3.2.1.2 Faktory oocyty

Hlavným dôvodom úplného zlyhania oplodnenia je nedostatočná oocytárna kvalita (Kilani, Chapman 2014). Ale aj na základe kvality oocytov sa okrem spermatických faktorov podieľajú na úspešnom oplodnení a aktivácii oocytov viaceré oocytárne resp. materálne faktory (Swathi, 2017).

#### **AURKA**

Maternálne faktory v oocyte zohrávajú kľúčovú úlohu pri regulácii procesu oplodnenia. Jedným z takýchto faktorov je proteín kináza špecifická pre oocyty, Aurora kináza A (AURKA). AURKA sa podieľa na zostavovaní vretienka, zarovnávaní chromozómov a organizácii cytoskeletu. Okrem toho sa AURKA podieľa na udržiavaní genómovej stability a zabraňuje predčasnému oddeleniu sesterských chromatíd reguláciou kohézneho komplexu. V rámci oocytárnej aktivácie je AURKA regulátorom kalciových oscilácií prostredníctvom interakcie s proteínmi zapojenými do vápnikových signálnych dráh, čím zabezpečuje správne načasovanie a koordináciu týchto udalostí (Nikonova *et al.*, 2013; Ibrahimian, 2020).

#### **PIP2**

V plazmatickej membráne oocytov sa nachádza fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát (PIP2). PIP2 možno charakterizovať ako lipidovú molekulu, ktorá v plazmatickej membráne oocytov vykazuje polarizovanú distribúciu s vyššími koncentraciami lokalizovanými v špecifických oblastiach. Táto polarizovaná distribúcia je rozhodujúca pre správne fungovanie rôznych signálnych dráh zapojených do aktivácie oocytov. Štúdie ukázali, že PIP2 sa hromadí na zvieracom póle oocyty, čo je miesto vstupu spermie počas oplodnenia. Táto lokalizácia je uľahčená aktivitou fosfoinozitolkináz, enzýmov zodpovedných za syntézu PIP2 z fosfatidylinozitol 4-fosfátu (PI4P) (Yeste *et al.*, 2016).

PIP2 pôsobí ako kritický regulátor vápnikových oscilácií moduláciou aktivity inozitoltrifosfátových receptorov (IP3R), ktoré sú zodpovedné za uvoľňovanie vápnika z intracelulárnych zásob. Štúdie ukázali, že PIP2 interaguje s IP3R, čím sa zvyšuje ich citlivosť na IP3, ligand zodpovedný za aktiváciu týchto receptorov. Táto interakcia podporuje vytváranie silných vápnikových oscilácií, ktoré zaisťujú správnu aktiváciu oocytov. Okrem toho sa zistilo, že PIP2 reguluje aktivitu iných vápnikových kanálov, ako sú kanály

prechodného receptorového potenciálu (TRP), čo ďalej prispieva k vápnikovej signalizácii počas aktivácie oocytov (Ferrer-Buitrago *et al.*, 2018).

### **IP3R**

V membráne endoplazmatického retikula je umiestený vápnikový kanál, inozitoltrifosfátový receptor (IP3R). IP3R pôsobí ako strážca intracelulárnych zásob vápnika, reaguje na väzbu inozitoltrifosfátu (IP3) a spúšťa uvoľňovanie vápnika do ooplazmy. Kanál IP3R sa skladá z troch podtypov: IP3r1, IP3r2 a IP3r3. Každý podtyp má odlišné výrazové vzory a funkčné vlastnosti, pričom IP3r1 je prevažne exprimovaný v oocytoch.

Po hydrolýze PIP2 sa IP3 viaže na IP3R, čo spôsobuje otvorenie kanála a uvoľnenie  $\text{Ca}^{2+}$  z endoplazmatického retikula (Swanti, 2017). Aktivita IP3R je prísne regulovaná rôznymi faktormi. Jedným z kľúčových regulátorov je samotná hladina IP3, ktorá sa mení po difúzii spermie a oocytu. Okrem IP3 ovplyvňuje aktivitu IP3R aj proteinkináza A, C (PKA/PKC) a fosfatázové proteíny PP1, PP2A, cAMP a kalm modulín (CaM) (Taylor *et al.*, 2010).

Okrem aktivácie oocytov, je IP3R dôležitý aj počas samotnej maturácie oocytov. IP3R1 je v GV štádiu oocytov vo forme difúznej, nepravidelnej a granulárnej distribúcie, ktorá sa po dosiahnutí MII fázy mení na retikulárnu a periférnu. Po oplodnení je IP3R1 prítomný v strede a na periférii embryí v 2, 4-bunkovom embryu, pričom v 8-bunkovom embryu sa redistribuuje naprieč celým cytosolom. Tieto lokalizačné zmeny sa vyskytujú súbežne so zvýšením hladín tohto receptora (Alberio *et al.*, 2004; Swanti, 2017).

### **PKC a PKA**

Zvýšenie intracelulárnych hladín  $\text{Ca}^{2+}$  vedie k aktivácii rôznych signálnych dráh, vrátane PKC a PKA. Po prítoku  $\text{Ca}^{2+}$  sa PKC aktivuje väzbou na DAG, lipidového posla generovaného ako výsledok aktivácie fosfolipázy C (PLC). Aktivovaná PKC fosforyluje downstream ciele, vrátane proteínov zapojených do aktivácie oocytov. Jedným z takýchto cieľov je inozitol 1,4,5-trifosfátový receptor (IP3R), ktorý uvoľňuje  $\text{Ca}^{2+}$  z vnútrobunkových zásob a zosilňuje signál  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktivácia PKC navyše vedie k fosforylácii iných proteínov ako je napr. MAPK a cytoskeletálne zložky. Tieto fosforylačné udalosti modulujú bunkové procesy, ako je exocytóza kortikálnych granúl, pronukleárna tvorba a zostavenie vretienka, čo je všetko kľúčové pre úspešnú aktiváciu oocytov (Chen *et al.*, 2014).

Okrem PKC hrá významnú úlohu pri aktivácii oocytov aj PKA. PKA je cyklická adenosínmonofosfátová (cAMP)-dependentná proteínkináza, ktorá sa aktivuje zvýšením intracelulárnych hladín cAMP. Aktivovaná PKA fosforyluje rôzne substráty zapojené do aktivácie oocytov, vrátane proteínov spojených s meiotickým obnovením a exocytózou kortikálnych granúl. Jedným z dôležitých cieľov PKA je MPF. Okrem toho aktivácia PKA tiež reguluje dynamiku cytoskeletu prostredníctvom fosforylácie proteínov spojených s mikrotubulami a viažucimi aktín, čím ovplyvňuje zostavenie vretienka a cytoplazmatické preskupenia potrebné na úspešné oplodnenie (Matavel *et al.*, 2010; Feitosa *et al.*, 2020).

### $Ca^{2+}$

Spomedzi rôznych zapojených signálnych molekúl zohrávajú kľúčovú úlohu pri riadení týchto procesov katióny vápnika. Vápnikové oscilácie sú charakteristickým znakom aktivácie oocytov a sú rozhodujúce pre úspešné oplodnenie. Po vstupe spermii sa spustí rýchly príliv iónov vápnika, čo vedie k sérii opakovaných zvyšovaní a znižovaní intracelulárnych hladín vápnika. Tieto oscilácie sú prísne regulované a koordinované. Spustenie kalciových oscilácií sa primárne pripisuje spermo-špecifickej fosfolipáze PLC $\zeta$ , ktorá hydrolyzuje fosfatidylinozitol 4,5-bisfosfát (PIP $_2$ ) za vzniku inozitoltrifosfátu (IP $_3$ ). IP $_3$  sa viaže na svoj receptor na endoplazmatickom retikule, čo vedie k uvoľneniu vápnika zo zásob ooplazmy. Toto počiatkové uvoľnenie vápnika spúšťa pozitívnu spätnú väzbu, zosilňuje vápnikový signál a vytvára charakteristický oscilačný vzor (Nikiforaki *et al.*, 2016).

Vápnikové oscilácie regulujú resp. iniciujú viaceré signálne dráhy zapojené do aktivácie oocytov. Jednou z kľúčových dráh regulovaných vápnikom je MAPK. Prísun vápnika aktivuje MAPK kinázu (MEK), ktorá následne fosforyluje a aktivuje extracelulárnu signálom regulovanú kinázu (ERK). Aktivovaná ERK sa potom translokuje do jadra, kde reguluje génovú expresiu a podporuje meiotické obnovenie. Okrem dráhy MAPK vápniková signalizácia aktivuje aj ďalšie downstream efektory, ako je proteínkináza C a proteínkináza II závislá od  $Ca^{2+}$ /kalm modulínu (CaMKII). Tieto kinázy hrajú zásadnú úlohu pri regulácii cytoskeletálnych preskupení, exocytóze kortikálnych granúl a pronukleárnej tvorbe. Integrácia týchto signálnych dráh zabezpečuje koordinovanú progresiu aktivácie oocytov a následný embryonálny vývoj (Williams, 2002; Putney 2011).

### 3.2.2 Aktivácia oocytov *in vitro*

Aktivácia oocytov v *in vitro* podmienkach prebieha formou IVF. V prípade výskumov na modelových organizmoch sa z dôvodu polyspermie využíva aj tzv. partenogenetická aktivácia. Partenogéza označuje vývoj embrya z oocyту neoplozeného spermiou. Tento jav bol pozorovaný u rôznych druhov v celej živočíšnej ríši, pričom u bezstavovcov je partenogéza pomerne častá.

Partenogenetická aktivácia nastáva, keď sa oocyt vyvinie do podoby embrya bez oplodnenia spermiou. U cicavcov je tento proces veľmi neobvyklý, pretože pohlavné rozmnožovanie je prevládajúcim spôsobom rozmnožovania. Hlavným znakom úspešnej partenogézy je správna manipulácia s bunkovými signálnymi dráhami. V prirodzených podmienkach, kedy spermia oplodní oocyt, spustí sériu udalostí, ktoré vedú k aktivácii oocytu a následnému vývoju embrya. V partenogéze sa vedci pokúšajú umelo napodobniť tieto udalosti umelou aktiváciou oocytu pomocou rôznych mechanických, fyzikálnych a chemických stimulov (Obr.15-16) (Bartková *et al.*, 2020).

V praxi sa najviac stretáme práve s týmito druhmi partenogenetickej aktivácie:

- *Mechanická aktivácia*: je založená na základe napodobňovania fyzických síl, ktoré sa vyskytujú počas prirodzeného oplodnenia. V rámci tohto spôsobu sa využívajú hlavne techniky mechanickej stimulácie, vrátane vibrácií mikropipety, mechanickeho miešania a mikrofluidných systémov. Cieľom týchto prístupov je replikovať mechanické podnety, s ktorými sa oocyty stretávajú počas transportu v samičom reprodukčnom trakte. Účinnosť mechanickej aktivácie spočíva v schopnosti modulovať intracelulárne signálne dráhy. Štúdie ukázali, že mechanické podnety môžu spustiť oscilácie vápnika v oocyte, čo je kľúčová udalosť pre úspešné oplodnenie. Okrem toho sa zistilo, že mechanická stimulácia podporuje exocytózu kortikálnych granúl, ktorá zabraňuje polyspermii a zabezpečuje normálnu progresiu embryonálneho vývoja.

- *Elektricko-chemická aktivácia*: v tomto prípade dochádza k využitiu kombinácie elektrických pulzov a extracelulárneho zdroja kationov vápnika. Elektrické pole vytvorené pomocou mikroelektród vytvára impulzy s nízkou intenzitou, čo vedie k otvoreniu napätím riadených vápnikových kanálov a následnému prítoku vápnika z extracelulárneho zdroja (najčastejšie média), čo spôsobuje prechodné

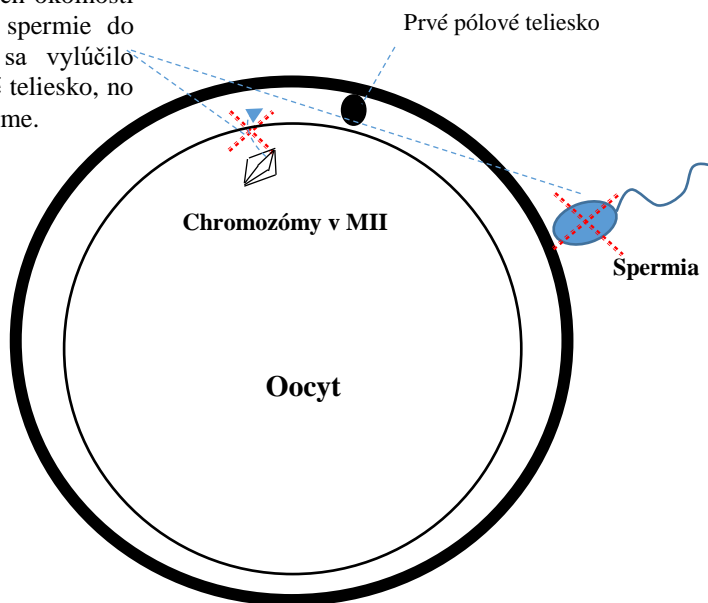
zvýšenie  $\text{Ca}^{2+}$  vedúce k opätovnému zahájeniu a dokončeniu MII delenia.

Okrem otvorenia pórov spôsobuje elektrické pulzovanie aj produkciu IP3, ktorý spoločne so 6-dimetylaminopurínom (6-DMAP) obsiahnutom v kultivačnom médiu, indukujú osciláciu intracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  a vznik partenogenetických embryí (Alberio *et al.*, 2001; Bartková *et al.*, 2020).

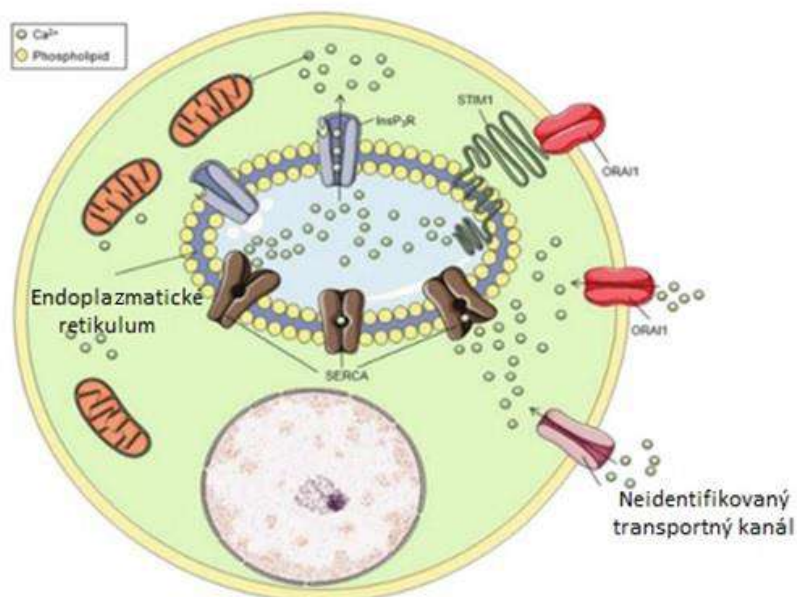
- *Chemická aktivácia:* tento druh aktivácie využíva rôzne chemické látky zapríčiňujúce pozitívny gradient  $\text{Ca}^{2+}$ . Chemické stimulanty na aktiváciu oocytov sú typicky malé molekuly, ktoré pôsobia ako agonisty pre špecifické bunkové receptory zapojené do vápnikových signálnych dráh. Jedným z bežne používaných chemických stimulantov je ionomycín, ktorý uľahčuje prítok iónov vápnika do cytoplazmy oocytov. Chemická aktivácia však využíva aj iné látky ako je chlorid strontnatý či etanol (Procházka *et al.*, 2012; Bartková *et al.*, 2020).

- *Fyzikálna-laserová aktivácia:* predstavuje nový prístup v aktivácii oocytov, ktorý ponúka presnú kontrolu nad procesom aktivácie. Táto technika zahŕňa použitie zaostreného laserového lúča na vyvolanie lokalizovaných fototermálnych účinkov na membránu oocytov, čo vedie k uvoľňovaniu vápnika a následnému vývoju embrya. Laserová stimulácia ponúka niekoľko výhod, vrátane schopnosti zacieliť na špecifické oblasti oocytu, zníženého rizika poškodenia okolitých tkanív a zlepšenej miery oplodnenia v porovnaní so samotnou chemickou aktiváciou (Varga *et al.*, 2008; Hammound *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015; Alvarez *et al.*, 2018).

Za normálnych okolností po prieniku spermie do oocytu, by sa vylúčilo druhé pólóvé teliesko, no tomu zabránime.



Obrázok č. 15: Schématické znázornenie partenogézy (Zdroj: Strejček, 2023)



Obrázok č. 16: Spôsob prenikania  $Ca^{2+}$  v prípade partenogenetickej aktivácie

(Zdroj: Upravené zo Swann, Lai, 2016)



### 3.3 Formovanie prvojadier

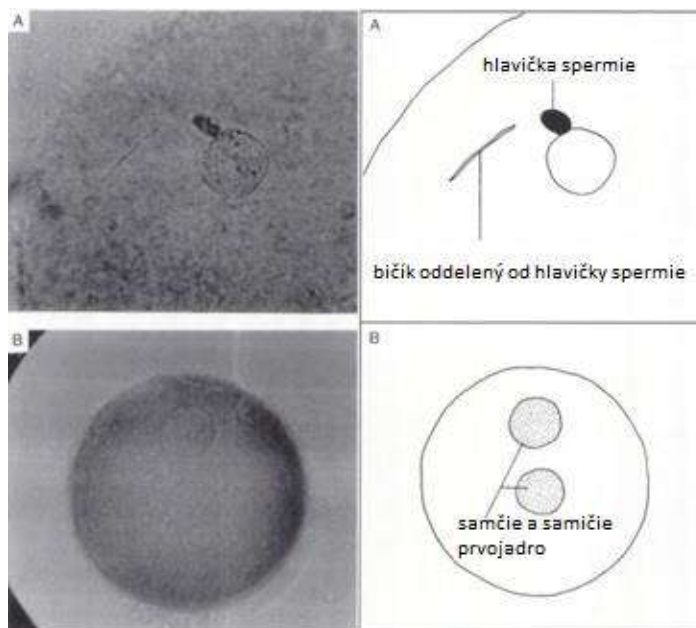
Po oplodnení prebieha v zygote séria zložitých bunkových dejov, ktoré vedú k vytvoreniu samčieho (zo spermie) a samičieho (oocytárny pôvod) prvojadra (*pronucleus*). Tvorba oboch prvojadier je nevyhnutná pre ďalší vývoj embrya (Obr. 17).

Po úspešnom oplodnení spermia preniká cez *zona pellucida*, v ooplazme stráca bičík, vonkajšiu membránu a splynie s oocytárnou membránou. Táto fúzia spúšťa uvoľnenie vápnika, pričom zvýšenie hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iniciuje proces dekonenzácie spermií s cieľom vytvoriť zbobnatené jadro známe ako samičie prvojadro. Proces dekonenzácie zahŕňa odstránenie protamínov, ktoré nahrádzajú históny počas spermatogenézy. Odstránenie protamínu umožňuje opätovné vytvorenie nukleozomálnej organizácie v samčom prvojadre. Táto reorganizácia je rozhodujúca pre následnú replikáciu DNA a génovú expresiu počas skorého embryonálneho vývoja (De Sousa *et al.*, 2002; Marangos *et al.*, 2003).

Súčasne prechádza radom zmien aj oocyt. Cytoplazmatické organely oocytu sa redistribuuju smerom k miestu vstupu spermie a vytvárajú štruktúru nazývanú samičí pronukleárny prekurzor. Z tohto prekurzora sa nakoniec vyvinie samičie prvojadro. V samičom prvojadre prechádza dekonenzáciou a replikáciou maternálna DNA, čím sa pripravuje na následnú fúziu so samčím prvojadrom. Proces dekonenzácie zahŕňa modifikácie histónov, ako je acetylácia a metylácia, ktoré uľahčujú relaxáciu chromatinovej štruktúry a umožňujú génovú expresiu.

Po fáze syntézy, kedy dochádza k replikácii DNA nastáva fáza tzv. migrácie. Prvojadrá sa prostredníctvom mikrotubulov koordinovane pohybujú smerom k sebe. Štúdie trojrozmerného časozberného zobrazovania ukázali, že prvojadrá migrujú rôznymi spôsobmi nie len v okrajovej, ale aj centrálnej oblasti zygoty (Scheffler *et al.*, 2021).

Po priblížení prvojadier dochádza k ich fúzii, syngamii. Táto fúzia kombinuje genetický materiál od oboch rodičov, čo vedie k vytvoreniu jediného diploidného jadra. Vznik jedinečnej kombinácie chromozómov tak nasledovne bude určovať vlastnosti vyvíjajúceho sa embrya.



Obrázok č.17: Formovanie prvojadier  
(Zdroj: Upravené z Gordon, 2003)

Akonáhle sa vytvoria obe prvojadrá dochádza k zahájeniu migrácie do stredu oocytu. Táto migrácia je poháňaná mikrotubulami a molekulárnymi faktormi, ktoré zabezpečujú správne zarovnanie pronukleov pre následnú fúziu. Fúzia prvojadier je kritickým krokom pri tvorbe diploidnej zygoty. Zahŕňa rozpad jadrových obalov obklopujúcich každý pronukleus a zlúčenie ich genetického materiálu. Proces fúzie je uľahčený faktormi, ako sú nukleoporíny, ktoré sprostredkovávajú rozpad jadrového obalu, a proteíny zapojené do opravy a rekombinácie DNA.

Po pronukleárnej fúzii vstúpi zygota do fázy známej ako interfáza, kde dochádza ku kondenzácii chromozómov. Táto kondenzácia je potrebná na zabezpečenie správnej segregácie chromozómov počas nasledujúcich delení buniek. Počas raného embryonálneho vývoja prechádza zygota radom delení, čo vedie k vytvoreniu mnohobunkového embrya. Genetický materiál v prvojadrách počas týchto delení replikuje a distribuuje rovnomerne medzi vznikajúce dcérske bunky. Načasovanie a koordinácia týchto delení sú kľúčové pre správny embryonálny vývoj (Oswald *et al.*, 2000; Gordon, 2003; Rosenbusch, 2009).

Z hľadiska fyziológie rozlišujeme niekoľko vývojových štádií prvojadier (Gordon,2003) (Tab. 7):

Tabuľka 7: Vývojové štádia prvojadier

Štádium	Samčie prvojadro	Samičie prvojadro
PN-1	Kompletná spermia sa nachádza v ooplazme.	Opätovné zahájenie druhého meiotického delenia.
PN-2	Hlavička spermie dekondenzuje a zväčšuje sa. Bičik sa oddeľuje.	Extrúzia PBII, kompletizácia druhého meiotického delenia.
PN-3	Hlavička spermie naďalej dekondenzuje. Dochádza k formácii jadrovej membrány.	Chromozómy začínajú dekondenzovať a jadrová membrána sa začína formovať.
PN-4	Dekondenzácia chromozómov je ukončená. Vzniknuté prvojadrá sú obalené kompletnou membránou.	
PN-5	Prvojadrá zväčšujú svoj objem, pričom pri čom ich obsahy majú rovnakú denzitu.	
PN-6	Prvojadrá dosahujú maximálnu veľkosť. Nachádzajú sa v centre ooplazmy a vzdialenosť medzi nimi je veľmi malá.	

### 3.3.1 Rozdiely medzi prvojadrami

Vzniknuté prvojadrá obsahujú genetický materiál potrebný pre embryonálny vývoj, avšak taktiež vykazujú odlišné vlastnosti a zohrávajú rôzne úlohy v skorých štádiách embryonálneho vývoja. V rámci genetického zloženia nesie samčie prvojadro genetický materiál výlučne od otca a vzniká kondenzáciou chromatínu spermie, ktorý obsahuje haploidnú sadu chromozómov. Genetické zloženie samičieho prvojadra je relatívne stabilné a po oplodnení zostáva nezmenené.

Samičie prvojadro obsahuje genetický materiál od matky a vzniká kondenzáciou chromatínu oocyty, ktorý taktiež obsahuje haploidnú sadu chromozómov. Tieto chromozómy nesú genetickú informáciu, ktorá bude určovať rôzne črty a charakteristiky vyvíjajúceho sa embrya. Samičie prvojadro nie je stabilné a prechádza procesom nazývaným genómový imprinting. Počas tohto procesu sú určité gény označené epigenetickými

modifikáciami, ktoré môžu ovplyvniť ich expresné vzorce v nasledujúcich vývojevých štádiách (Latham, Schultz, 2001; Schultz, 2002).

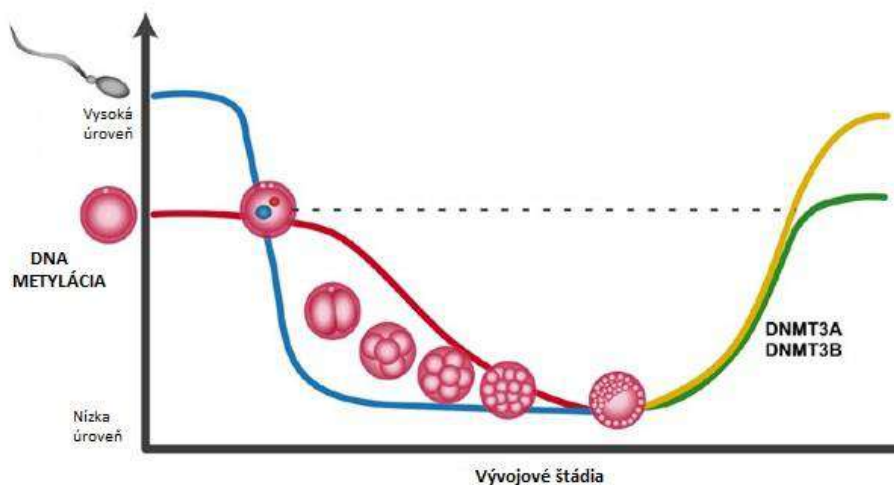
V rámci replikácie DNA a delenia buniek taktiež možno detegovať rozdiely. Samčie prvojadro iniciuje replikáciu DNA skôr ako samičie. Táto skorá replikácia zaisťuje, že otcovský genetický materiál je dostupný pre následné bunkové delenia. Na rozdiel od toho samičie prvojadro podlieha replikácii DNA o niečo neskôr, čo umožňuje koordináciu s inými bunkovými udalosťami potrebnými pre správny embryonálny vývoj.

Významným rozdielom medzi prvojadrami sú epigenetické modifikácie. Epigenetické modifikácie hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii vzorcov génovej expresie počas embryonálneho vývoja. Obe prvojadrá po oplodnení prechádzajú epigenetickým preprogramovaním. Rozsah a načasovanie týchto modifikácií sa však medzi prvojadrami líši. Samčie prvojadro prechádza relatívne minimálnym epigenetickým preprogramovaním, čo je spôsobené rozsiahlou remodeláciou chromatinu počas spermatogenézy. Samičie prvojadro si však zachováva značné množstvo epigenetických značiek, ktoré je potrebné pre správny embryonálny vývoj odstrániť a následne obnoviť prostredníctvom metylácie a demetylácie DNA.

DNA metylácia patrí medzi najrozšírenejšiu epigenetickú modifikáciu. Metylácia DNA zahŕňa pridanie metylovej skupiny k cytozínovému zvyšku DNA, ktorý sa vyskytuje prevažne v CpG dinukleotidoch. Táto modifikácia je katalyzovaná DNA metyltransferázami (DNMT) a hrá kľúčovú úlohu v génovej regulácii, genómovom imprintingu, inaktivácii X-chromozómov a umlčaní repetitívnych prvkov (Li, 2002). V samičom prvojadre dochádza aj k demetylácii DNA, čím nastáva odstránenie zdedených metylačných značiek. Táto globálna demetylácia je rozhodujúca pre preprogramovanie maternálneho genómu a umožňuje vytvorenie nových metylačných vzorcov. Proces demetylácie DNA zahŕňa aktívne a pasívne mechanizmy. K aktívnej demetylácii dochádza prostredníctvom enzymatickej aktivity TET proteínov, ktoré oxidujú 5-metylcytozín (5mC) na 5-hydroxymetylcytozín (5hmC), čo vedie k ďalšej oxidácii a prípadnému odstráneniu metylovej skupiny. Na druhej strane pasívna demetylácia prebieha replikáciou DNA bez udržiavacej metylácie, čo vedie k redukcii metylovaných cytozínov (Ito *et al.*, 2010; Pastro *et al.*, 2013).

Po vytvorení demetylovaného stavu nastáva de novo metylácia DNA, ktorá zabezpečuje zisk nových metylačných vzorcov. Tento proces zahŕňa nábor DNMT, najmä DNMT3A a DNMT3B, ktoré vytvárajú metylačné značky v špecifických genómových oblastiach. De novo proces metylácie DNA je

riadený rôznymi faktormi, vrátane motívov sekvencie DNA, štruktúry chromatinu a interakcií s transkripčnými faktormi. Tieto faktory prispievajú k vytvoreniu špecifických vzorcov metylácie DNA, čím sa zabezpečuje primeraná expresia génov potrebných na diferenciáciu a vývoj buniek (Obr.18) (Okada, Yamaguchi, 2017; Richard Albert *et al.*, 2020).



Obrázok č. 18: Dynamika DNMT v priebehu embryogenézy: Strata metylácie počas embryogenézy vedie k iniciácii aktivácie embryonálneho genómu (EGA) a implementácii epigenetických vzorcov prostredníctvom katalyzovanej DNMT3A a DNMT3B.

(Zdroj: Upravené z Breton-Larrivé, Elder, McGraw, 2019)

## 4. Embryogenéza

Embryogenéza je proces, pri ktorom sa z jedného oplodneného oocytu vyvinie komplexný organizmus. Tento zložitý proces zahŕňa sériu presne organizovaných udalostí, ktoré vedú k vytvoreniu tkanív, orgánov a v konečnom dôsledku k narodeniu plne funkčného jedinca. Pochopenie mechanizmov embryogenézy u cicavcov je nielen kľúčové pre pokrok v našich poznatkoch o vývojovej biológii, ale má aj veľký potenciál pre medicínske aplikácie. Sledovanie a štúdium embryogenézy je však z dôvodu oocytárnej veľkosti a obmedzeného počtu oocytov mierne komplikované (napr. veľkosť ľudskej zygoty predstavuje cca 100  $\mu\text{m}$ , čo je 1/1000 z veľkosti oocyту druhu *Xenopus*) ( Plusa, Piliszek, 2020; Khokhlova *et al.*, 2020).

Ovuláciou, čiže uvoľnením oplodnenia schopného oocytu, dochádza po oplodnení spermii v ampule vajíčkovodu k zahájeniu embryogenézy za vzniku zygoty. V prvých hodinách po oplodnení dochádza vo všeobecnosti k rade zmien ako je:

- Prienik spermie a jej prítomnosť v ooplazme. Táto fáza nastáva cca 1-2 hodiny od oplodnenia. V tejto fáze dochádza k pokračovaniu pozastaveného meiotického delenia.
- Dekondenzácia spermie sprevádzaná uvoľnením druhého pólóvého telieska. Táto fáza prebieha cca 2-3 hodiny po oplodnení a signalizuje ukončenie druhého meiotického delenia.
- Pokračujúca dekonenzácia spermie a následné obnovenie jadrovej membrány. Táto fáza nastáva cca 3-4 hodiny po oplodnení.
- Dokončenie dekonenzácie chromozómov. Táto fáza nastáva cca 4-6 hodín po oplodnení a je sprevádzaná lokalizáciou prvojadier, obklopených membránou, v kortikálnej ooplazme.
- Rast prvojadier a ich následná migrácia do centra ooplazmy. Táto fáza nastáva cca 6-8 hodín po oplodnení.
- Po cca 8-10 hodinách od oplodnenia sú prvojadrá lokalizované v centre ooplazmy. Majú zvlhnené membrány, čo vedie k vytvoreniu spojenia. V tomto štádiu je vývin prvojadier ukončený.
- Po splynutí prvojadier, cca 18-20 hodín od oplodnenia, vzniká zygota (Omelka *et al.*, 2011; Milewski, Ajduk, 2017; Briggs *et al.*, 2018).

## 4.1 Ryhovanie

Zygota podlieha rýchlemu deleniu buniek, známemu ako ryhovanie, ktoré nastáva cca 24 hodín po oplodnení. Ryhovanie zygot zvyšuje počet buniek, čo umožňuje diferenciáciu a špecializáciu buniek na rôzne tkanivá a orgány. Taktiež zaisťuje kompaktnosť embrya bez extrémnej zmeny veľkosti, ktorá je kľúčová pre difúzny prienik dostatočného množstva živín a kyslíka. Ryhovanie v konečnom dôsledku pripravuje podmienky pre následné vývojové procesy, ako je gastrulácia a organogenéza.

Počas delenia zygoty sa bunky rýchlo delia bez toho, aby sa zväčšovali. Tento proces zabezpečuje, že každá dcérska bunka dostane rovnaké množstvo cytoplazmy a genetického materiálu, pričom sa zachováva genetická integrita. K deleniu dochádza mitózou, počas ktorej sa DNA replikuje a segreguje do dvoch dcérskych buniek za vzniku 2-bunkového embrya.

Ako proces delenia a diferenciácie pokračuje, 2-bunkové embryo sa mitoticky delí za vzniku 4-bunkového embrya. Toto štádium je charakterizované prítomnosťou štyroch blastomér, ktoré vytvárajú základ pre následné delenie a tvorbu špecializovanejších buniek.

Nasledovným delením vzniká 8-bunkové štádium, v ktorom dochádza už ku kompaktizácii. Kompaktizácia je proces, pri ktorom sa bunky preskupujú a vytvárajú kompaktnejšiu štruktúru. Tento proces je nevyhnutný pre stanovenie polarita bunky a komunikáciu medzi bunkami.

Ďalšie delenie vedie k vytvoreniu 16-bunkového embrya, ktoré podlieha zhutneniu s cieľom vytvoriť štruktúru známu ako morula. Morula je pevná guľovitá štruktúra buniek, ktorá pripomína tvar moruše. Morula vstupuje do ďalšej fázy delenia, kde dochádza k tzv. kompaktizácii. Počas zhutňovania tvoria vonkajšie bunky moruly tesné spojenia a priliehajú tesne k sebe, zatiaľ čo vnútorné bunky sa stávajú voľnejšie. V morule sa vytvára dutina naplnená tekutinou nazývaná blastocoel. Táto dutina oddeľuje vnútornú bunkovú hmotu od trofoblastu, čo vedie k vytvoreniu blastocysty.

Blastocysta je kľúčová štruktúra pozostávajúca z dvoch odlišných bunkových populácií: vonkajšej vrstvy buniek nazývanej trofoblast a vnútornej bunkovej hmoty - embryoblast. Z trofoblastu vzniká placenta, zatiaľ čo z vnútornej bunkovej hmoty sa vyvíja vlastné embryo. Ako postupuje ryhovanie zygoty, v morule sa vytvára dutina naplnená tekutinou nazývaná blastocoel. Táto dutina oddeľuje vnútornú bunkovú hmotu od trofoblastu, čo vedie k vytvoreniu blastocysty. Blastocysta je nevyhnutná pre implantáciu a následný embryonálny vývoj (Brinster, 1974; Van Soom *et al.*, 2003; Kujik *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2015; Frankenberg *et al.*, 2016).

### 4.1.1 Typy embryonálneho ryhovania

Raná embryogenéza, konkrétne ryhovanie, predstavuje proces opakovaných mitotických delení, ktoré rozdeľujú embryo na viacero buniek. S každým delením počet buniek narastá, pričom dochádza k udržaniu celkovej priemernej veľkosti embrya nepriamo úmerným zmenšováním buniek. Vzhľadom na odlišnosti počas ryhovania dochádza ku klasifikácii dvoch ryhovaní a to:

- Meroblastického ryhovania typické pre vtáky, ryby, hmyz
- Holoblastického ryhovania: obojživelníky, mäkkýše, cicavce

Meroblastické ryhovanie je typ bunkového delenia, ktorý sa vyskytuje v organizmoch s významným množstvom žltka, pričom nevedie k úplnému rozdeleniu zygoty. Meroblastické ryhovanie možno ďalej kategorizovať do dvoch podtypov: diskoidné a povrchové. Pri diskoidnom meroblastickom ryhovaní dochádza k deleniu iba v malej diskovitej oblasti na vrchu žltka, zatiaľ čo zvyšok žltka zostáva nedotknutý. Tento typ štiepenia sa vyskytuje u vtákov a plazov. Povrchové meroblastické ryhovanie zahŕňa tvorbu blastodermu, čo je jedna vrstva buniek na povrchu žltka. Blastoderm sa delí, zatiaľ čo žltok zostáva nerozdelený. Tento typ ryhovania sa pozoruje pri hmyze a niektorých kôrovcoch (Obr. 19) (Schulze, Schierenberg, 2011; Yin *et al.*, 2016; Hasley *et al.*, 2017).

V prvom delení sledujeme meroblastické diskoidné štiepenie, ktoré je obmedzené na blastodisk z dôvodu veľkého obsahu žltka. V rámci tohto štiepenia sa embryo delí pozdĺž svojej pozdĺžnej osi, výsledkom čoho sú dve dcérske bunky, ktoré sú orientované navzájom paralelne. Proces začína vytvorením štiepnej brázdy, ktorá sa javí ako plytká ryha na povrchu embrya. Orientácia štiepnej brázdy je určená polohou mitotického vretienka, ktorá je ovplyvnená kortikálnou rotáciou. Bunky blastodermu sa oddeľujú od žltka až ekvatoriálnym štiepením. Ďalšie ekvatoriálne štiepenia vytvárajú viacvrstvovú blastodermu s hrúbkou troch alebo štyroch buniek. U vtákov sa medzi blastodermou a žltkom vytvára priestor nazývaný subgerminálna dutina. Bunky blastodermu (cca 60 000) migrujú do subgerminálnej dutiny, aby vytvorili druhú vrstvu. Dve vrstvy vytvárajú vonkajší epiblast a vnútorný hypoblast s blastocoelom medzi nimi.

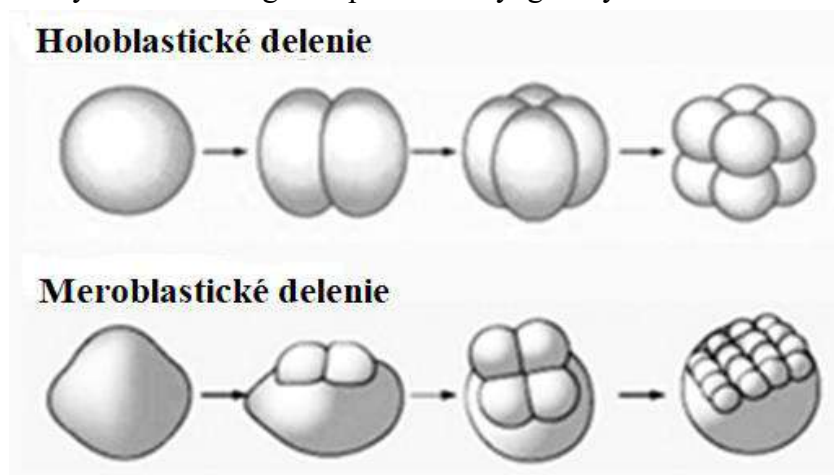
Holoblastické ryhovanie je typ bunkového delenia, ku ktorému dochádza v organizmoch s malým alebo žiadnym žltkom. Tento typ delenia je charakterizovaný úplným rozdelením zygoty, výsledkom čoho sú rovnako



veľké blastoméry. Holoblastické ryhovanie možno ďalej klasifikovať do troch podtypov: radiálne, špirálové a bilaterálne. Počas radiálneho holoblastického ryhovania sa zygota delí symetricky pozdĺž vertikálnej aj horizontálnej osi a vytvára blastoméry, ktoré sú usporiadané v radiálnom vzore. Tento typ štiepenia sa pozoruje u ostnatokožcov a niektorých strunatcov. Pri špirálovom holoblastickom ryhovaní dochádza k deleniu blastomér šikmo, výsledkom čoho je špirálovité usporiadanie buniek. Tento typ delenia sa bežne vyskytuje u mäkkýšov a annelidov. Bilaterálne holoblastické ryhovanie zahŕňa rozdelenie blastomér pozdĺž jednej roviny, čo vedie k dvom rovnakým poloviciam. Tento typ štiepenia sa vyskytuje u väčšiny stavovcov, vrátane ľudí (Takeuchi, Okabe, Aizawa, 2009; Hasley *et al.*, 2017).

Holoblastické ryhovanie hrá kľúčovú úlohu v ranom vývoji mnohých organizmov. Rovnaké delenie blastomér zabezpečuje, že každá bunka dostane rovnaké množstvo cytoplazmatických zložiek a genetického materiálu. Toto vyvážené rozdelenie je nevyhnutné pre správny vývoj a diferenciáciu buniek do rôznych tkanív a orgánov.

Okrem toho holoblastické štiepenie umožňuje vytvorenie blastocysty, ktorá následne podlieha gastrulácii, čo vedie k vytvoreniu troch zárodočných vrstiev: ektoderm, mezoderm a endoderm. Tieto zárodočné vrstvy spôsobujú vznik rôznych tkanív a orgánov počas embryogenézy.



Obrázok č. 19: Druhy delenia počas ryhovania  
(Zdroj: Upravené z <https://www.chegg.com/>)

Počas normálneho ryhovania zygoty sa bunky delia synchronne, čím je zabezpečená rovnaká distribúcia genetického materiálu a cytoplazmatických zložiek. Štúdie však ukázali, že v niektorých prípadoch dochádza k

asynchronizácii, čo vedie k zmenám v rýchlosti delenia buniek. Tento jav možno pozorovať v priebehu prirodzenej, ale aj asistovanej reprodukcie. Presné mechanizmy asynchronizácie ešte nie sú úplne pochopené, ale predpokladá sa, že ich ovplyvňujú faktory ako je vek matky, kvalita embrya a kultivačné podmienky. Asynchronizácia sa môže prejavovať rôznymi spôsobmi. V niektorých prípadoch sa jedna alebo viac buniek môže deliť rýchlejšie ako ostatné, čo vedie k nerovnomernej distribúcii buniek v embryu. Asynchronizácia môže nastať počas prvých delení štiepenia alebo môže pretrvávajúť počas nasledujúcich štádií. V prípade cicavčej embryogenézy platí, že blastoméry sa nerozdeľujú súčasne. To znamená, že ich počet nerastie exponenciálne. Pre cicavčie embryo platí, že počas skoršej embryogenézy nastáva už aktivácia genómu, čo vedie k produkcii proteínov potrebných pre samotné delenie (Forgács, Newman, 2005; Boklage, 2009).

## **4.2 Implantácia a gastrulácia**

Po transporte blastocysty do maternice je možné sledovať implantáciu, spojenie so stenou maternice. Implantácia blastocysty je vysoko koordinovaný proces, ktorý zahŕňa zložité interakcie medzi vyvíjajúcim sa embryom a endometriom. Dá sa rozdeliť do troch hlavných etáp: apozícia, adhézia a invázia.

Počas apozície sa blastocysta priblíži k stene maternice a nadviaže počiatočný kontakt. Potom nasleduje adhézia, pri ktorej interagujú špecializované molekuly na povrchu blastocysty a endometria, čím sa uľahčí pevné prichytenie. Konečné štádium, invázia, zahŕňa penetráciu blastocysty do výstelky maternice, čo umožňuje vytvorenie spojenia podporujúceho zásobovanie vyvíjajúceho sa embrya.

Po úspešnej implantácii prechádza blastocysta procesom gastrulácie a mení sa na gastrulu. Gastrulácia je charakterizovaná tvorbou troch odlišných bunkových vrstiev známych ako zárodočné vrstvy: ektoderm, mezoderm a endoderm. Z týchto zárodočných vrstiev vznikajú všetky tkanivá a orgány vyvíjajúceho sa embrya.

Gastrulácia začína tvorbou primitívneho pruhu, štruktúry, ktorá sa objavuje na povrchu blastocysty. Bunky z epiblastu vnútornej bunkovej hmoty migrujú smerom k primitívnemu pruhu a podstupujú proces nazývaný epitelový-mezenchymálny prechod. Tento prechod im umožňuje odpútať sa z pôvodnej polohy a pohybovať sa smerom do vnútra embrya.

Migrácia týchto buniek vytvára tri zárodočné vrstvy. Bunky, ktoré zostanú na povrchu, sa stanú ektodermom, ktorý vytvorí kožu a nervový systém. Bunky, ktoré migrujú cez primitívny pruh, vytvárajú mezoderm, z ktorého vznikajú svaly, kosti a obehový systém. Nakoniec bunky, ktoré skončia medzi ektodermom a mezodermom, tvoria endoderm, z ktorého sa vyvinie tráviaci a dýchací systém (Baron, 2005; Chen *et al.*, 2009; Sheng *et al.*, 2021).

### 4.3 Organogenéza

Po vytvorení zárodočných vrstiev je zahájená organogenéza, ktorá prebieha na štyroch úrovniach. Prvou úrovňou je indukcia, ktorá zahŕňa interakciu medzi rôznymi typmi buniek a signálnymi molekulami. Indukčné signály z jednej skupiny buniek podnecujú susedné bunky k diferenciacii na špecifické typy buniek, čím sa iniciuje tvorba rôznych orgánov.

Akonáhle dôjde k indukcii, nastáva druhá fáza, nazývaná špecifikácia orgánu. Počas tohto štádia bunky, ktoré boli prinútené stať sa určitým typom orgánu, začínajú získavať odlišné vlastnosti a funkcie. Tento proces zahŕňa aktiváciu alebo represiu špecifických génov, čo vedie k vývoju orgánovo špecifických štruktúr a bunkových typov.

Tretie štádium, orgánový rast a morfogenéza, je charakterizované rýchlou proliferáciou buniek a rozsiahlou prestavbou tkaniva. Bunky vo vyvíjajúcich sa orgánoch sa ďalej delia a diferencujú, pričom získavajú špecializované funkcie. Súčasne orgány prechádzajú tvarovými zmenami a reorganizáciou, aby dosiahli svoju konečnú podobu. Toto štádium je vysoko dynamické a vyžaduje presnú koordináciu medzi rôznymi populáciami buniek.

Konečným štádiom organogenézy je dozrievanie orgánov a funkčná integrácia. Počas tohto štádia orgány pokračujú v raste, zdokonaľujú svoje štruktúry a zároveň vytvárajú spojenie s inými orgánmi a systémami v tele. Táto integrácia zabezpečuje správne fungovanie a koordináciu medzi rôznymi orgánovými systémami, čo umožňuje organizmu vykonávať základné fyziologické procesy (Schnabel *et al.*, 2001; Werneburg *et al.*, 2016).

### 4.4 Finálny vývoj plodu a narodenie

Keď sa embryogenéza blíži ku koncu, vyvíjajúci sa organizmus prechádza poslednými zmenami v rámci prípravy na pôrod. Počas tejto fázy orgány pokračujú v raste a dozrievaní, pričom získavajú funkčnú kapacitu. Napríklad v pľúcach sa po narodení vyvinú bunky produkujúce povrchovo aktívne látky potrebné na dýchanie vzduchu, zatiaľ čo pečeň preberá svoju úlohu pri

metabolizme živín. Plod v tomto období výrazne priberá, čo vedie k hromadeniu tukových zásob, ktoré pomáhajú regulovať telesnú teplotu po pôrode.

Ku koncu tretieho trimestra sa plod pri príprave na pôrod usadí do polohy hlavou dole. Táto poloha umožňuje ľahší prechod pôrodnými cestami počas pôrodu. V tomto období sa plod považuje za donosený, hoci sa môže ďalej vyvíjať a priberať na váhe až do pôrodu.

Pôrod je vyvrcholením embryogenézy a začiatok novej kapitoly v živote organizmu cicavcov. Zvyčajne začína kontrakciami, ktoré spôsobujú rozšírenie krčka maternice, čo umožňuje plodu zostúpiť do pôrodných ciest. Prvá fáza pôrodu zahŕňa pravidelné kontrakcie, ktorých intenzita a frekvencia sa postupne zvyšuje. Keď sa krčok maternice roztiahne na cca desať centimetrov, začína sa druhé štádium, ktoré sa vyznačuje nutkaním tlačiť. Pri každej kontrakcii sa matka snaží vytlačiť plod pôrodnými cestami. Nakoniec, počas tretej fázy, dochádza aj k vytlačeniu placenty, čím sa dokončí proces pôrodu (Smith, Zakar, Madsen, 2013; Abdul-Rahman, 2023).

#### 4.5 Morfológia embryí ošípanej

Počas embryogenézy dochádza ku vzniku mnohobunkového organizmu z jednej oplodnenej samičej bunky. Počas tohto procesu sledujeme viacero medzištádií, ktoré sa navzájom líšia morfológickými zmenami (Obr. 20).

Rané 2-bunkové embryo predstavuje prvú viditeľnú diferenciáciu zygoty na dve bunky, blastoméry. Každá bunka obsahuje kompletnú sadu chromozómov. V tomto štádiu sú bunky relatívne malé a okrúhleho tvaru. Sú pevne spojené cez medzibunkové spojenia. Na povrchu sa nachádzajú početné mikrokľky a sú obklopené pravidelnou *zona pellucida*.

V 4-bunkovom štádiu sa embryo skladá zo štyroch buniek. Tieto bunky sú o niečo väčšie a majú nepravidelnejší tvar. Bunky v tomto štádiu sú prepojené cez gap junction spojenia, čo umožňuje komunikáciu a výmenu molekúl medzi nimi. V tomto štádiu bola v prípade ošípanej zistená prvá inkorporácia  $5\text{-}^3\text{H}$  uridínu do nukleoplazmy. Jadro je v jednotlivých blastomérach umiestnené centrálné. V tomto štádiu je jadierko tvorené z kompaktných fibríl a je ostro ohraničené. Na jeho povrchu sa vytvárajú fibrilárne centrá. Počas tohto štádia embryo prechádza ďalším kolom bunkového delenia, čo vedie k vytvoreniu nových štyroch odlišných blastomér (Tománek *et al.*, 1989).

V štádiu 8-bunkového embrya je vytvorených osem blastomér, z ktorých každá obsahuje malú časť genetického materiálu. V tomto štádiu blastoméry

začínajú strácať svoje pevné spojenia, čo je nevyhnutné pre následnú tvorbu moruly. Blastoméry v 8-bunkovom štádiu sú stále relatívne malé a okrúhleho tvaru, avšak vykazujú určitú úroveň asymetrie. Jadro embryí v prípade ošípanej je umiestnené excentricky, pričom je obklopené zónou bohatou na bunkové organely (mitochondrie, Golgiho aparát, hladké endoplazmatické retikulum). Aj v tomto štádiu sa objavuje oblasť s takmer úplnou absenciou organel. V nej prevažujú už spomínané lipidové kvapôčky. Jadierko je stále tvorené z kompaktných fibríl, ktoré sú občas obklopené chromátinom s vakuolami. V tomto štádiu vývoja sa už objavujú i retikulárne jadierka pozostávajúce z denznej fibrilárnej hmoty a vakuol (Hyttel, Niemann, 1990).

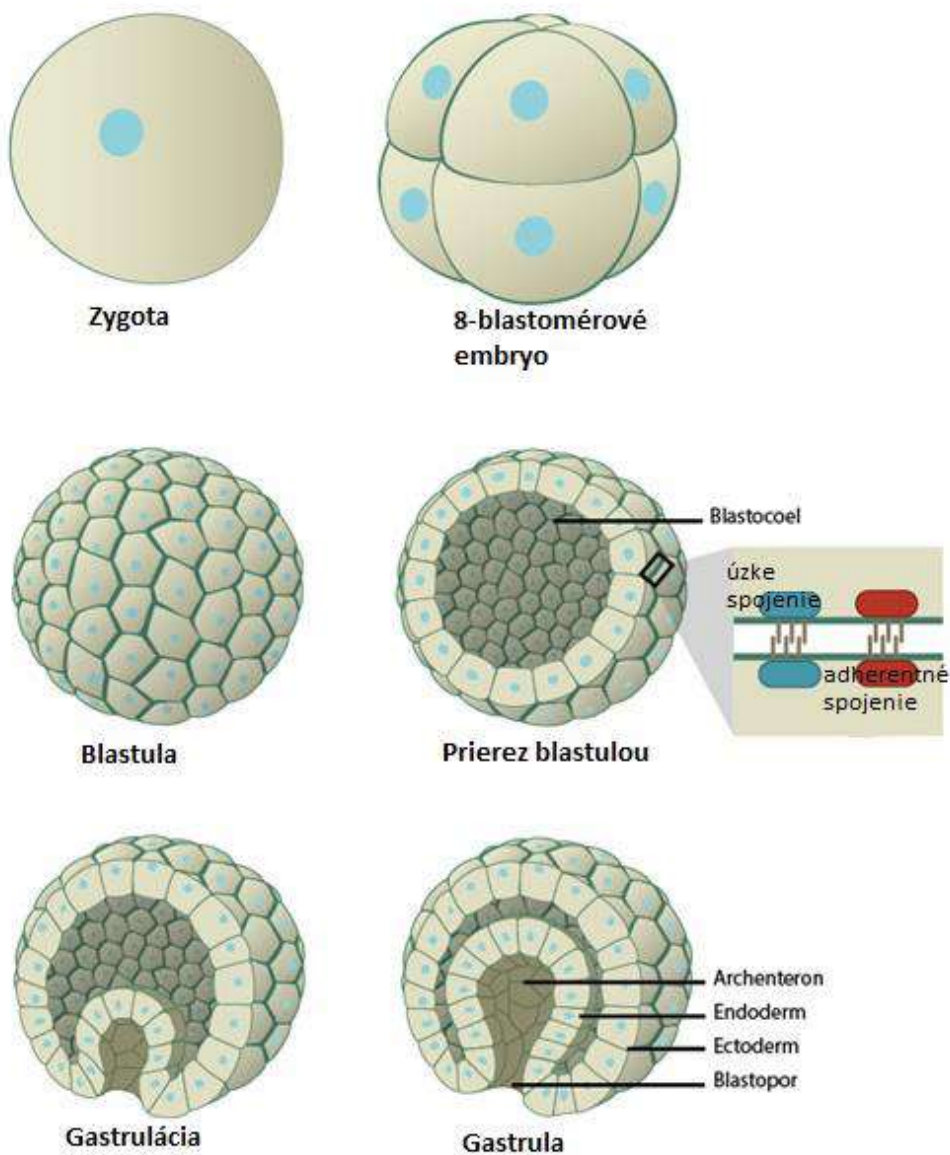
Štádium 16 buniek je charakterizované prítomnosťou šestnástich blastomér, z ktorých každá obsahuje rovnakú časť genetického materiálu embrya. V tomto štádiu sa blastoméry naďalej zväčšujú a majú nepravidelnejší tvar. Už nie sú pevne zbalené, ale sú voľne spojené a vytvárajú kompaktnú guľôčkovú štruktúru nazývanú morula.

Morula je pevná guľa buniek, ktoré sa ďalej delia a diferencujú. Takýmto spôsobom vznikajú dva typy buniek a to periférne uložený trofoblast a centrálné umiestnený embryoblast. V blastomérach sa vyskytujú fibrilogramulárne jadierka. Mitochondrie majú zvýšené množstvo kríst, ktoré sú rozmiestnené po celom matrici (Hyttel, Niemann, 1990). Po vytvorení blastocoelu vyplneného tekutinou, dochádza ku vzniku blastocysty.

Blastocysta je charakterizovaná dvoma odlišnými bunkovými populáciami: vonkajšou vrstvou trofoblastových buniek a vnútornou bunkovou hmotou (inner cell mass, ICM). Bunky trofoblastu hrajú kľúčovú úlohu pri implantácii a tvorbe placenty, zatiaľ čo ICM vedie k vlastnému embryu. Vnútorne bunky moruly vytvárajú vnútornú bunkovú hmotu, ktorá spôsobuje vznik žltkového vaku, allantoisu a amnionu.

Blastocysta sa začína postupne rozširovať v oblasti *zona pellucida* rozširovať z dôvodu nasávania tekutiny. Nasávanie tekutiny je spôsobené zmenou osmózy prívalom katiónov sodíka prostredníctvom sodíkovej pumpy plazmatickej membrány trofoblastických buniek. Po transporte blastocysty do maternice nastáva tzv. hatching (prasknutie). Pôsobením strypsínu dochádza k lýze *zona pellucida* a k uvoľneniu blastocysty. Akonáhle je blastocysta uvoľnená zo *zona pellucida*, tak nastáva implantácia k endometriu väzbou trofoblastových buniek, v ktorých sa nachádzajú integríny a endometriálnych receptorov pre kolagén, lamín a pod. Keď dôjde ku kontaktu trofoblastu s endometriom, dochádza k sekrécii ďalšej skupiny proteáz a to kolagenázy, stromelyzínu aktivátora plazminogénu. Tieto enzýmy štiepia extracelulárnu

matricu maternicového tkaniva, čo umožňuje samotnú implantáciu blastocysty (Sadler, 2011; Plusa, Piliszek, 2020).



Obrázok č. 20: Embryogenéza  
(Zdroj: Upravené z <https://www.mechanobio.info/development/>)

## 4.6 Regulácia embryogenézy

V štádiu ranej embryogenézy dochádza počas ryhovania k mnohonásobnému mitotickému deleniu. Tento proces je prísne regulovaný na molekulárnej úrovni, čím sa zabezpečuje správny vývoj a rast embrya. Pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré riadia delenie embryí je nevyhnutné pre pokrok v poznatkoch o embryonálnom vývoji a potenciálne zlepšenie technológií asistovanej reprodukcie.

### 4.6.1 Cyklíny (CDKs)

Jedným z primárnych molekulárnych regulátorov delenia embryí je skupina enzýmov známych ako cyklín-dependentné kinázy (CDKs). CDKs hrajú kľúčovú úlohu pri riadení bunkového cyklu a sú zodpovedné za spustenie bunkového delenia. Počas delenia embrya sa špecifické CDKs aktivujú v rôznych štádiách, aby riadili progresiu bunkového delenia.

CDKs patria do rodiny serín-treonín kináz s nízkou molekulovou hmotnosťou v rozsahu od 32 do 40 kDa. Na základe viacerých štúdií je aktuálne identifikovaných a popísaných cca 21 CDKs, pričom iba šesť (CDK1, 2, 3, 4, 6, 7) zohráva úlohu v progresii bunkového cyklu (Palmer, 2016).

CDK1, tiež známy ako Cdc2, je jednou z najdôležitejších CDK zapojených do ryhovania embryí. Tvorí komplex s cyklínom B a spoločne vytvárajú MPF, ktorý je zodpovedný za podporu prechodu z G2 fázy do mitózy. Aktivita CDK1 je prísne regulovaná degradáciou cyklínu B, čo zaisťuje správne načasovanie a koordináciu bunkového delenia počas štiepenia embrya (Kolonin *et al.*, 2000).

#### **CDK1/Cyklín B**

Počas ryhovania embrya sa bunkový cyklus skracuje a načasovanie každého delenia je prísne regulované. CDK1 spoločne s cyklínom B sú počas interfázy neaktívni a k ich aktivácii dochádza až pri prechode G2/M, čo spúšťa vstup do mitózy. Po aktivácii CDK1 fosforyluje množstvo substrátov zapojených do rôznych aspektov bunkového delenia, vrátane kondenzácie chromozómov, rozpadu jadrového obalu a zostavy vretienka.

Delenie embryí je vysoko dynamický proces, ktorý si vyžaduje presnú priestorovú a časovú reguláciu aktivity CDK1/cyklínu B. Štúdie ukázali, že hladiny cyklínu B mRNA a proteínu sa progresívne zvyšujú počas skorej embryogenézy, pričom svoj vrchol dosahujú v čase prvého delenia. Táto upregulácia zaisťuje, že je k dispozícii dostatok komplexu CDK1/cyklín B na

iniciáciu mitózy. Okrem toho je lokalizácia CDK1 a cyklínu B v embryu rozhodujúca pre správnu progresiu bunkového cyklu. Imunofluorescenčné štúdie odhalili, že CDK1 a cyklín B sú počas interfázy prevažne lokalizované v cytoplazme, ale počas mitózy sa premiestňujú do jadra (Martinsson-Ahlzén *et al.*, 2008).

### ***CIP/KIP***

Rodina proteínov CIP/KIP, vrátane p21, p27 a p57, sú kľúčovými regulátormi bunkového cyklu. Tieto proteíny pôsobia ako inhibítory cyklín-dependentných kináz, zastavujú progresiu bunkového cyklu a podporujú jeho zastavenie. Zatiaľ čo ich primárnou funkciou je regulovať prechod G1/S, objavujúce sa dôkazy naznačujú, že sa podieľajú aj na delení embryí. Správna regulácia štiepenia embryí je životne dôležitá pre normálny vývoj. Dysregulácia tohto procesu môže viesť k vývojovým abnormalitám a prejavu viacerých ochorení spojených s rakovinou (Besson *et al.*, 2008; Tateishi *et al.*, 2012).

### ***CKD4/CDK6***

Počas bunkového cyklu CDK4/CDK6 spolu s cyklínom D1, D2 a D3, tvoria aktívne komplexy, ktoré fosforylujú a aktivujú downstream ciele, čo umožňuje postup bunkového cyklu. Vo fáze G1 komplexy CDK4/CDK6-cyklín D fosforylujú proteín retinoblastómu (Rb), čo vedie k jeho inaktivácii a uvoľneniu transkripčného faktora E2F, ktorý podporuje expresiu génov potrebných na replikáciu DNA a progresiu bunkového cyklu. CDK4/CDK6 tiež fosforylujú ďalšie ciele zapojené do regulácie bunkového cyklu, ako sú p27 a p21, čím ďalej podporujú progresiu bunkového cyklu.

V rámci ranej embryogenézy a delenia je aktivita CDK4/CDK6 prísne regulovaná rôznymi faktormi. Materálne faktory, ako je cyklín E a cyklín A, sú zodpovedné za aktiváciu komplexov CDK4/CDK6. Okrem toho degradácia cyklínu D1 komplexom/cyklozómom podporujúcim anafázu (APC/C) zabraňuje nadmernej aktivite CDK4/CDK6, čím zabezpečuje správnu progresiu bunkového cyklu. Rovnováha medzi syntézou a degradáciou cyklínu D1 je rozhodujúca pre udržanie vhodných hladín aktivity CDK4/CDK6 počas štiepenia embryí.

V štádiu neskorej embryogenézy, kedy už dochádza k vytvoreniu blastocysty aktivita CDK4/CDK6 klesá. Tento pokles aktivity CDK4/CDK6 je spojený s downreguláciou cyklínu D1 a upreguláciou iných regulátorov bunkového cyklu, ako je cyklín E a cyklín B. Zmena aktivity CDK4/CDK6 je rozhodujúci faktor pre diferenciáciu a špecifikáciu buniek. Ukázalo sa, že



inhibícia aktivity CDK4/CDK6 v tomto štádiu podporuje diferenciáciu trofektodermu, zatiaľ čo udržiavanie vysokej aktivity CDK4/CDK6 vedie k zvýšenému počtu buniek vnútornej bunkovej hmoty (Boskstaale *et al.*, 2006; Satyanarayana *et al.*, 2009).

### ***Cyklíny D1***

D1 cyklíny, tiež známe ako cyklín D1, D2 a D3, sú kľúčovými regulátormi bunkového cyklu. Tieto proteíny tvoria komplexy s cyklín-dependentnými kinázami, ktoré fosforylujú cieľové proteíny, aby riadili progresiu bunkového cyklu. D1 cyklíny sú primárne zapojené do G1 fázy bunkového cyklu, kde podporujú prechod z G1 do S fázy, čím iniciujú replikáciu DNA. Okrem ich úlohy v bunkovom cykle sa D1 cyklíny podieľajú na rôznych bunkových procesoch, vrátane diferenciácie, apoptózy a tumorgenézy.

Expresia a aktivita D1 cyklínov je prísne regulovaná počas celého bunkového cyklu. Ich hladiny sa zvyšujú počas fázy G1 a vrcholía pri prechode G1/S, čo podporuje vstup do fázy S. Následne hladiny D1 cyklínu klesajú, keď bunky postupujú cez fázy S, G2 a M. Táto dynamická regulácia zabezpečuje správny priebeh bunkového cyklu a zabraňuje aberantnej proliferácii (Greer *et al.*, 2008; Caldon *et al.*, 2009).

### ***Cyklíny typu E***

Cyklíny typu E sú podtriedou cyklínových proteínov, ktoré sú primárne exprimované počas G1 fázy bunkového cyklu. Tvoria komplexy s cyklín-dependentnými kinázami (CDK). Komplexy cyklín-CDK typu E sa podieľajú na fosforylácii, vedú k prechodu z G1 do S fázy a iniciujú replikáciu DNA. U cicavcov boli identifikované dva hlavné cyklíny typu E: cyklín E1 a cyklín E2, pričom knockoutové experimenty na myšiach odhalili, že strata cyklínu E1 alebo cyklínu E2 vedie k vývojovým defektom a embryonálnej letalite (de Nooij *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004).

## **4.6.2 Rastové faktory**

Embryogenéza zahŕňa sériu presne organizovaných udalostí riadených množstvom molekulárnych signálov. Spomedzi týchto signálov hrajú kľúčovú úlohu práve rastové faktory, ktoré sa zapájajú do regulácie bunkovej proliferácie, diferenciácie a morfogenézy tkaniva. Rastové faktory tvoria rôznorodú skupinu signálnych molekúl, ktoré sú typicky vylučované špecifickými bunkami. Medzi základné rastové faktory zapojené do regulácie

embryogenézy možno zaradiť napr. FGF, TGF, IGF a pod. (Teurel *et al.*, 2000).

### **FGF**

Počas raného embryonálneho vývoja sú rastové faktory nevyhnutné na vytvorenie základu a vývoja embrya. Jedným z kľúčových rastových faktorov zahrnutých v tomto procese je fibroblastový rastový faktor (FGF).

Počas embryogenézy pôsobí FGF ako morfogén, signálna molekula, ktorá poskytuje bunkám informácie o polohe, čím ovplyvňuje ich osud a organizáciu vo vyvíjajúcom sa embryu. Gradienty FGF hrajú kľúčovú úlohu pri vytváraní osí tela a organizácii rôznych tkanív a orgánov. Signalizácia FGF je rozhodujúca pre tvorbu troch zárodočných vrstiev: ektoderm, mezoderm a endoderm. FGF vylučované bunkami v primitívnom pruhu vyvolávajú u susedných buniek prechod z epitelu na mezenchým, čo vedie k vytvoreniu mezodermu. Okrem toho sa FGF podieľajú na špecifikácii predozadnej osi a vzorovaní rôznych štruktúr, ako sú končatiny a zmyslové orgány (Neugebauer *et al.*, 2003; Dorey *et al.*, 2010).

### **TGF**

Ďalším dôležitým rastovým faktorom počas skorej embryogenézy je transformujúci rastový faktor beta (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  je multifunkčný cytokín, ktorý hrá kľúčovú úlohu v mnohých bunkových procesoch, vrátane embryogenézy. Svoje účinky uplatňuje väzbou na špecifické receptory bunkového povrchu, čím spúšťa signálnu kaskádu, ktorá reguluje génovú expresiu. Signálna dráha TGF- $\beta$  pozostáva z troch hlavných zložiek: ligandy (izoformy TGF- $\beta$ ), receptory (receptory TGF- $\beta$  I a II) a následné efekторы (proteíny Smad). Po väzbe ligandu receptory fosforylujú proteíny Smad, ktoré sa potom translokujú do jadra a modulujú génovú expresiu. Táto signálna dráha pôsobí ako centrálny regulátor embryonálneho vývoja, ovplyvňuje rozhodnutia o osude buniek, vzorovanie tkanív a organogézu.

TGF zohráva rozhodujúcu úlohu pri špecifikácii mezodermálnych a endodermálnych línií. Signalizácia TGF- $\beta$  tiež ovplyvňuje migráciu buniek a remodeláciu tkaniva počas gastrulácie, čo je proces, ktorý vytvára tri zárodočné vrstvy (Nawshad *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 2007).

### **BMP**

Počas organogézy rastové faktory naďalej zohrávajú zásadnú úlohu pri riadení diferenciácie buniek a morfogenézy tkanív. Jedným z takýchto rastových faktorov je kostný morfogenetický proteín (BMP). Signálna dráha

BMP je medzi druhmi vysoko konzervovaná a je zapojená do mnohých vývojových procesov. Dráha začína väzbou BMP ligandov na špecifické receptory bunkového povrchu, známe ako BMP receptory. Po interakcii ligand-receptor sa spustí kaskáda intracelulárnych udalostí, čo vedie k aktivácii downstream signálnych molekúl, vrátane proteínov Smad. Tieto aktivované Smads sa translokujú do jadra, kde regulujú transkripciu cieľových génov zapojených do rôznych bunkových procesov.

Signalizácia BMP sa podieľa na tvorbe rôznych orgánov vrátane kostí, svalov a centrálného nervového systému. Reguluje rozhodnutia o osude buniek podporou diferenciácie na špecifické typy buniek. Napríklad vo vyvíjajúcej sa končatine signalizácia BMP indukuje diferenciáciu mezenchymálnych buniek na chondrocyty, ktoré tvoria templát chrupavky pre tvorbu kosti (Tam, Loebel, 2007; Yu *et al.*, 2008).

### **VEGF**

Ďalším rastovým faktorom rozhodujúcim pre organogézu je vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF). Signalizácia VEGF je nevyhnutná pre vývoj cievneho systému. Počas raného embryonálneho vývoja začína tvorba krvných ciev vaskulogézou. Tento proces zahŕňa diferenciáciu a organizáciu endotelových buniek za vzniku primárneho vaskulárneho plexu, ktorý sa neskôr vyvinie do komplexnej siete krvných ciev. VEGF, vylučovaný rôznymi typmi buniek vrátane mezodermálnych buniek, pôsobí ako kľúčový regulátor vaskulogézy. Podporuje proliferáciu, migráciu a prežitie endotelových buniek, čím uľahčuje ich zostavenie do primitívnych krvných ciev. Okrem toho VEGF tiež indukuje expresiu ďalších faktorov podieľajúcich sa na tvorbe ciev, ako sú angiopoetíny a efríny, čo ďalej prispieva k vytvoreniu funkčného vaskulárneho systému.

Podporuje tvorbu krvných ciev indukciou proliferácie, migrácie a prežitia endotelových buniek. VEGF tiež hrá úlohu pri orgánovo špecifickej angiogéze. V tomto procese podporovaním proliferácie a migrácie endotelových buniek do oblastí tkanivovej hypoxie stimuluje produkciu proteolytických enzýmov, ktoré degradujú extracelulárnu maticu, čo umožňuje endotelovým bunkám preniknúť do okolitých tkanív a vytvárať nové cievy. Okrem toho VEGF riadi tvorbu cievnych výrastkov prostredníctvom svojej gradientovej distribúcie, čím zabezpečuje správne vzorovanie ciev a konektivitu.

VEGF okrem svojej úlohy vo vývoji ciev ovplyvňuje aj organogézu, proces, ktorým orgány a tkanivá získavajú svoje špecifické štruktúry a

funkcie. VEGF je exprimovaný v rôznych vyvíjajúcich sa orgánoch, vrátane pľúc, srdca, obličiek a mozgu, kde má orgánovo špecifické účinky (Tomanek *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2021).

### ***BDNF a NGF***

Nervový vývoj je veľmi zložitý proces, ktorý si vyžaduje presnú reguláciu bunkovej proliferácie, migrácie a diferenciácie. Rastové faktory, ako je neurotrofický faktor odvodený od mozgu (BDNF) a nervový rastový faktor (NGF) sú rozhodujúce pre prežitie a diferenciáciu neurónov.

BDNF, člen rodiny neurotrofínov, je široko exprimovaný vo vyvíjajúcom sa embryu a prejavuje svoje účinky prostredníctvom aktivácie svojho receptora, TrkB. Štúdie ukázali, že BDNF je rozhodujúci pre prežitie a diferenciáciu rôznych typov buniek počas embryogenézy. Napríklad vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme BDNF podporuje prežitie neurónov a podporuje ich diferenciáciu na špecifické podtypy. Okrem toho BDNF ovplyvňuje rast a vetvenie axónov, čím prispieva k vytvoreniu nervových okruhov. Okrem toho sa BDNF podieľa na vývoji tkanív, ako je kardiovaskulárny systém a kostrové svalstvo.

Podobne ako BDNF, aj NGF je neurotrofický faktor, ktorý hrá dôležitú úlohu v embryogenéze, najmä vo vývoji nervového systému. NGF sa viaže na svoj receptor TrkA a podporuje prežitie neurónov, diferenciáciu a rast axónov. Vo vyvíjajúcom sa periférnom nervovom systéme je NGF nevyhnutný na prežitie a udržiavanie sensorických a sympatických neurónov. Ovplyvňuje tiež rast a vedenie ich axónov, čím zabezpečuje správnu inerváciu cieľových tkanív.

Okrem účinkov na periférne neuróny sa NGF podieľa na vývoji centrálného nervového systému. Štúdie ukázali, že NGF ovplyvňuje prežitie a diferenciáciu špecifických populácií neurónov v mozgu, vrátane cholinergných neurónov zapojených do procesov učenia a pamäte. Okrem toho sa ukázalo, že NGF moduluje synaptickú plasticitu, čo prispieva k zdokonaleniu nervových obvodov počas vývoja (Kollins, 2003; Khalin *et al.*, 2015).

### ***Shh***

Ďalším rastovým faktorom zapojeným do neurálneho vývoja je Sonic hedgehog (Shh). Signalizácia Shh hrá kľúčovú úlohu pri vzorovaní nervovej trubice a špecifikovaní rôznych podtypov neurónov. Reguluje proliferáciu a diferenciáciu nervových progenitorových buniek, čím zabezpečuje správnu tvorbu centrálného nervového systému.

Signálna dráha Shh je vysoko konzervovaná dráha nachádzajúca sa v mnohých organizmoch vrátane ľudí. Produkciou proteínu Shh dochádza k väzbe na receptor Patched (Ptch). Táto väzba zmierňuje inhibíciu iného receptora, Smoothed (Smo), čo vedie k aktivácii transkripčných faktorov, ako sú Gli proteíny. Tieto transkripčné faktory potom vstupujú do jadra a regulujú expresiu cieľových génov zapojených do rôznych vývojových procesov. Signálna dráha Shh je prísne regulovaná na viacerých úrovniach, aby sa zabezpečila presná kontrola nad určením bunkového osudu a nad vzorovaním tkaniva (Yelin *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2019).

### ***PDGF***

Jedným kľúčovým faktorom, ktorý zohráva významnú úlohu pri regulácii týchto procesov, je rastový faktor odvodený od krvných doštičiek (PDGF). PDGF je rodina rastových faktorov, ktorá pozostáva z piatich izoformiem, a to PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC a PDGF-DD.

Počas raného embryonálneho vývoja je rozhodujúcim krokom tvorba troch zárodočných vrstiev – ektoderm, mezoderm a endoderm. Zistilo sa, že PDGF sa podieľa na regulácii bunkovej diferenciácie. Štúdie ukázali, že signalizácia PDGF je nevyhnutná pre indukciu a udržiavanie mezodermu. Podporuje expresiu mezodermálnych markerov a reguluje migráciu a proliferáciu mezodermálnych buniek.

Okrem toho sa PDGF podieľa na vývoji neurálnej lišty, čo je prechodná štruktúra, ktorá vedie k vzniku rôznych typov buniek, vrátane neurónov, gliových buniek a pigmentových buniek. Ukázalo sa, že PDGF-BB je rozhodujúci pre prežitie a migráciu buniek neurálnej lišty. Pôsobí ako chemoatraktant a riadi migráciu týchto buniek.

PDGF sa podieľa nielen na embryonálnom vývoji, ale tiež hrá významnú úlohu pri oprave a regenerácii tkaniva. Po poranení sa PDGF uvoľňuje z krvných doštičiek a pôsobí ako silný mitogén a chemoatraktant pre rôzne typy buniek zapojené do hojenia rán. Stimuluje proliferáciu a migráciu fibroblastov, endotelových buniek a buniek hladkého svalstva, čím podporuje tvorbu granulačného tkaniva a angiogézu (Moustakas, Heldin, 2007; Yang *et al.*, 2008).

### ***EGF***

Epidermálny rastový faktor (EGF) je ďalším rastovým faktorom, ktorý prispieva k oprave tkaniva. Jednou z primárnych funkcií EGF počas embryogenézy je podpora bunkovej proliferácie. EGF stimuluje bunkový cyklus aktiváciou signálnych dráh, ktoré poháňajú bunky z fázy G1 do fázy S,

kde dochádza k replikácii DNA. Táto aktivácia je sprostredkovaná upreguláciou cyklínov a cyklín-dependentných kináz (CDK), ktoré sú kľúčovými regulátormi bunkového cyklu.

EGF tiež hrá úlohu pri udržiavaní rovnováhy medzi bunkovou proliferáciou a bunkovou smrťou. Ukázalo sa, že EGF môže chrániť bunky pred apoptózou, procesom programovanej bunkovej smrti. Tento antiapoptotický účinok EGF je rozhodujúci pre prežitie a rast vyvíjajúcich sa embryí.

Okrem svojej úlohy pri proliferácii buniek sa EGF podieľa aj na diferenciácii buniek počas embryogenézy. Bunková diferenciácia je proces, ktorým bunky získavajú špecializované funkcie a vlastnosti. Signalizácia EGF môže podporovať alebo inhibovať diferenciáciu buniek v závislosti od kontextu. Napríklad pri vývoji nervového systému EGF signalizácia podporuje proliferáciu nervových progenitorových buniek a inhibuje ich diferenciáciu na zrelé neuróny.

Migrácia buniek je ďalším kritickým procesom počas embryogenézy, pretože umožňuje bunkám dosiahnuť ich správne miesta určenia a vytvoriť správne tkanivové štruktúry. Ukázalo sa, že signalizácia EGF reguluje migráciu buniek v rôznych vývojových kontextoch. EGF môže indukovať migráciu buniek podporovaním zmien bunkovej adhézie a cytoskeletálnych preskupení. Aktivuje signálne dráhy, ktoré regulujú expresiu adhézných molekúl, ako sú integríny, a cytoskeletálnych proteínov, ako je aktín a myozín. Tieto zmeny umožňujú bunkám odpojiť sa od ich pôvodného umiestnenia a migrovať smerom k ich cieľovým destináciám (Carson *et al.*, 2000; Large, Demayo, 2012).

### **IGFs**

Počas skorej embryogenézy sú IGF nevyhnutné na vytvorenie a udržanie pluripotencie v embryonálnych kmeňových bunkách (ESCs). Podporujú samoobnovu a zabraňujú diferenciácii aktiváciou kľúčových transkripčných faktorov vrátane Oct4, Nanog a Sox2. Okrem toho IGF zvyšujú prežitie ESC inhibíciou apoptózy a podporou progresie bunkového cyklu.

IGF taktiež zohrávajú kľúčovú úlohu pri tvorbe troch zárodočných vrstiev: ektoderm, mezoderm a endoderm. Regulujú diferenciáciu pluripotentných buniek na špecifické línie, čím prispievajú k vývoju rôznych tkanív a orgánov. Napríklad IGF signalizácia sa podieľa na tvorbe neurálnej trubice, vývoji pukov končatín a na morfogénéze srdca. Ako embryogenéza postupuje, dochádza k organogénéze, ktorá zahŕňa zložitý vývoj orgánov a tkanív. IGF sú životne dôležité regulátory tohto procesu, ovplyvňujúce bunkovú

proliferáciu, diferenciáciu a migráciu. Vo vyvíjajúcom sa mozgu IGF podporujú prežitie neurónov a rast axónov. Prispievajú tiež k tvorbe mozgovej kôry, hypokampu a mozočku. Nedostatočná signalizácia IGF počas tohto obdobia môže mať za následok spomalenie rastu a vývojové abnormality (Thatcher *et al.*, 2003; Wathes *et al.*, 2003).

### **LIF**

Leukemický inhibičný faktor (LIF) bol pôvodne identifikovaný pre svoju schopnosť indukovať terminálnu diferenciáciu myeloidných leukemických buniek. Odvtedy sa však zistilo, že má rôzne funkcie ako podpora rastu a diferenciácie rôznych cieľových buniek, ovplyvňuje metabolizmus kostí, nervový vývoj, zápalové reakcie a čo je dôležité, embryogenézu (Aghajanova, 2004).

Počas embryogenézy LIF zohráva rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní pluripotentných kmeňových buniek. Pluripotentné kmeňové bunky majú jedinečnú schopnosť diferencovať sa na akýkoľvek typ bunky v tele. LIF pôsobí ako kľúčový regulátor sebaobnovy v embryonálnych kmeňových bunkách, čo im umožňuje udržanie nediferencovaného stavu.

Okrem toho LIF interaguje s tzv. mechanickou reguláciou, ktorá na základe fyzikálnych podnetov reguluje tvar, migráciu a diferenciáciu buniek. Štúdie ukázali, že LIF môže modulovať reakciu buniek na mechanické podnety, čím ovplyvňuje ich správanie, napríklad LIF zvyšuje schopnosť ESC vnímať mechanické sily a reagovať na ne, čím podporuje ich samoobnovu v *in vitro* kultivácii (Huang *et al.*, 2015; Valet, Siggia, Brivanlou, 2022).

### **4.6.3 Hormóny**

Vývoj embryí je zložitý proces, ktorý si vyžaduje optimálne kultivačné podmienky na podporu rastu a diferenciácie. Hormonálna suplementácia hrá zásadnú úlohu pri zvyšovaní účinnosti produkcie embryí v *in vitro* podmienkach a kvality produkcie embryí *in vitro*.

### **FSH**

Folikuly stimulujúci hormón (FSH) je jedným z kľúčových hormónov zapojených do vývoja folikulov a dozrievania oocytov. Ukázalo sa, že jeho suplementácia v kultivačných médiách počas IVP zlepšuje množstvo a kvalitu získaných oocytov. FSH v *in vivo* podmienkach stimuluje rast viacerých folikulov, čím zvyšuje šance na získanie zrelých oocytov. Okrem toho FSH podporuje syntézu estrogénu, ktorý je rozhodujúci pre správne dozrievanie

oocytov. Viaceré štúdie uvádzajú vyššiu mieru tvorby blastocýst a zlepšenu kvalitu embryí po pridaní FSH do kultivačného média.

Je však dôležité poznamenať, že optimálna koncentrácia FSH sa líši medzi rôznymi druhmi a dokonca aj v rámci rôznych štádií vývoja folikulov. Nadmerná suplementácia FSH môže viesť k nadmernej stimulácii, čo má za následok zlé embryonálnu kvalitu alebo dokonca zastavenie embryogenézy (Selman *et al.*, 2002; Hutt, Albertini, 2007).

## **LH**

LH je ďalší hormón, ktorý sa podieľa na dosiahnutí konečných štádií dozrievania oocytov a zahájenia ovulácie. Jeho suplementácia v kultivačných médiách počas IVP môže zlepšiť kvalitu oocytov a následný vývoj embrya. LH pôsobí synergicky s FSH na podporu konečných štádií dozrievania oocytov, vrátane jadrového a cytoplazmatického dozrievania. Tento hormón tiež zohráva rozhodujúcu úlohu pri obnovení meiózy, ktorá je nevyhnutná pre úspešné oplodnenie.

Štúdie ukázali, že pridanie LH do kultivačného média zvyšuje kompetenciu oocytov a následný vývoj embrya. Okrem toho suplementácia LH zvyšuje embryonálny metabolizmus a produkciu energie. To je kľúčové pre reguláciu vysokých energetických nárokov vyvíjajúcich sa embryí a zabezpečenie ich správneho rastu a vývoja. Optimálna koncentrácia LH sa taktiež odlišuje medzi rôznymi druhmi. Nadmerná suplementácia LH môže viesť k predčasnemu dozrievaniu oocytov alebo dokonca spontánnej ovulácii, čo môže negatívne ovplyvniť produkciu embryí (Tesarik *et al.*, 2003; Olivennes *et al.*, 2000; Hutt, Albertini, 2007).

## **Progesterón**

Progesterón je kľúčový hormón, ktorý sa podieľa na príprave maternice. Progesterón podporuje citlivosť endometria tým, že vyvoláva zmeny v maternicovej výstelke, čím sa stáva priaznivejším pre implantáciu embrya. Jeho suplementácia v kultivačných médiách počas IVP môže napodobňovať prirodzené hormonálne prostredie potrebné pre úspešný vývoj embrya.

Ukázalo sa, že pridanie progesterónu do kultivačného média zlepšuje kvalitu embryí a následné tehotenstvo. Suplementácia progesterónu počas neskorších štádií kultivácie embryí môže zvýšiť vývoj blastocýst a zvýšiť šance na úspešnú implantáciu. Optimálna koncentrácia a trvanie suplementácie progesterónu sa však môžu líšiť medzi rôznymi druhmi a mali by byť starostlivo určené, aby sa predišlo akýmkoľvek nepriaznivým účinkom (Lonergan, 2011; Large, Demayo, 2012; Lonergan, Forde, Spencer, 2016).



## **PMSG**

Suplementácia konského sérového gonadotropínu (PMSG) v kultivačných médiách počas produkcie embryí *in vitro* si v posledných rokoch získala významnú pozornosť. PMSG je hormón extrahovaný z krvi gravidných kobýl a jeho použitie má niekoľko pozitívnych účinkov na produkciu embryí *in vitro*. Jednou z hlavných výhod je jeho schopnosť stimulovať rast a dozrievanie folikulov. PMSG pôsobí podobne ako FSH a podporuje vývoj viacerých folikulov vo vaječníkoch. To má za následok zvýšený počet oocytov dostupných na oplodnenie, čo v konečnom dôsledku vedie k vyššiemu výťažku embryí.

Okrem toho sa zistilo, že suplementácia PMSG zlepšuje kvalitu embryí produkovaných *in vitro*. Štúdie ukázali, že PMSG zlepšuje dozrievanie oocytov, čo vedie k lepšej vývojovej kompetencii a vyššej miere tvorby blastocýst. Zlepšená kvalita embryí je kľúčová pre úspešný prenos embryí a následnú graviditu.

Ďalšou výhodou suplementácie PMSG je jeho schopnosť synchronizovať vývoj folikulov u darcovských zvierat. Podávaním PMSG viacerým zvieratám súčasne je možné vyvolať rast a dozrievanie folikulov súčasne. Táto synchronizácia umožňuje efektívnejšiu produkciu embryí, pretože oocyty možno odobrať z viacerých zvierat v úzkom časovom rámci. To je výhodné najmä v komerčných prostrediach, kde sa požaduje produkcia embryí vo veľkom meradle (Nishijima *et al.*, 2014; Son *et al.*, 2022).

## **HCG**

Ľudský choriový gonadotropín (HCG), hormón prirodzene produkovaný počas tehotenstva bol skúmaný z hľadiska jeho potenciálnych výhod, keď je suplementovaný v kultivačných médiách. Suplementácia HCG v kultivačných médiách ukázala sľubné výsledky pri zlepšovaní vývoja embryí počas IVEP. HCG pôsobí ako náhrada za LH, ktorý spúšťa posledné štádiá dozrievania oocytov a ovulácie. Pridaním HCG do kultivačného média napodobňuje prirodzené hormonálne prostredie, čím podporuje optimálne podmienky pre vývoj embryí. Štúdie uvádzajú zlepšenú mieru oplodnenia, zvýšenú tvorbu kvalitných blastocýst a zlepšenú kvalitu embryí. Okrem toho sa zistilo, že suplementácia HCG pozitívne ovplyvňuje načasovanie embryonálneho vývoja.

Výskum naznačuje, že HCG môže synchronizovať vývojové štádiá embryí, čo vedie k jednotnejšej kohorte embryí vhodných na transfer. Táto synchronizácia je rozhodujúca pre úspešný prenos a implantáciu embryí,

pretože zabezpečuje, že embryá sú vo vhodnom štádiu vývoja pre optimálnu receptivitu maternice (Licht, Russu, Wildt, 2001; Makrigiannakis *et al.*, 2017).

## **E2**

Estradiol (E2) je steroidný hormón zapojený do rôznych fyziologických procesov vrátane reprodukcie. Patrí do skupiny hormónov dôležitých pre maturáciu oocytov a udržiavanie správnej funkcie samičieho reprodukčného systému. Ako jeden z hlavných samičích pohlavných hormónov sa podieľa na rôznych fyziologických procesoch, vrátane regulácie estrálneho a menštruačného cyklu, vývoja sekundárnych pohlavných charakteristík a kontroly plodnosti. V posledných rokoch však získal uznanie hlavne v participácii v rámci mitochondriálneho dýchania a metabolizme reaktívnych foriem kyslíka (ROS).

Maturačné médiá používané v technológiách asistovanej reprodukcie (ART) často obsahujú E2 ako kľúčovú zložku hlavne kvôli jeho úlohe pri podpore dozrievania oocytov. Pôsobí na granulózne bunky, čím stimuluje produkciu faktorov potrebných pre vývin. Koncentrácia E2 v maturačnom médiu je starostlivo kontrolovaná, aby sa zabezpečili optimálne podmienky pre rast a dozrievanie oocytov (Chauvin *et al.*, 2022).

## **4.7 Regulácia embryogenézy *in vitro***

Regulácia embryogenézy *in vitro* zahŕňa manipuláciu s podmienkami, za ktorých sa embryá vyvíjajú mimo tela. Táto technika umožňuje výskumníkovi študovať rôzne štádiá embryonálneho vývoja v kontrolovanom prostredí a poskytuje cenné poznatky o mechanizmoch, ktoré riadia rast a diferenciaciu. Zmenou faktorov, ako je teplota, dostupnosť živín a hladiny hormónov, môžu vedci pozorovať, ako tieto zmeny ovplyvňujú vývoj embrya.

Jednou z oblastí, kde sa *in vitro* regulácia embryogenézy ukázala ako obzvlášť užitočná, je reprodukčná medicína. Technológie asistovanej reprodukcie, ako je oplodnenie *in vitro* (IVF), sa spoliehajú na manipuláciu s embryami v laboratórnych podmienkach. Pochopením zložitosti embryonálneho vývoja môžu lekári optimalizovať podmienky na zlepšenie úspešnosti týchto postupov, čo ponúka nádej párom, ktoré zápasia s neplodnosťou.

#### 4.7.1 Kultivačné média v rámci IVP

V rámci *in vitro* produkcie embryí sledujeme posledné desaťročia snahu o simuláciu *in vivo* prostredia. Oplodnenie *in vitro* spôsobilo revolúciu v oblasti reprodukčnej medicíny a ponúka nádej párom, ktoré zápasia s neplodnosťou. Jedným z kľúčových aspektov IVF je vhodný výber kultivačných podmienok. Okrem inkubačných podmienok je kľúčovým faktorom výber vhodného kultivačného média. Kultivačné médium sa využíva na podporu rastu a vývoja embryí, pričom výber kultivačného média môže významne ovplyvniť mieru úspešnosti IVF postupov.

Počas základných výskumov sa študoval nie len metabolizmus preimplantačných embryí cicavcov, ale aj zloženie tekutiny izolovanej z reprodukčného traktu samíc. Výskumy preukázali špecifické potreby vo vývojovom štádiu embrya rastúceho *in vitro*, čo viedlo k zahájeniu výskumov zameraných na vývoj v zložení a formulácii médií na kultiváciu embryí, čo viedlo k zlepšeným výsledkom a vyššej miere úspešnosti v technológiách asistovanej reprodukcie (Jimenez, 2001; Nakatani, Torres-Padilla, 2023).

Výskum kultivačných médií bol zahájený koncom 19. storočia, Bernardom Zondekom, ktorý tvrdil, že prostredie a telové tekutiny obkolesujúce tkanivá, orgány predstavujú dôležitý faktor skúmania *in vitro*. O necelých 10 rokov tak Alexis Hartmann predstavil Ringerov roztok. Ringerov roztok, tiež známy ako roztok laktátu sodného, našiel využitie v chirurgii a využíva sa dodnes. Kultivačné médiá vyvinuté a používané v klinickom prostredí boli skonštruované tak, aby podporovali vývoj a *in vitro* kultiváciu hlavne somatických buniek.

V prvých dňoch IVF boli kultivačné médiá relatívne jednoduché, pozostávali hlavne zo zásaditých soľných roztokov doplnených o sérum alebo proteínové extrakty. Týmto médiám však chýbala presná rovnováha živín potrebná na optimálny vývoj embrya. Prvý úspech v rámci oplodnenia ľudského oocyту *in vitro* patrí Robertovi Edwardsovi, ktorý využil jednoduché chemicky definované médium, ktoré bolo neskôr modifikované za vzniku vyváženého soľného roztoku, ktorý na základe miernej modifikácie dnes nájdeme pod označením ako Ham's F10 alebo T6. Tieto média už boli doplnené o séra, čo prinieslo variabilitu médií, ale aj vznik potenciálneho rizika spojeného s prenosom infekcií. V dôsledku toho výskumníci začali skúmať alternatívne možnosti na zlepšenie podmienok kultivácie embryí (Van der Valk *et al.*, 2010; Morbeck *et al.*, 2014).

Vývoj chemicky definovaných kultivačných médií znamenal významný míľnik vo vývoji techník kultivácie embryí. Tieto médiá sú formulované zo starostlivo vybraných komponentov, vrátane aminokyselín, vitamínov, minerálov a zdrojov energie tak, aby napodobňovali prirodzené prostredie vyvíjajúceho sa embrya. Poskytnutím kontrolovanejšieho a konzistentnejšieho prostredia prispeli chemicky definované kultivačné médiá k zlepšeniu kvality embryí a vyššej miere gravidity.

Okrem toho došlo aj k optimalizácii hladín pH a osmolarity v kultivačnom médiu. Udržiavanie vhodného rozsahu pH (okolo 7,2-7,4) pomáha predchádzať okysleniu alebo alkalizácii kultivačného prostredia, čo môže byť škodlivé pre rast embryí. Podobne udržiavanie osmolarity v úzkom rozmedzí zaisťuje, že embryá nie sú vystavené osmotickému stresu, ktorý by mohol ohroziť ich životaschopnosť.

Kultivačné médiá možno na základe zloženia a zložitosti rozdeliť do štyroch skupín a to:

- **Tradičné médiá:** Tradičné médiá sa používajú už desaťročia a svoje využitie majú až dodnes. Tieto médiá zvyčajne pozostávajú zo zmesi solí, aminokyselín, vitamínov a zdrojov energie. Ich cieľom je napodobniť prirodzené prostredie vajcovodov, kde dochádza k oplodneniu a skorému vývoju embrya. Hoci tradičné médiá vykazujú primeranú mieru úspešnosti, môžu im chýbať určité základné zložky potrebné na optimálny rast embryí.
- **Sekvenčné médiá:** Tieto médiá zahŕňajú použitie rôznych formulácií médií vhodných pre špecifické štádiá vývoja embrya. Napríklad jeden typ média sa môže použiť na oplodnenie a skoré štádiá delenia, zatiaľ čo iné sa použije počas štádia blastocysty. Cieľom sekvenčných kultivačných médií je poskytnúť presnejšie a prispôsobené podmienky pre každú fázu vývoja embryí, čo môže potenciálne zlepšiť kvalitu výsledných embryí.
- **Jednokrokové médiá:** Nazývané aj kontinuálne kultivačné médiá, si v posledných rokoch získali popularitu. Tieto médiá sú navrhnuté tak, aby podporovali vývoj embryí vo všetkých štádiách bez potreby výmeny médií. Odstránením niekoľkých výmen médií majú jednokrokové kultivačné médiá za cieľ poskytnúť embryám stabilnejšie prostredie. Tento prístup znižuje potenciálny stres vo vývoji embryí a môže zlepšiť celkovú úspešnosť.
- **Časozberné kultivačné médiá:** Predstavujú významný pokrok v oblasti kultivácie embryí. Tieto médiá sa používajú v spojení s

časozbernými zobrazovacími systémami, ktoré umožňujú nepretržité monitorovanie vývoja embryí bez narušenia embryí. Časozberné kultivačné médiá poskytujú dynamické prostredie, ktoré umožňuje podrobné hodnotenie morfológie embryí, kinetiky a ďalších parametrov. Tieto informácie v reálnom čase môžu pomôcť embryológom vybrať najživotaschopnejšie embryá na prenos, čo môže potenciálne zlepšiť mieru tehotenstva (Summers, Biggers, 2003; Gruber, Klein, 2011; Chronopoulou, Harper, 2014).

V rámci *in vitro* produkcie embryí modelového organizmu ošípanej sa využíva PZM3 final medium. Finálne médium PZM3 sa ukázalo ako sľubná možnosť vďaka svojmu jedinečnému zloženiu a schopnosti zvýšiť kvalitu a životaschopnosť embryí. Pozostáva z rôznych zložiek vrátane aminokyselín, vitamínov, minerálov, energetických substrátov a rastových faktorov. Tieto prvky fungujú synergicky a poskytujú potrebné živiny pre rast embryí v rôznych štádiách vývoja.

Aminokyseliny hrajú kľúčovú úlohu v syntéze bielkovín, ktorá je nevyhnutná pre delenie a diferenciáciu buniek. Finálne médium PZM3 obsahuje vyváženú kombináciu esenciálnych a neesenciálnych aminokyselín, čo zaisťuje, že embryá majú prístup ku všetkým stavebným kameňom potrebným na ich vývoj.

Vitamíny a minerály sú tiež životne dôležité pre vývoj embryí, pretože pôsobia ako kofaktory mnohých enzymatických reakcií. Finálne médium PZM3 je obohatené o komplexný rad vitamínov a minerálov, čo zaisťuje, že embryá počas svojho rastu dostanú primeranú nutričnú podporu.

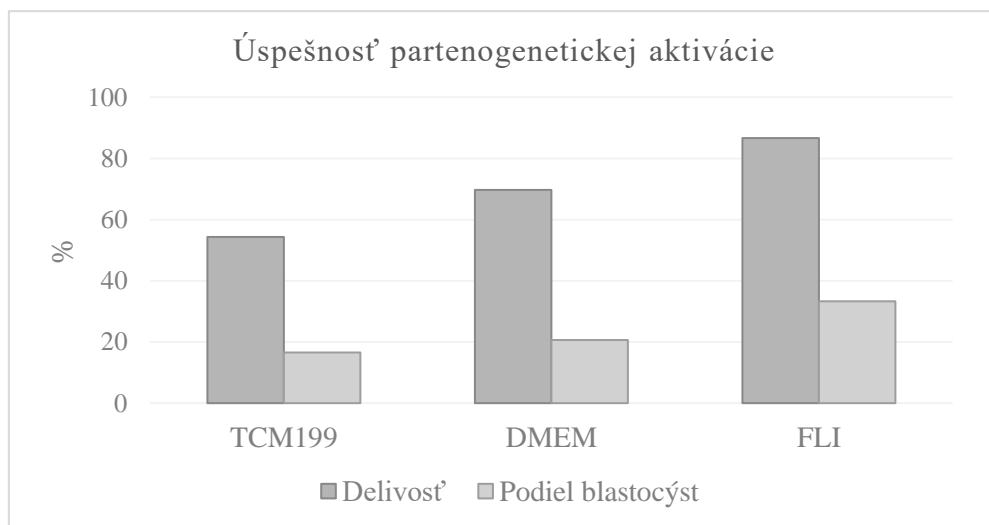
Energetické substráty, ako je glukóza a Na-pyruvát, sú nevyhnutné na poskytovanie energie potrebnej pre jednotlivé bunkové procesy. Konečné médium PZM3 obsahuje optimálne koncentrácie týchto substrátov, čo zaisťuje, že embryá majú prístup k dostatočným zdrojom energie pre ich metabolické potreby. Okrem toho je konečné médium PZM3 doplnené rastovými faktormi, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii embryonálneho vývoja. Tieto rastové faktory podporujú bunkovú proliferáciu, diferenciáciu a prežitie, čím v konečnom dôsledku zvyšujú kvalitu a životaschopnosť embryí (Yoshioka *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2022).

#### **4.7.2 Vplyv maturačných médií na ranú embryogenézu**

V rámci výsledkov získaných z *in vitro* maturácie oocytov nadviazal náš výskum na vplyv maturačných embryí na ranú embryogenézu. V rámci tohto experimentu sme si zvolili chemickú aktiváciu oocytov prostredníctvom

pôsobenia iomycínu počas 5 minút kultivácie. Následne boli aktivované oocyty premyté a kultivované 5 hodín v inkubačných podmienkach v PZM3 médiu doplnenom o 6-dimetylaminopurin (6-DMAP). Po 5 hod kultivácii boli oocyty premyté a 7 dní kultivované v PZM3 médiu v inkubačných podmienkach.

V prípade chemickej aktivácie sme v rámci každej experimentálnej skupiny analyzovali delivosť a podiel blastocýst v skupine tvorenej z 800 embryí. V prvej experimentálnej skupine tvorenej oocytmi maturovanými v TCM-199 médiu dosiahla úspešnosť delivosti zygot v 54,4% pričom podiel blastocýst bol tvorený 16,5%. V druhej experimentálnej skupine, tvorenej oocytmi maturovanými v DMEM médiu dosiahli delivosť zygot v 69,7% a podiel blastocýst v 20,6%. V tretej experimentálnej skupine tvorenej oocytmi maturovanými vo FLI médiu sme pozorovali 86,6% podiel delivosti zygot a 33,3% podiel blastocýst (Graf 4). Získané výsledky je možné porovnať s inými štúdiami ako napríklad s Procházka *et al.* (2012), ktorí sledovali delivosť embryí ošípanej v 81,4%, čo sa približuje našej FLI experimentálnej skupine. Avšak v rámci porovnania úspešnosti dosiahnutia štádia blastocýst možno povedať, že v porovnaní s FLI experimentálnou skupinou, bol ich výsledok omnoho nižší (18,1% vs. 33,3%). Nami dosiahnuté výsledky vo FLI experimentálnej skupine korelujú s Che *et al.* (2007), ktorí pomocou chemickej aktivácie sledovali delivosť zygot v 71% a podiel blastocýst dosiahol 32%. Predpokladáme, že rozdielne výsledky sú spôsobené hlavne inými laboratórnymi podmienkami, kvalitou živočíšneho materiálu (oocytov), ľudským faktorom, typom a zložením maturačného média.

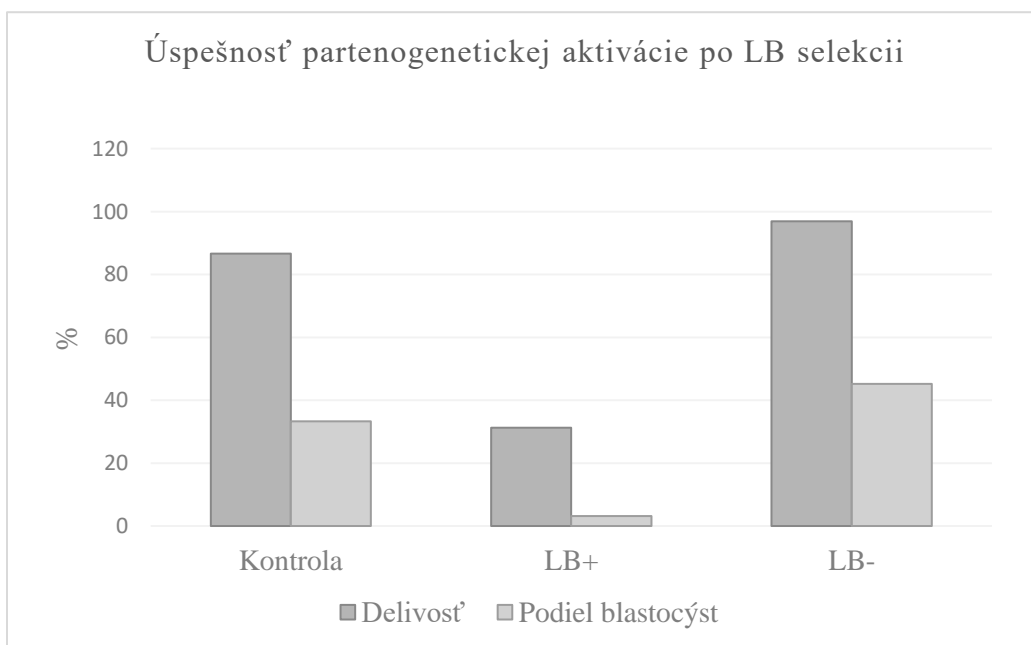


Graf č.4 Partenogenetická aktivácia oocytov

### 4.7.3 Vplyv vitálnej selekcie na ranú embryogenézu

Na základe predchádzajúcich výsledkov sme sa rozhodli detegovať rozdiely v rámci embryogenézy po vitálnej selekcii LB. Na základe LB selekcie sme oocyty maturovali vo FLI médiu a následne sme ich aktivovali pomocou chemickej aktivácie s kultiváciou v PZM3 médiu. V prípade chemickej aktivácie sme v rámci každej experimentálnej skupiny analyzovali delivosť a podiel blastocýst v rámci skupín tvorených z 800 embryí. V prvej experimentálnej skupine tvorenej aktivovanými oocytmi v rámci kontroly dosiahla úspešnosť delivosti zygot 87,2%, pričom podiel blastocýst bol tvorený 33,1%. V druhej experimentálnej skupine, tvorenej aktivovanými LB+ oocytmi dosiahla delivosť zygot v 31,2% a podiel blastocýst v 3,2%. V tretej experimentálnej skupine tvorenej aktivovanými LB- oocytmi sme pozorovali 96,8% podiel delivosti zygot a 45,16% podiel blastocýst (Graf 5).

V rámci chemickej aktivácie sme v tomto prípade využili vitálnu selekciu LB. V rámci našich výsledkov sme dosiahli podobné výsledky ako v prípade Dutta *et al.*(2016), ktorí sledovali 84,5% úspešnosť delivosti v prípade kontrolnej skupiny, 87,7% v prípade LB- a 62,9% v prípade LB+. Porovnaním LB a BCB vitálnej selekcie, Opiela *et al.* (2013) uviedli, že detegovali rovnako významné rozdiely medzi experimentálnymi skupinami ako my, avšak sledované úspešnosti s našimi výsledkami nekorelovali.

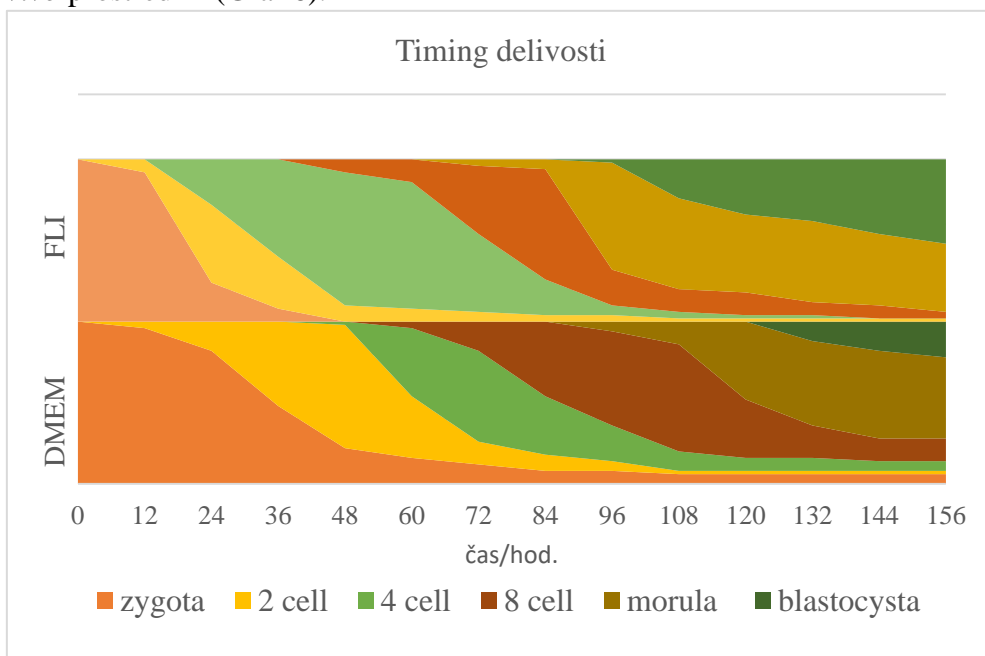


Graf č. 5 Partenogenetická aktivácia oocytov po LB selekcii

#### 4.7.4 Vplyv maturačného média na načasovanie delivosti

V rámci delivosti je jedným zo sledovaných faktorov aj tzv. timing. Timing alebo načasovanie delenia embryí je kľúčové vzhľadom nato, že odráža celkovú kvalitu a životaschopnosť embrya. Dobre načasované a synchronizované delenie naznačuje, že embryo sa vyvíja normálne a má potenciál úspešne sa implantovať do maternice. Na druhej strane nepravidelné alebo oneskorené delenie môže naznačovať chromozomálne abnormality alebo iné vývojové problémy, ktoré by mohli ohroziť šance embrya na implantáciu a následný vývoj.

Štúdie ukázali, že embryá s pravidelnejšími a synchronizovanejšími deleniami majú tendenciu mať vyššiu mieru implantácie a lepšie vývojové výsledky. Je to preto, že správne načasovanie delenia zaisťuje, že embryo dosiahne štádium blastocysty v správnom čase, čo mu umožní interagovať s maternicovou výstelkou a vytvoriť úspešné tehotenstvo. Práve preto bol jedným z nami sledovaných faktorov aj timing delivosti embryí. Sledovaním časového rozmedzia delivosti v rámci DMEM vs. FLI experimentálnych skupín sme sledovali významne rozdiely. V rámci delivosti embryí získaných chemickou aktiváciou oocytov maturovaných vo FLI médiu sme sledovali skrátenie času potrebného na dosiahnutie štádia blastocysty, čo koreluje s *in vivo* prostredím (Graf 6).

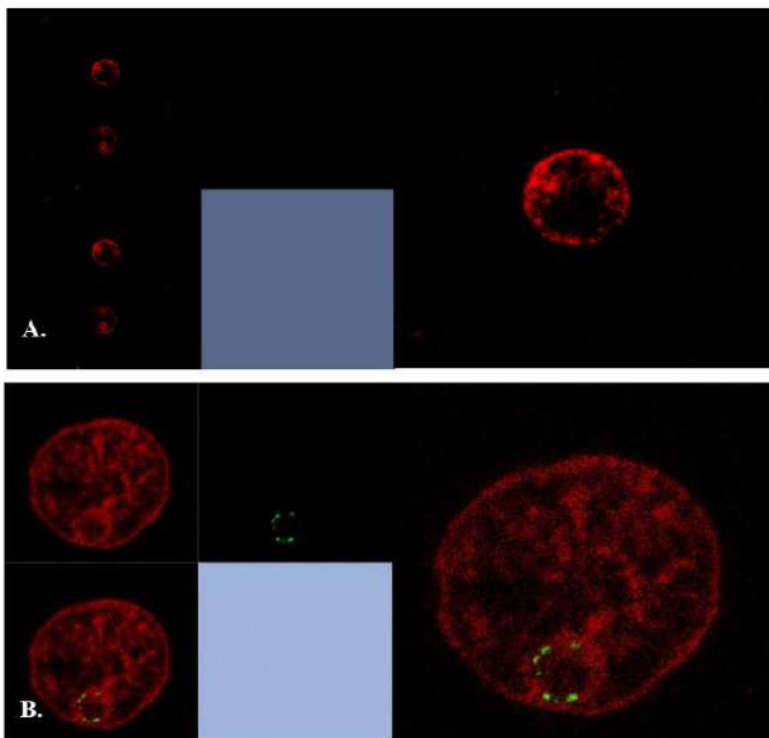


Graf č.6 Načasovanie delivosti embryí (A. R. Bartková, 2023)



#### 4.7.5 Vplyv maturačného média na aktiváciu embryonálneho genómu

Proces skorého embryonálneho vývoja je komplexná a prísne regulovaná séria udalostí, ktoré v konečnom dôsledku vedú k vytvoreniu plne funkčného organizmu. Jedným z kritických štádií tohto procesu je aktivácia embryonálneho genómu (EGA). V rámci získaných výsledkov sme sa rozhodli zamerať sa na detekciu aktivácie embryonálneho genómu pomocou imunocytochemického značenia upstream binding factora (UBF).



Obrázok č.21: UBF značenie 4- bunkových embryí ošípanej  
A. Červené 4-bunkové embryo z DMEM B. červené 4-bunkové embryo  
z FLI so zeleným pozitívnym značením UBF  
(Zdroj: Alexandra R.Bartková, 2021)

V prípade ošípanej dochádza v *in vivo* podmienkach k aktivácii embryonálneho genómu počas tretieho bunkového cyklu (t.j. 4-bunkového štádia). V prípade *in vitro* dochádza k EGA až v 8-bunkovom štádiu (Laurinčík *et al.*, 2004). Táto aktivácia sa v *in vivo* podmienkach zvyčajne vyskytuje súbežne s tvorbou jadierka a nepriamo signalizuje transkripciu génov ribozomálnej RNA (rRNA). V prípade imunocytochemie sme sa zamerali na UBF, pretože je nevyhnutný pre transkripciu génov rRNA. V

embryách prvej experimentálnej skupiny (DMEM) sme pozorovali pozitívne značenie v 8-bunkovom štádiu. V prípade druhej experimentálnej skupiny (FLI) sme pozitívne značenie UBF sledovali už vo 4-bunkovom štádiu. Konkrétne v 45% NPBs bez formácie častí retikulárneho jadierka a v 55% retikulárnych jadierkach pozorovaných v jednotlivých blastomérach analyzovaných embryí (Obr.21). Toto zistenie poukazuje na aktivitu embryonálneho genómu 4-bunkových embryí získaných partenogenetickou aktiváciou oocytov maturovaných vo FLI médiu.

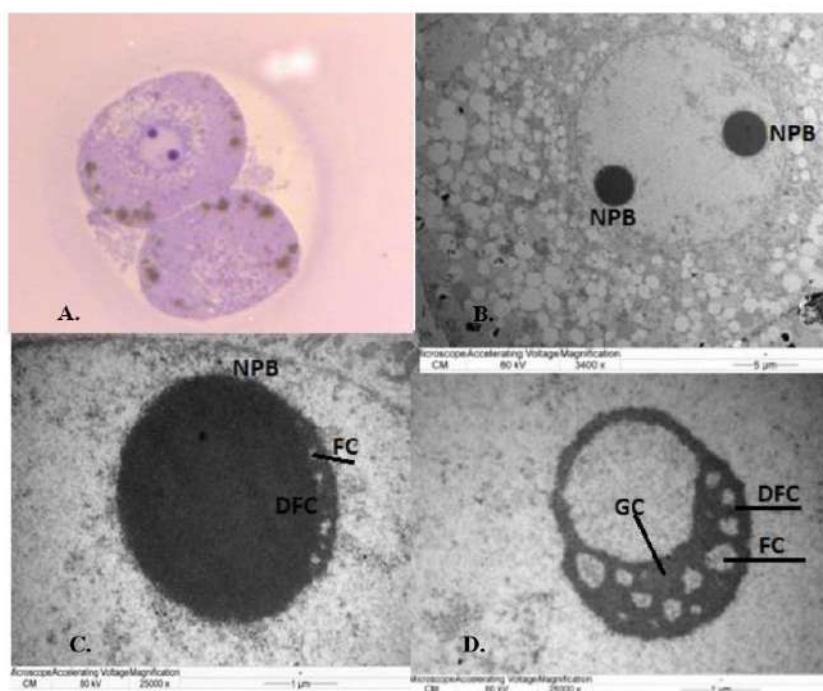
#### **4.7.6 Vplyv maturačného média na formovanie jadierok embryí**

S pozitívnou UBF detekciou súvisí zmena ultraštruktúry. Na stanovenie zmeny ultraštruktúry embryí ošipanej sme sa rozhodli využiť transmisnú elektrónovú mikroskopiu (TEM). TEM je výkonná technika, ktorá umožňuje vizualizáciu bunkových štruktúr s rozlíšením v nanometroch. V oblasti embryológie sa TEM ukázala ako kľúčový nástroj na skúmanie intracelulárneho poškodenia, distribúcie organel a ultraštruktúrnej analýzy embryí. Na vyhodnotenie TEM analýzy embryí je nevyhnutná starostlivá príprava vzorky. Proces začína odberom embryí a ich následnou fixáciou, ktorá zabezpečuje neporušenie bunkovej organizácie. Bežné fixatíva používané pri TEM zahŕňajú glutaraldehyd a paraformaldehyd. Tieto fixačné činidlá stabilizujú bunkové zložky a zabraňujú ich degradácii. Po fixácii sú embryá zvyčajne dodatočne fixované oxidom osmičelým na zvýšenie kontrastu a zlepšenie vizualizácie. Po fixácii sa embryá dehydratujú pomocou série alkoholových roztokov. Dehydratácia odstraňuje vodu zo vzoriek a pripravuje ich na zabudovanie do živicovej matrice. Zapustené vzorky sa potom narežú na ultratenké rezy pomocou ultramikrotómu. Tieto rezy, typicky hrubé okolo 50-100 nanometrov, sa zhromažďujú na medených mriežkach na ďalšiu analýzu (Halvaei, Khalili, Nottola, 2016; Xu *et al.*, 2021).

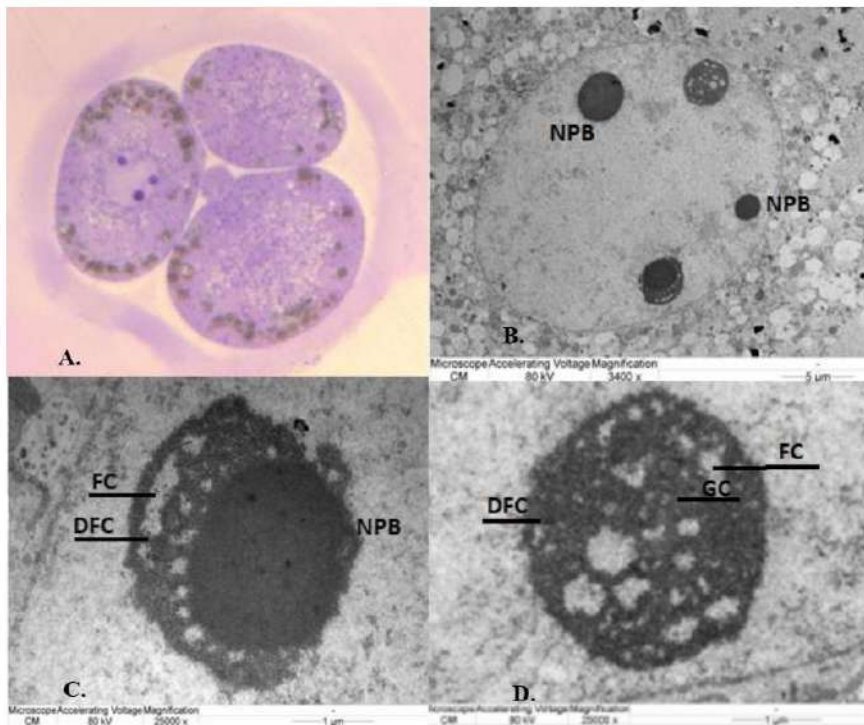
Pomocou elektrónovej mikroskopie sme dospeli k výsledkom, ktoré na rozdiel od imucytochemickej detekcie UBF potvrdili začínajúcu nukleolárnu aktivitu v oboch experimentálnych skupinách. Vo 4-bunkových embryách získaných maturáciou oocytov v DMEM médiu sme pozorovali vyšší stupeň cytoplazmatickej a nukleolárnej vakuolizácie. Na ultraštruktúrnej úrovni vykazovali jadrá rôzne štádiá tvorby jadierok.

V oboch experimentálnych skupinách sme pozorovali prítomnosť NPBs, ktoré predstavovali tmavé guľôčky husto zabaleného fibrilárneho materiálu, prítomnosť fibrilo-granulárnych jadierok, ktoré predstavovali semilunárne formácie FC, DFC a GC na povrchu NPBs. Taktiež sme v oboch

experimentálnych skupinách detegovali prítomnosť retikulárnych jadierok (Obr. 22,23). V porovnaní s Bjerregaard *et al.* (2004) a Deshkmund *et al.* (2012), ktorí porovnávali formovanie jadierka v *in vivo* a *in vitro* podmienkach v TCM-199 maturačnom médiu, možno povedať, že naše výsledky z oboch experimentálnych skupín korelujú s *in vivo* skupinou. Toto zistenie znamená, že v *in vitro* podmienkach možno využitím vhodného maturačného média priblížiť formovanie jadierka k *in vivo* podmienkam. Vzhľadom na podobné TEM výsledky a rozdielnu UBF detekciu oboch experimentálnych skupín predpokladáme, vo FLI maturačnom médiu dochádza k rýchlejšiemu a kvalitnejšiemu nástupu EGA, čo môže súvisieť s vyššou koncentráciou UBF vo FLI experimentálnej skupine.



Obrázok č. 22: 4-bunkové embryá ošípanej získané maturáciou v DMEM;  
 A. Nadhľad na dve blastoméry embrya B. Elektrónogram zobrazujúci detail jadra s NPBs C. Detailný záber NPBs s formujúcimi sa FC, DFC D. Detailný záber retikulárneho jadierka  
 (Zdroj: autori)



Obrázok č.23: 4-bunkové embryá ošípanej získané maturáciou v FLI; A. Nadhľad na tri blastoméry embrya B. Elektrónogram zobrazujúci detail jadra s NPBs a retikulárnym jadierkom C. Detailný záber NPBs s formujúcimi sa FC, DFC D. Detailný záber retikulárneho jadierka (Zdroj: autori)

#### 4.7.7 Vplyv maturačného média na transkriptomický profil embryí

Vzhľadom na výsledky predchádzajúcich experimentov podporujúcich hypotézu naznačujúcu, že zloženie média FLI hrá kľúčovú úlohu pri aktivácii embryonálneho genómu a zrýchľovaní produkcie embryí *in vitro* aj *in vivo*, je potrebné zanalyzovať transkriptomický profil a rozdiely na úrovni génovej expresie medzi DMEM a FLI embryami. Na identifikáciu transkriptomických profilov sme sa rozhodli použiť sekvenovanie RNA pomocou techník novej generácie (RNA-Seq). Tento prístup nám umožnil identifikovať kľúčové signálne dráhy, ktoré boli aktivované v jednotlivých experimentálnych skupinách.

V rámci tohto experimentu sme sa rozhodli analyzovať rozdiely medzi 2-, 4- a 8-bunkovými embryami získanými z oocytov maturovaných v DMEM a FLI maturačnom médiu. Celkovo sme v DMEM/FLI experimentálnych

skupinách detegovali viac ako 12000 transkriptov (Obr. 24). Následným porovnaním jednotlivých štádií sme dospeli k viacerým záverom.

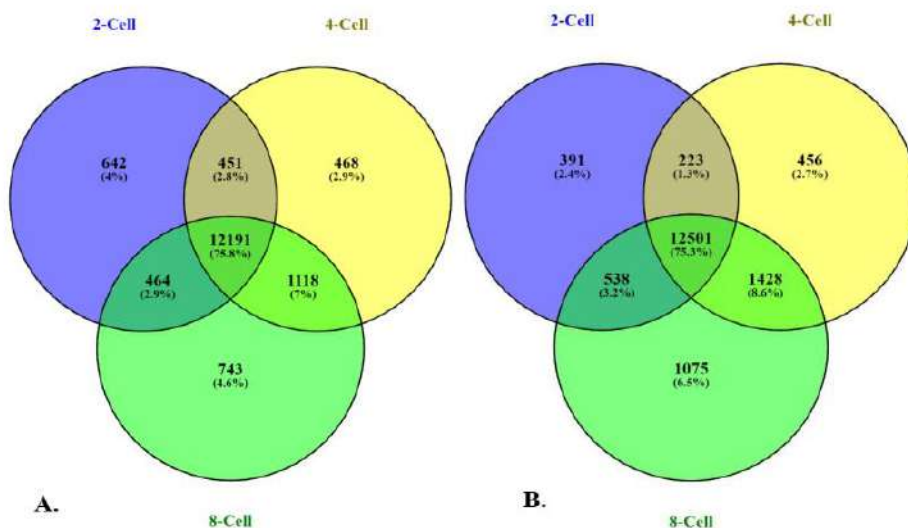
V 2-bunkovom štádiu v oboch experimentálnych skupinách došlo k prevahe transkriptov zapojených do katabolických procesov a hlavne do bunkového delenia. Tento výsledok je podľa Liu, Urbe, Clage (2012) a Ostrup *et al.* (2013) v súlade s konceptom materálne riadenej regulácie v rámci prvých bunkových delení embrya. Predpokladáme, že práve v 2-bunkových FLI embryách v porovnaní s DMEM skupinou dochádza zníženou aktivitou PLIN2 k štiepeniu triglycerolov na mastné kyseliny, čo môže súvisieť s upreguláciou ACOT6 a metabolickou podporou ranej embryogenézy (Sastre *et al.*, 2014).

Porovnaním 2-bunkového štádia so 4-bunkovým štádiom došlo k detekcii významných rozdielov v regulácii biologických procesov zameraných na transkripciu a s ňou súvisiacich procesov. V oboch experimentálnych skupinách sme sledovali signifikantne zvýšenú aktivitu v mRNA zapojenej do splicingu, metabolických procesoch a procesoch spracovania RNA. Možno povedať, že v tomto štádiu dochádza k nahradzovaniu a k prechodu z materálnych faktorov na vlastnú embryonálnu produkciu, ktorá sa v prípade FLI skupiny odráža v množstve transkriptov, metabolizme bielkovín a ich transporte. Tento fakt koreluje s výsledkami v *in vivo* podmienkach a rovnako aj s našimi výsledkami v rámci TEM, kde sme v oboch experimentálnych skupinách potvrdili prítomnosť retikulárnych jadriok.

V DMEM skupine sme v 8-bunkových embryách pozorovali aktiváciu biologických procesov súvisiacich s ubikvitináciou, metabolickými procesmi, elongáciou transkriptov a proteosyntézou. Avšak v 8-bunkových FLI embryách sme nesledovali žiadne zmeny v translácii a transkripcii, ale vo vaskulogenéze, regulácii bunkovej proliferácie a pozitívnej regulácii embryonálneho vývoja. Porovnaním 4- a 8-bunkových embryí jednotlivých experimentálnych skupín sme dospeli k záveru, že 4-bunkové FLI embryá sú svojou transkripčnou aktivitou podobné 8-bunkovým FLI embryám.

Pre potvrdenie progresivity 4-bunkových FLI embryí sme sa rozhodli porovnať túto skupinu so 4-bunkovými DMEM embryami. V jednotlivých experimentálnych skupinách sme zaznamenali signifikantné rozdiely v 6 rozdielne exprimovaných génoch. V rámci FLI embryí tieto gény prispievali k zvýšenej katabolickej funkcii, remodelácii chromatinu, povrchovej ochrane a správne mu vývoju embryí počas ranej embryogenézy. Porovnaním 4-bunkových FLI embryí a 8-bunkových DMEM embryí sme v konečnom výsledku dospeli k záveru, že vo 4-bunkových embryách (FLI) došlo k

prevahe transkriptov zodpovedných za transláciu, embryonálny vývoj a organizáciu cytoskeletonu. Tento fakt poukázal nato, že aj keď je translácia stále aktívna, tak embryonálne zmeny sú na vyššej úrovni ako vo vyššom štádiu pochádzajúceho z iného maturačného média. Predpokladáme, že tieto významné rozdiely súvisia práve s vplyvom maturačného média na oocyty, ktoré sa aktiváciou stávajú progresívnejšími a lepšie pripravenými na nasledujúcu embryogenézu, čo koreluje aj s TEM a imunocytochemickými výsledkami.



Obrázok č.24: Prehľad analyzovaných génov embryí ošípanej  
A. DMEM experimentálna skupina; B. FLI experimentálna skupina  
(Zdroj: Bartková, 2021)

## 5. Zmeny organel v procese IVP

V rámci charakterizácie maturácie oocytov sme analyzovali organelárne zmeny v rámci cytoplazmatického dozrievania. Rovnako ako v prípade maturácie oocytov je možné sledovať organelárne zmeny aj počas ranej embryogenézy. Počas IVP je dôležité a nevyhnutné pochopiť zmeny, ktoré sa počas tohto procesu vyskytujú na bunkovej úrovni. Jednou z oblastí záujmu sú zmeny v bunkových organelách embryí, keď sa prispôbujú *in vitro* kultivačnému prostrediu (Mao *et al.*, 2014; Reader *et al.*, 2017; Bastos *et al.*, 2022).

Zmeny sa najčastejšie detegujú na úrovni:

- Mitochondrií: zohrávajú kľúčovú úlohu v produkcii bunkovej energie prostredníctvom oxidačnej fosforylácie. Počas produkcie embryí *in vitro* môžu kultivačné podmienky ovplyvniť nie len ich funkciu, ale aj morfológiu. Štúdie ukázali, že metabolizmus embryí *in vitro* je odlišný od metabolizmu embryí *in vivo*. Hypotéza „tichého embrya“ naznačuje, že životaschopné embryá majú relatívne nízky metabolizmus, pravdepodobne v dôsledku zníženého energetického výdaja na opravu poškodenia genómu a proteómu. Tento znížený metabolizmus môže ovplyvniť mitochondriálnu aktivitu a viesť k zmenám mitochondriálnej morfológie a funkcie (Dumollard *et al.*, 2009).
- Endoplazmatického retikula: je zodpovedné za syntézu, skladanie a kontrolu kvality proteínov. Počas produkcie embryí *in vitro* prechádza ER významnými zmenami v dôsledku zmenených podmienok kultivácie. Štúdie ukázali, že kultivácia *in vitro* môže viesť k stresu ER, ku ktorému dochádza, keď je kapacita skladania ER prekonaná zvýšeným dopytom po syntéze proteínov (De Lima *et al.*, 2020). Tento ER stres môže viesť k akumulácii chybné poskladaných proteínov a aktivácii odpovede na rozložený proteín (UPR), čo môže potenciálne ovplyvniť ich životaschopnosť a vývojovú kompetenciu.
- Golgiho aparátu: je zodpovedný za modifikáciu a triedenie proteínov syntetizovaných v ER. Počas produkcie embryí *in vitro* boli pozorované zmeny v morfológii a funkcii Golgiho aparátu. Štúdie ukázali zmeny v štruktúre a distribúcii Golgiho aparátu v embryách produkovaných *in vitro* (Abdel, Adam, 2016). Tieto zmeny môžu ovplyvniť procesy modifikácie a triedenia proteínov, čo môže potenciálne ovplyvniť embryonálny vývoj.

- Jadra: obsahuje genetický materiál a je nevyhnutné pre správny embryonálny vývoj. Počas produkcie embryí *in vitro* sa pozorovali zmeny v štruktúre a funkcii jadra. Štúdie ukázali zmeny v organizácii jadra, štruktúre chromatinu a epigenetických modifikáciách v embryách produkovaných *in vitro*. Tieto zmeny môžu ovplyvniť vzory génovej expresie a vývojovú kompetenciu. Epigenetické modifikácie, ako je metylácia DNA a modifikácie histónov, hrajú kľúčovú úlohu pri regulácii génovej expresie počas embryonálneho vývoja. Podmienky kultivácie *in vitro* môžu ovplyvniť vznik a udržiavanie týchto epigenetických znakov, čo môže potenciálne viesť k zmeneným vzorcom génovej expresie a vývojovým abnormalitám (De Lima *et al.*, 2020).

## 5.1 Jadro

Jadro (*nucleus*) možno charakterizovať ako membránovú organelu nachádzajúcu sa v centrálnej časti embryí cicavcov. Hrá kľúčovú úlohu pri kontrole a regulácii rôznych bunkových procesov vrátane rastu, metabolizmu a reprodukcie. Jadro zložené z genetického materiálu a obklopené jadrovým obalom pôsobí ako riadiace centrum bunky, v ktorom je uložená DNA (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2004).

Jadro je najväčšou organelou živočíšnych buniek a dosahuje priemer až 6µm, čo znamená, že jadro zaberá cca 10% z celkového objemu bunky. Jadro je tvorené základnými štruktúrami ako (Obr. 26):

- jadrový obal: jedná sa o dvojvrstvovú membránovú štruktúru, ktorá obklopuje jadro. Pozostáva z vonkajšej a vnútornej membrány s úzkym priestorom medzi nimi známym ako perinukleárny priestor. Jadrový obal funguje ako bariéra, ktorá oddeľuje obsah jadra od cytoplazmy. Poskytuje tiež štrukturálnu podporu jadru a pomáha udržiavať jeho tvar. Jednou z najdôležitejších vlastností jadrového obalu je prítomnosť jadrových pórov. Ide o proteínové komplexy, ktoré pokrývajú obe vrstvy jadrového obalu a vytvárajú kanály pre molekulárny transport medzi jadrom a cytoplazmou. Jadrové póry umožňujú selektívny prechod molekúl, ako sú proteíny a RNA, do a von z jadra. Tento kontrolovaný pohyb je nevyhnutný pre zachovanie integrity a funkčnosti jadra. (Lodish *et al.*, 2004; Goldber *et al.*, 2008).
- jadrová lamina: jedná sa o organizovanú sieť medzil'ahľých vlákien poskytujúcich hlavne mechanickú podporu. Organizovaná sieť



vláken sa nachádza na vnútornej strane jadrového obalu a menej organizovaná sieť sa nachádza na cytosolickej strane jadrového obalu. Jadrová vrstva je zložená z laminovaných proteínov (emerín, nesprín), ktoré svojou väzbou na cytoskelet poskytujú štrukturálnu podporu (Goldman *et al.*, 2002; Broers, Ramaekers, 2004).

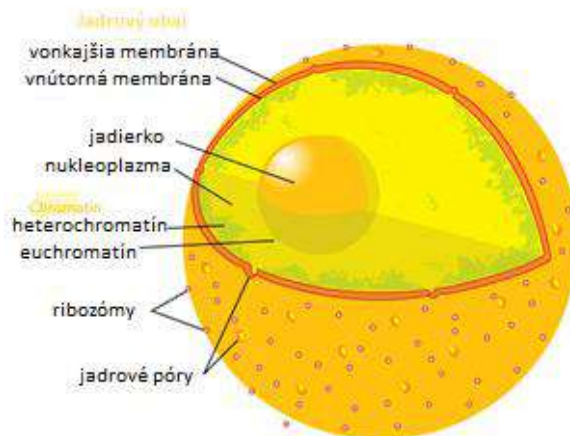
- chromozómy: chromozómy sú vláknité štruktúry zložené z DNA a proteínov. Nesú genetickú informáciu potrebnú pre vývoj a fungovanie organizmu. Počas delenia buniek sa chromozómy kondenzujú a stávajú sa viditeľnými. Každý chromozóm pozostáva z dvoch identických sesterských chromatíd spojených centromérou (Grummt, 2007). Jadro nukleozómu je tvorené komplexom ôsmich histónov (H2A, H2B, H3, H4). Pozitívny náboj histónového oktaméru spôsobuje pevnú väzbu negatívne nabitej DNA. Spojenie nukleozómov spôsobuje ovinutie lineárnych úsekov DNA, ktoré sa viažu na histón H1. Chromatín má dva základné typy a to:

- euchromatín: jedná sa o menej kompaktnú DNA, ktorá obsahuje bunkou exprimované gény.

- heterochromatín: jedná sa o kompaktnejšiu formu DNA, ktorá obsahuje gény zriedkavej transkripcie (Grigoryev, Bulynko, Popova, 2006; Mihajlovic, FitzHarris, 2018).

- jadierko: jedná sa o najväčšiu nemembránovú suborganelu jadra. Je odlišná oblasť v jadre, ktorá hrá kľúčovú úlohu v biogenéze ribozómov. Primárne sa podieľa na syntéze a zostavovaní rRNA a produkcii ribozomálnych podjednotiek. Jadierko sa skladá z troch hlavných zložiek: fibrilárne centrá, husté fibrilárne zložky a granulózne zložky (Hernandez-Verdun, 2006; Pederson, 2011).

Primárnou funkciou jadra je kontrola bunkového rastu a množenia. Dosahuje to reguláciou génovej expresie, iniciáciou bunkovej reprodukcie a uchovávaním genetického materiálu potrebného na tieto úlohy. Jadro funguje ako úložisko DNA, ktoré obsahuje dedičnú informáciu kódujúcu vlastnosti organizmu. Zabezpečuje presný prenos genetického materiálu z jednej generácie na druhú počas delenia buniek. Jadro taktiež zohráva kľúčovú úlohu pri syntéze bielkovín. Nukleoplazma poskytuje vhodné prostredie pre zostavenie ribozómov, ktoré sú zodpovedné za syntézu proteínov (Pederson, 2011).



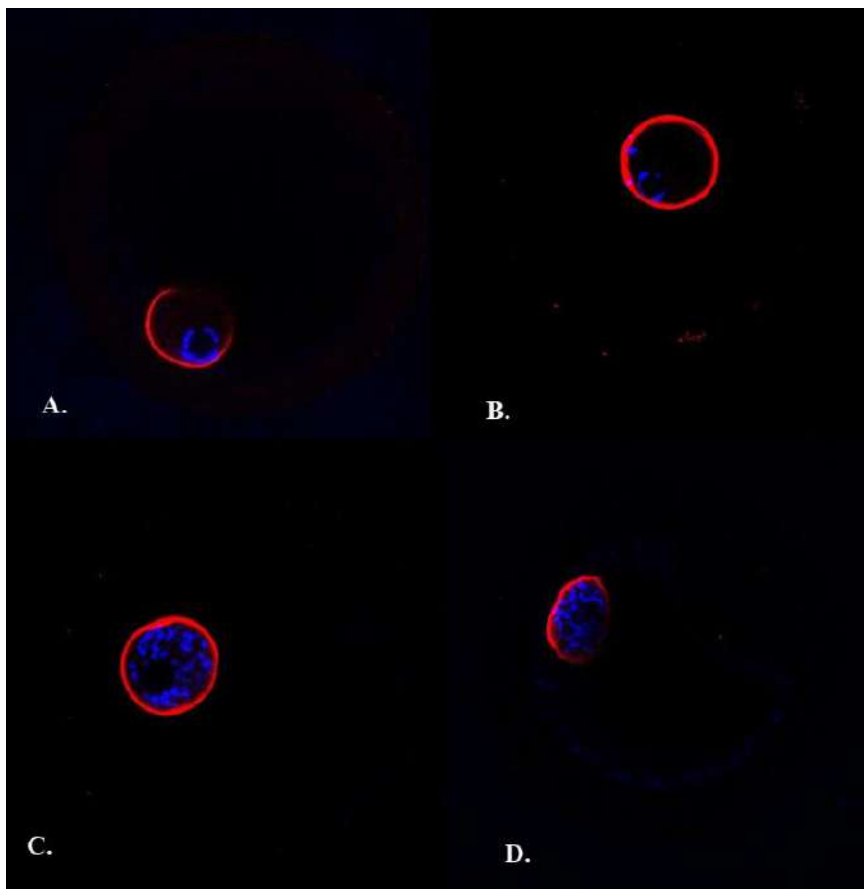
Obrázok č.26: Stavba jadra

(Zdroj: Upravené z <https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleolus>)

### 5.1.1 Jadro oocytov

Jadro oocytov sa nazýva aj zárodočný vezikul či vaček (germinal vesicle, GV). K obnoveniu jadrového dozrievania dochádza po ovulácii na základe signálov z ooplazmy, konkrétne aktivite maturation promoting factor (MPF). Jadrové dozrievanie je charakterizované prasknutím zárodočného váčku (germinal vesicle breakdown, GVBD). Tomuto štádiu však predchádza viacero štádií a to (Obr. 27):

- GV<sub>0</sub>: jedná sa o štádium, kedy je chromatín rozptýlený po celom jadre, jadierko je dobre viditeľné a jadrová membrána je stále neporušená.
- GV<sub>I</sub>: v tomto štádiu je jadro uložené periférne a jadrová membrána je dobre viditeľná. Jadierko je taktiež viditeľné a okolo neho možno pozorovať chromatín v tvare podkovy.
- GV<sub>II</sub>: v tomto štádiu sledujeme rovnakú morfológiu ako v GV<sub>I</sub>, avšak dochádza k zvlneniu jadrovej membrány, pričom sa začínajú vyskytovať chromocentrá.
- GV<sub>III</sub>: v tomto štádiu dochádza k strate jadierka a dochádza ku kondenzácii chromozómov.
- GV<sub>IV</sub>: v tomto štádiu sledujeme menej viditeľnú jadrovú membránu, ktorá vytvára dlhé výbežky. Chromozómy sú dobre viditeľné (Sun *et al.*, 2004; Laurinčík *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2009).



Obrázok č. 27: Jednotlivé štádia jadrového dozrievania oocytov ošípanej  
A.  $GV_I$ ; B.  $GV_{II}$ ; C.  $GV_{III}$ ; D.  $GV_{IV}$ ; *červenou farbou* je označená jadrová  
membrána, *modrou farbou* je vyznačená distribúcia chromatínu  
(Zdroj: Bartková, 2021)

## 5.2 Jadierko

Prvý popis jadierka bol publikovaný v knihe Fontana v roku 1781 a v roku 1838 bola táto organela popísaná Schleidenom u rastlín. V ďalších prácach sa popis tejto štruktúry sústreďuje na oocyty a nervové bunky. Termín jadierko po prvýkrát použil Valentin v roku 1836 (Wachtler, Stahl, 1993). Predstavuje viditeľnú, nemembránovú štruktúru jadra všetkých eukaryotických buniek. Jadierko je materálneho pôvodu a je lokalizované v blízkosti jadrovej membrány. Predstavuje miesto produkcie ribozomálnej RNA a zostavy ribozomálnej podjednotky (Fulka *et al.*, 2012).

Jadierko je primárne zodpovedné za syntézu a spracovanie ribozomálnej RNA ako zložky ribozómov. V jadierku sa gény rRNA nachádzajú v špecifických chromozomálnych oblastiach známych ako oblasť organizácie jadierka (NOR). NOR slúžia ako miesta transkripcie rRNA a obsahujú opakujúce sa klastre ribozomálnej DNA (rDNA). Za vznik jadierka v blízkosti NOR je zodpovedná mitotická inaktivácia génov kódujúcich vznik 5.8 S, 18S, 28S rRNA. Každá oblasť NORs je tvorená krátkymi sekvenciami rDNA, t.j. transkripčnými jednotkami. Tieto jednotky sú veľmi rozsiahle, hlavne u cicavcov. V prípade ľudí sa ich veľkosť pohybuje okolo 43 kb, u myši cca 45kb (McStay, 2016). Lokalizácia miesta vzniku jadierok je veľmi významná a umožňuje bunkám rýchlu produkciu veľkého množstva ribozómov (Kobayashi, 2008; Kobayashi, 2014).

Jadierko je miesto syntézy rRNA, čo priamo súvisí s tvorbou ribozomálnych podjednotiek v procese proteosyntézy. Taktiež sa podieľa na určení štádia aktivity resp. diferenciácie partikulárnych buniek. To znamená, že v bunkách s vyšším obsahom jadierok resp. s veľkými jadierkami (nezrelé, rastúce bunky) dochádza k intenzívnejšej proteosyntéze. Avšak existuje viacero štúdií, ktoré potvrdzujú účasť jadierka aj v iných procesoch ako napr. pri regulácii bunkovej proliferácie v súvislosti s nádorovým bujnením, starnutím či stresovej odpovedi (Olson, 2004; Raška *et al.*, 2006).

Štruktúrne je jadierko delené do niekoľkých morfológicky odlišných oddielov. Tie zodpovedajú za transkripciu rDNA, syntézu preribozomálnych podjednotiek, úpravu primárnych transkriptov. Najčastejšie sa spomínajú tri oddiely a to:

- Fibrilárne centrá (fibrillar centers-FCs): jedná sa o dynamické štruktúry, ktorých veľkosť a množstvo závisí od bunkovej aktivity. V FCs jednotkách je uložená RNA polymeráza I (RNA Pol I). Vyznačujú sa hustou sieťou fibríl a podieľajú sa na počiatkových

krokoch biogenézy ribozómov. FC slúži ako miesto transkripcie pre gény ribozomálnej DNA. Tieto gény sú organizované do špecifických chromozomálnych oblastí známych ako NOR, ktoré sú zodpovedné za produkciu prekursorových molekúl ribozomálnej RNA (rRNA). Štúdie ukázali, že FC sa podieľa na získavaní rôznych faktorov potrebných na transkripciu a spracovanie rRNA a taktiež sa podieľa aj na regulácii expresie rRNA, čím zabezpečuje správnu kontrolu syntézy ribozómov (Schwarzacher, Wachtler, 1993; Dubois, Boisvert, 2016).

- Denzné fibrilárne komponenty (dense fibrillar components-DFCs): obklopujú FCs a ich počet závisí na počte FCs. DFC sa vyznačuje menej hustou fibrilárnou štruktúrou a podieľa sa na spracovaní a modifikácii molekúl rRNA. V rámci DFC sú rôzne enzýmy a faktory zodpovedné za štiepenie a modifikáciu prekursorových molekúl rRNA, čo v konečnom dôsledku vytvára zrelú rRNA. DFC tiež hrá kľúčovú úlohu pri zostavovaní ribozomálnych podjednotiek. Funguje ako miesto pre počiatočné zostavenie ribozomálnych proteínov, čo je nevyhnutný krok pre tvorbu funkčných ribozómov, ktoré sú zodpovedné za syntézu proteínov v bunkách (Lafontaine *et al.*, 2020).

- Granulárne komponenty (granular components-GCs): predstavuje zhuk granulárnych komponentov nachádzajúcich sa v okrajových častiach jadierka. GC je primárne zodpovedný za zostavenie ribozomálnych podjednotiek do podoby zrelých ribozómov. Pôsobí ako miesto akumulácie ribozomálnych proteínov a nasledovnej inkorporácie do rastúcich ribozomálnych podjednotiek. Okrem toho GC tiež hrá úlohu v mechanizmoch kontroly kvality embrya/oocyty. Zabezpečuje, aby sa do cytoplazmy uvoľnili len správne zostavené ribozomálne podjednotky, čo napomáha udržiavať integritu a funkčnosť ribozómov, čím zabezpečuje presnú syntézu bielkovín (Raška, 2003; Olson, 2004; Hyttel *et al.*, 2007; Kresoja-Rakic, Santoro, 2019).

V rámci protesyntézy dochádza k zapojeniu transkripčných jednotiek. Transkripčné jednotky možno rozdeliť do dvoch častí. V prvej časti sú lokalizované primárne transkripty známe ako pre-rRNA. Tieto sekvencie sú 13-14kb prekurozory, za ktorými nasleduje neprepisovaný medzigénový medzerník (intergenic spacer-IGS) s dĺžkou 30kb. Sekvencie pre-rRNA podliehajú rozsiahlemu spracovaniu na vytvorenie zrelých rRNA. Toto spracovanie zahŕňa odstránenie spacerových sekvencií a pridanie chemických modifikácií na zabezpečenie správnej funkčnosti. Pre-rRNA transkript sa štiepi na tri hlavné časti: 5,8S, 18S a 28S rRNA. Tieto časti sú potom spojené

s ribozomálnymi proteínmi, aby vytvorili malé a veľké ribozómové podjednotky. 5,8S rRNA sa nachádza medzi 18S a 28S rRNA a hrá kľúčovú úlohu pri stabilizácii štruktúry ribozómu (McStay, Grummt, 2008; Kobayashi, 2014).

Zahájeniu transkripcie predchádza vytvorenie preiniciačného komplexu (preinitiation complex- PIC). PIC je multiproteínový komplex, ktorý pozostáva z rôznych zložiek, vrátane RNA polymerázy I (Pol I), transkripčných a selektívnych faktorov (SL1, UBF) a iných regulačných proteínov. Tieto zložky zabezpečujú správnu iniciáciu a reguláciu transkripcie rRNA. PIC sa zhromažďuje na špecifických miestach, na génoch rRNA, známych ako promótorové oblasti. Tieto oblasti obsahujú sekvencie DNA, ktoré interagujú s transkripčnými faktormi a inými regulačnými proteínmi (Gupta, Santoro, 2020).

### **5.2.1 Dynamika jadierka**

Počas oogenézy prechádza jadro oocytov, tiež známe ako GV, jedinečnými modifikáciami chromatinu. Jadierko, prominentná štruktúra, hrá v týchto zmenách kľúčovú úlohu. Štúdie ukázali, že jadierko prechádza dynamickými modifikáciami, vrátane zmien jeho veľkosti, tvaru a zloženia. Tieto zmeny sú úzko spojené s transkripčnou aktivitou a vzormi génovej expresie potrebnými na dozrievanie oocytov.

Jadierko v štádiu GV vykazuje špecifickú konfiguráciu chromatinu, ktorá podlieha modifikáciám počas oogenézy a folikulogenézy. Reakciu na hormonálne zmeny dochádza k syntéze zásobných zložiek, organel a ribozómov, čo vedie k výraznému zväčšeniu priemeru oocytov (Cisterna, Biggigera, 2010). V počiatočných štádiách oogenézy a folikulogenézy je možné vidieť iba zrnité časti jadierka. Keď sa však vytvoria primárne folikuly, vytvorí sa jadierko so zmesou vlákien a granúl, ktoré sa stáva transkripčne aktívnym až do dosiahnutia terciárneho štádia.

Dosiahnutím maximálnej oocytárnej veľkosti sa rastová fáza zastaví a nastávajú v jadierku zmeny. V priebehu profázy dochádza k rýchlemu zvýšeniu cyklínu B1 a Cdk1. Výsledkom je fosforylácia rDNA, SL1 a transkripčného terminátora faktora 1 (TTF1). Novovytvorené prepisy sú dokončené a zostávajú spojené s DFC. To naznačuje, že počas fosforylácie sa jadierko rozloží do podoby fibrilárnej sféry (FS) resp. nucleolus like body (NLB), ktorému už chýba syntetická aktivita a obsah DNA (Biosvert *et al.*, 2007).

V tomto štádiu je možné rozdeliť oocyty na základe prítomného jadierka na :

- NSN (nonsurrounded nucleoli): Tieto oocyty sú transkripčne aktívne a obsahujú aktívnu RNA polymerázu I. V tomto štádiu je jadro štrukturálne rozdelené na tri kompartmenty. Predpokladá sa, že oocyty typu NSN sú menej vyvinuté v porovnaní s typom SN, čo naznačuje, že sú v skoršom vývojovom štádiu (Susor *et al.*, 2016; Shishova *et al.*, 2015).
- SN (surrounded nucleoli): Tento typ oocytov sa pozoruje počas neskorších štádií oogenézy, keď sa aktivita RNA polymerázy I stratí. Jadierko sa transformuje na kompaktnú hmotu známu ako NLB alebo niektorými autormi označovanú ako FS (fibrillar sphere). NLB nemajú špecifické štrukturálne delenia a pozostávajú výlučne z hustého fibrilárneho materiálu (Zuccoti *et al.*, 2002).

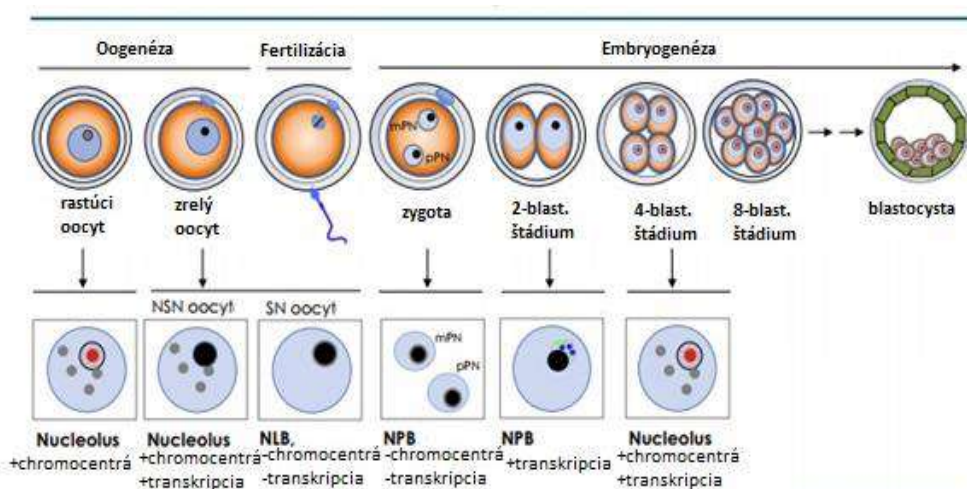
Počas meiotického delenia dochádza k separácii genetického materiálu, čo vedie k disperzii NLB v cytoplazme. Časť nukleárneho materiálu sa stratí, keď dôjde k extrúzii pólového telieska. Po oplodnení sa z NLB vytvorí štruktúra nazývaná NPB (nucleoli precursor body). Zmena v terminológii odráža, že NPB slúžia ako základ pre plne funkčné embryonálne jadierka, ktoré sa tvoria počas reiniciácie transkripcie RNA polymerázy I, keď prebieha aktivácia embryonálneho genómu.

NPB sú kompaktné štruktúry hrajú významnú úlohu pri tvorbe jadierok počas embryonálneho vývoja. V 2-bunkovom štádiu prispievajú k vytvoreniu fibrilárno-granulárneho jadierka s transkripčnou aktivitou. Spočiatku sa na povrchu NPB tvoria fibrilárne centrá (FC), ktoré sa potom vyvinú do denzných fibrilárnych komponentov (DFC) obsahujúcich ribozomálnu RNA. DFC sa nakoniec rozšíria a transformujú na granulované komponenty (GC). V štádiu moruly NPB miznú a sú nahradené jadierkami somatického typu (Olson, Dundr, Szébeni, 2000; Hyttel, 2011; Kyogoku, Kitajima, Miyano, 2014).

Tieto dynamické zmeny jadierka počas embryonálneho vývoja majú významné dôsledky pre celkový vývojový proces. Jadierko hrá kľúčovú úlohu pri regulácii bunkového rastu, proliferácie a diferenciácie, pričom všetky sú nevyhnutné pre embryonálny vývoj. Modifikácie, ktoré sa vyskytujú v jadierku počas oogenézy, prispievajú k vytvoreniu vzorcov géovej expresie potrebných pre správny vývoj embrya. Okrem toho sa jadierko podieľa na epigenetickej regulácii, pretože počas oogenézy prechádza zmenami v metylácii DNA a modifikáciami histónov. Tieto epigenetické modifikácie môžu ovplyvniť vzory géovej expresie a bunkovú diferenciáciu vo

vyvíjajúcom sa embryu. Preto pochopenie dynamických zmien jadierka počas oogenézy poskytuje cenné poznatky o molekulárnych mechanizmoch, ktoré sú základom skorého embryonálneho vývoja (Obr. 28) (Kresoja Rakic, Santoro, 2019; Eleftheriou *et al.*, 2022).

Podobnosť zloženia NLB a NPB je stále otázná a aj napriek rozsiahlym výskumom sa zatiaľ nepodarilo popísať kompletne molekulárne zloženie tejto štruktúry. Aktuálne poznatky však potvrdzujú, že NPBs sú materálneho pôvodu a ich prítomnosť je pre skorý embryonálny vývoj nevyhnutná (Ogushi *et al.*, 2008; Kyogoku *et al.*, 2014).



Obrázok č. 28: Nukleologéza  
(Zdroj: Upravené z Fulka *et al.*, 2012)

### 5.3 Jadierkové proteíny

Jadierkové proteíny zohrávajú zásadnú úlohu v bunkových procesoch, najmä pri transkripcii rRNA, spracovaní a zostavovaní ribozómov. Proteíny, ktoré budeme popisovať možno rozdeliť do dvoch kategórií: proteíny ako RNA polymeráza I, Upstream binding factor (UBF) a topoizomeráza I, ktoré sú viditeľné počas transkripcie (proteíny tzv. transkripčnej mašinérie), zatiaľ čo fibrilarín, nukleolín a nukleofozmín sú lokalizované v priebehu procesingu (tzv. procesingové proteíny).

Predpokladom pre transkripciu rRNA génov je rozpletenie závitnice DNA, ktorú zabezpečuje topoizomeráza I (Muller *et al.*, 1985; Laurinčík *et al.*, 2000) a bola lokalizovaná v FC a DFC (Wachtler, Stahl, 1993). V embryách ošípanej



sa tento proteín spája s budúcim jadierkom v priebehu včasného štvrtého embryonálneho cyklu (Hyttel *et al.*, 2000 a, b).

Transkripcia rRNA génov prebieha za pomoci RNA polymerázy I (veľkosť je 500-600kD), ktorá sa taktiež nachádza v FC a DFC (Wachtler, Stahl, 1993; Laurinčík *et al.*, 2000; Hyttel *et al.*, 2000 b). Ak má tento enzým fungovať musia sa naviazať i ďalšie proteíny tzv. RNA polymeráza I associated factors (PAFs) medzi ktoré patria transkripčný iniciačný faktor (TIF-IC), faktor C, TIF-IA, TIF-IC a PAF53. Vytvoreniu iniciačného komplexu dopomáha PAF53, ktorý prepojí RNA polymerázu I s UBF. Z myších embryí boli izolované tri druhy PAF faktorov a to PAF53, PAF51 a PAF49 (Hanada *et al.*, 1996). Všetky tieto tri druhy PAF sú tesne spojené s RNA polymerázou I. Bolo zistené, že ak sa zníži syntéza rRNA zníži sa i koncentrácia PAF53 (Hannan *et al.*, 2000). Pri štúdiách *in vitro* sa ukázala spojitosť medzi PAF53 a UBF avšak mechanizmus akým PAF53 sa zapája do regulácie syntézy rRNA nebol objasnený.

UBF (upstream binding factor) je jeden z faktorov potrebných pre naviazanie RNA polymerázy I na DNA (Schnapp *et al.*, 1994). Je to fosfoproteín, zložený z dvoch polypeptidov a to UBF1 a UBF2, ktorých veľkosť je druhovo špecifická (O'Mahony, Rothblum, 1991). Napr. u ľudí a hlodavcov UBF pozostáva z UBF1 o veľkosti 97kD a z UBF2 o veľkosti 94kD. Dominantnou štruktúrou UBF sú boxy vysoko mobilných skupín (HMG - high mobility group), ktorá je veľmi podobná boxom HMG na chromozómoch (HMG1 a HMG2) (Jantzen *et al.*, 1990). HMG boxy sú zvyčajne tvorené z 80 aminokyselín a UBF obsahuje 4-6 takýchto boxov (Jantzen *et al.*, 1990). Mechanizmus akým UBF aktivuje transkripciu rRNA génov obsahuje: formovanie homo- resp. hetero- dimérov (Jantzen *et al.*, 1990), naviazanie sa UBF na CPE a UPE rRNA génov, ako aj interakciu medzi UBF a SL1. UBF sa naviaže na DNA, pričom zohne úsek DNA asi o veľkosti 190bp, čím môžu interagovať dva SL1 faktory a vzniká tak iniciačný transkripčný komplex (Jordan *et al.*, 1996). UBF bol sekvenovaný u ľudí (Jantzen *et al.*, 1990) a následne u myší (Hisatake *et al.*, 1991), ako aj u králika (O'Mahony, Rothblum, 1991).

RNA polymeráza III – má tri typy promótoru – jeden z nich je aj promótor pre 5S rRNA. Tento obsahuje proti smeru transkripcie pred štartovacím nukleotidom vonkajšiu regulačnú časť promótoru a za štartovacím nukleotidom vnútornú regulačnú časť pozostávajúcu z dvoch boxov. Promótor RNA polymerázy III, teda jeho transkripčná jednotka končí sekvenciou TTTT. Takéto zakončenie nie je u transkripčných jednotiek riadených promótorami

RNA polymerázy I a II. Transkripcia RNA polymerázy III začína naviazaním transkripčného faktora TFIIIA na jeden z vnútorných boxov. Na druhý vnútorný regulačný box sa viaže ďalší transkripčný faktor TFIIIC a TFIIIB. Tento komplex je potom následne rozoznávaný RNA polymerázou III a za pomoci využívania voľných ribonukleozid trifosfátov môže začať transkripcia 5S rRNA (Rosypal, 1997).

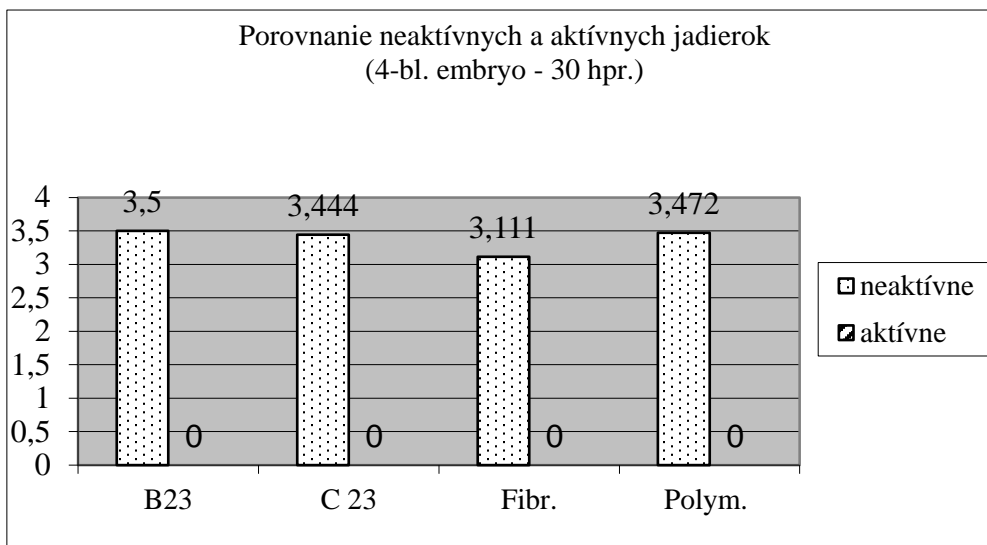
Fibrilarín (veľkosť 34 kD) bol po prvýkrát objavený u pacienta so sclerodermou a bol lokalizovaný v FC a v DFC. Fibrilarín je malý jadierkový nukleoproteín (snoRNP) spájajúci sa s U3 malou jadierkovou RNA (snoRNA) a s U8 a s U13 snoRNA (Baserga *et al.*, 1991). Je zapojený do všetkých dôležitých post-transkripčných úpravách v biogenéze ribozómov ako je rRNA modifikácia a vytváranie ribozómov. Fibrilarín sa spája s niektorými malými jadierkovými proteínmi RNA vedúcim k štiepeniu pre-rRNA (U3, U8, U14, U22) resp. vedúce k metylácii rRNA (U14, U18, U24-U63). SnoRNA sú zapojené do procesu spracovania primárnych transkriptov rRNA (Tollervey, 1996).

Nukleolín (C23, 92-100kD) je fosforilovaný proteín nachádzajúci sa vo veľkom počte v jadierku počas ribozomálnej aktivity. Obsahuje RNA viažuce miesta, pričom je identický s DNA helikázou IV, ktorá obtáča RNA-RNA, DNA-DNA a DNA-RNA duplexi (Teteja *et al.*, 1995). Proteín je spájaný s primárnymi transkriptmi rRNA v častiach kódujúcich 18S a 28S. Nukleolín hrá dôležitú úlohu v promotore pre sekundárnu štruktúru 18S a 28S, ktorá je nevyhnutná pre výstavbu pre-ribozomálnych častí, aj keď on sám nie je súčasťou finálneho produktu (Hernandez-Verdun, 1991). Nukleofozmín (B23, 38kD) môže byť spojený s inými proteínmi tak ako nukleolín a jadrový proteín p120. Nukleofozmín je schopný taktiež viazať RNA a DNA (Wang *et al.*, 1994), je ribonukleo aktívny (Herrera *et al.*, 1995), a spája sa s mnohými vyzretými jadrovými pre-ribozomálnymi RNP. Nukleolín ako aj nukleofozmín hrajú dôležitú úlohu pri výstavbe pre-ribozomálnych častí. Nukleolín bol lokalizovaný v DFC a GC (Biggiogera *et al.*, 2001).

Pri porovnaní imunocytochemických značení neaktívnych jadriek jednotlivých proteínov 30 hpr. (hpr. – hodiny po rozdelení blastomér; kde sme zaznamenali značenie voči B23, C23, fibrilarínu, RNA polymeráze I) graf 7, v 4-blastomérových embryách ošípanej získaných *in vivo*, sme nezistili štatisticky významný rozdiel ( $P= 0,429$ ) za pomoci Kruskal-Wallis testu. Pri porovnaní značení neaktívnych jadriek 40 hpr. (hodín po rozdelení blastomér) za pomoci Dunn testu sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi proteínmi (graf 8): fibrilarín a C23, fibrilarín a B23, fibrilarín a RNA

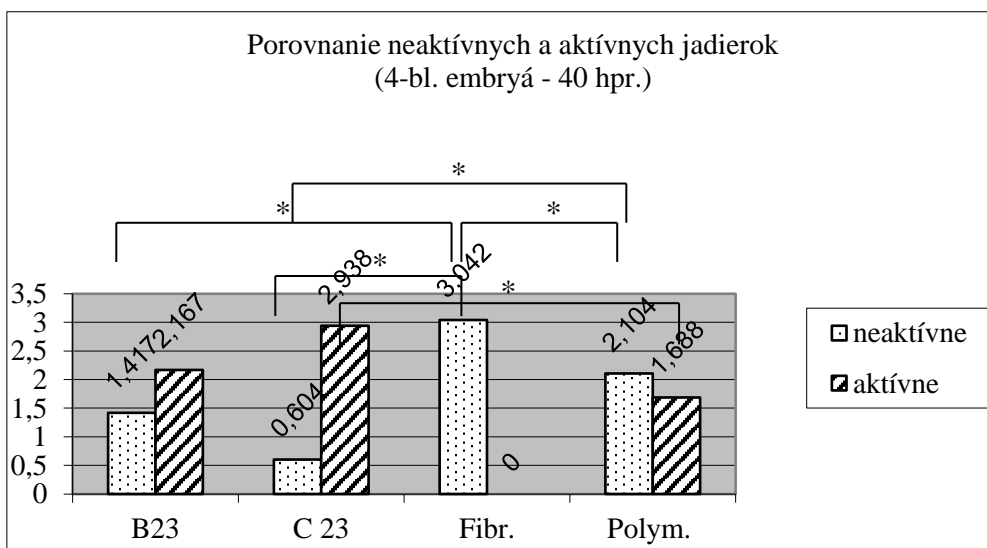
polymeráza I, RNA polymeráza I a C23 ( $P < 0,05$ ). Štatisticky významný rozdiel sme nezistili medzi skupinami RNA polymeráza I a B23, B23 a C23. Pri porovnaní aktívnych jadriok 40 hpr. sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi C23 a RNA polymerázou I ( $P < 0,05$ ; graf 8). Pri štatistickom vyhodnocovaní značení jadriok 50 hpr. sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi skupinami neaktívnych jadriok: fibrilarín a B23, fibrilarín a RNA polymeráza I, fibrilarín a C23 ( $P < 0,05$ ; Dunn test). Pri porovnaní značení jadriok 50 hpr. sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi C23 a fibrilarínom, RNA polymerázou I a fibrilarínom, B23 a fibrilarínom. Pri značení aktívnych jadriok 50 hpr. sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi C23 a fibrilarínom, RNA polymerázou I a fibrilarín, B23 a fibrilarín ( $P < 0,05$ ; Dunn test; graf 9). Porovnaním značení neaktívnych jadriok pri 8-bunkových raných embryách sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi skupinami: fibrilarín a B23, fibrilarín a C23, fibrilarín a UBF, fibrilarín a RNA polymeráza I, fibrilarín a topoizomeráza I, topoizomeráza I a B23, topoizomeráza I a UBF, topoizomeráza I a RNA polymeráza I ( $P < 0,05$ ) (graf 11). Pri aktívnych jadriokach bol štatisticky významný rozdiel medzi značeniami: C23 a fibrilarín, C23 a topoizomeráza I, RNA polymeráza I a fibrilarín, RNA polymeráza I a topoizomeráza I, UBF a fibrilarín, UBF a topoizomeráza I, B23 a fibrilarín, B23 a topoizomeráza I ( $P < 0,05$ ) (graf 12). Pri porovnaní značení neaktívnych jadriok 8-bunkových neskorých embryí sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi skupinami fibrilarín a B23, fibrilarín a RNA polymeráza I, fibrilarín a C23, fibrilarín a UBF ( $P < 0,05$ ) (graf 14). Porovnaním značení aktívnych jadriok v 8-bunkových neskorých embryách sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi: C23 a fibrilarín, C23 a topoizomeráza I, C23 a B23, RNA polymeráza I a fibrilarín, UBF a fibrilarín, topoizomeráza I a fibrilarín ( $P < 0,05$ ) (graf 15).

Pomocou koeficientu korelácie sme zistili vysokú priamu lineárnu štatistickú závislosť medzi nasledovnými proteínmi v značení v aktívnych jadriokach: C23 a B23, B23 a RNA polymeráza I, C23 a RNA polymeráza I, UBF a topoizomeráza I. V značení neaktívnych jadriok sme zistili vysokú priamu lineárnu štatistickú závislosť medzi: B23 a C23, B23 a RNA polymeráza I, fibrilarín a RNA polymeráza I, UBF a topoizomeráza I. Pri ostatných proteínoch, či už ide o značenie v aktívnych alebo neaktívnych jadriokach sme zistili veľmi slabú lineárnu závislosť.



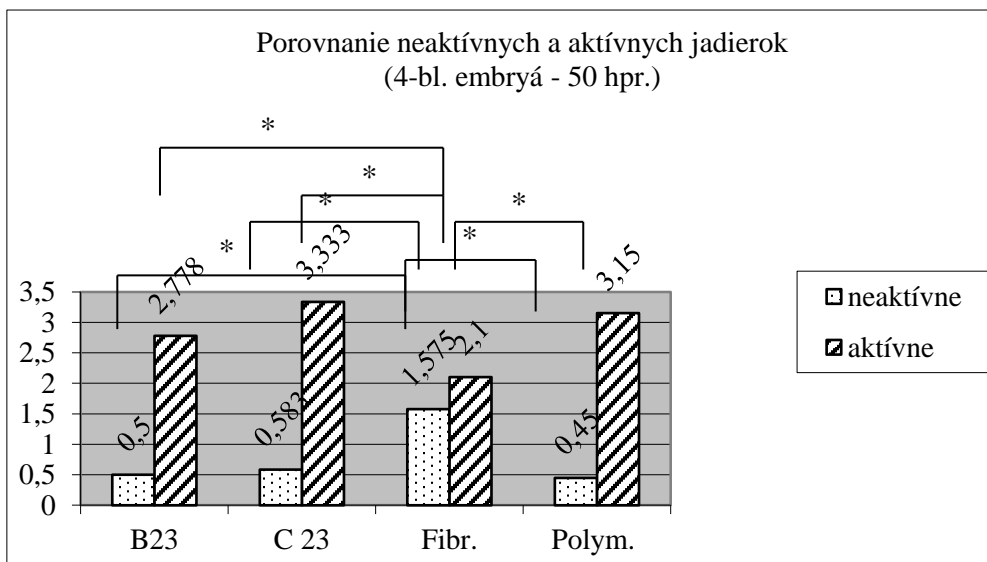
Graf č. 7: Porovnanie neaktívnych a aktívnych jadierok 4-blast. embryí (30 hpr.)

Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I



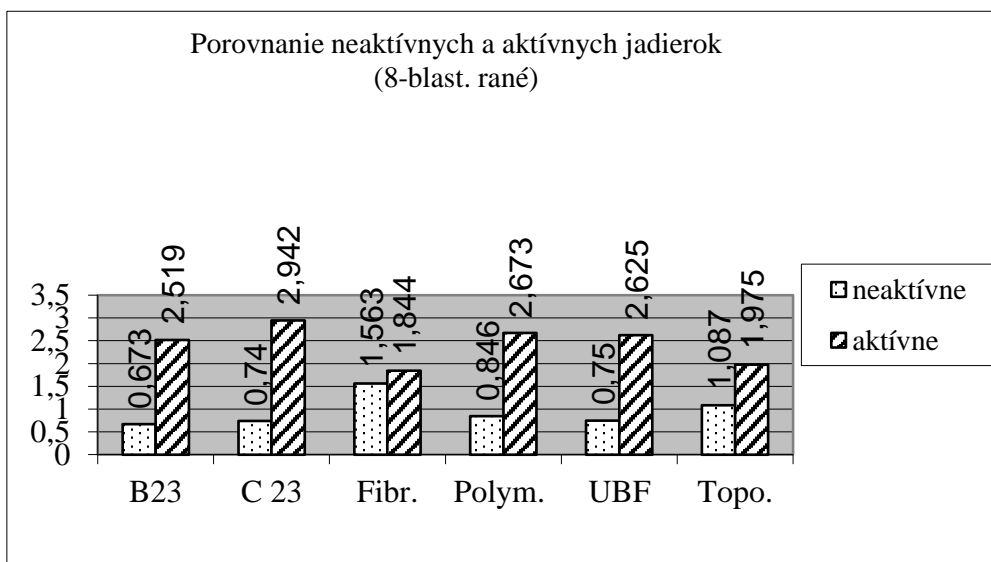
Graf č.8: Porovnanie neaktívnych a aktívnych jadierok 4-blast. embryí (40 hpr.);\*  $P < 0,05$

Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I



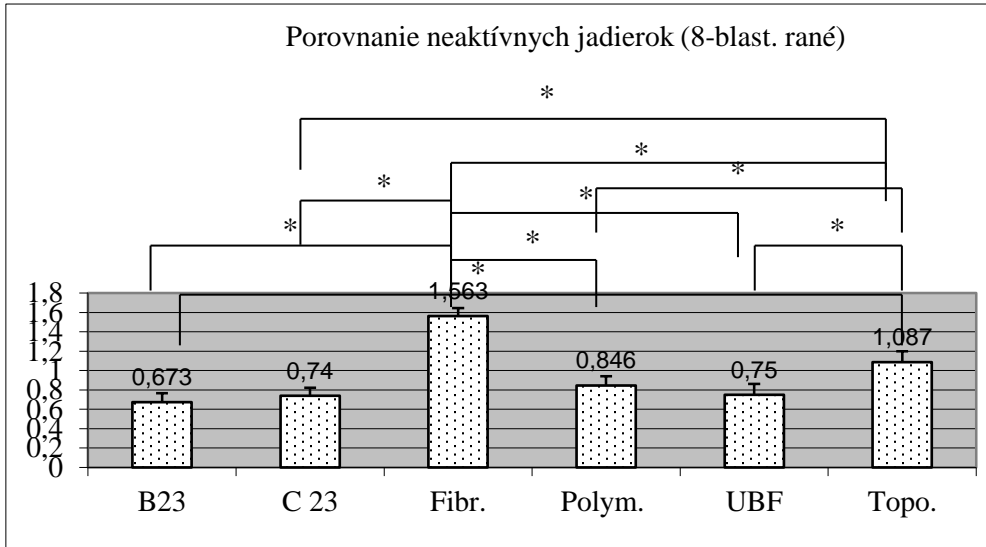
Graf č. 9: Porovnanie neaktívnych a aktívnych jadierok 4-blast. embryí (50 hpr.); \*  $P < 0,05$

Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I

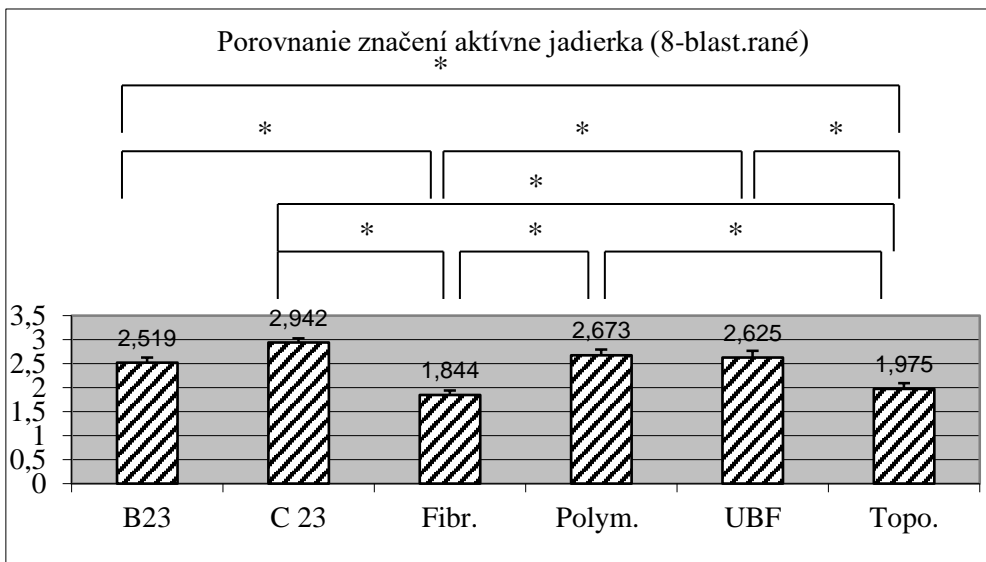


Graf č.10: Porovnanie neaktívnych a aktívnych jadierok (8-blast. rané); \*  $P < 0,05$

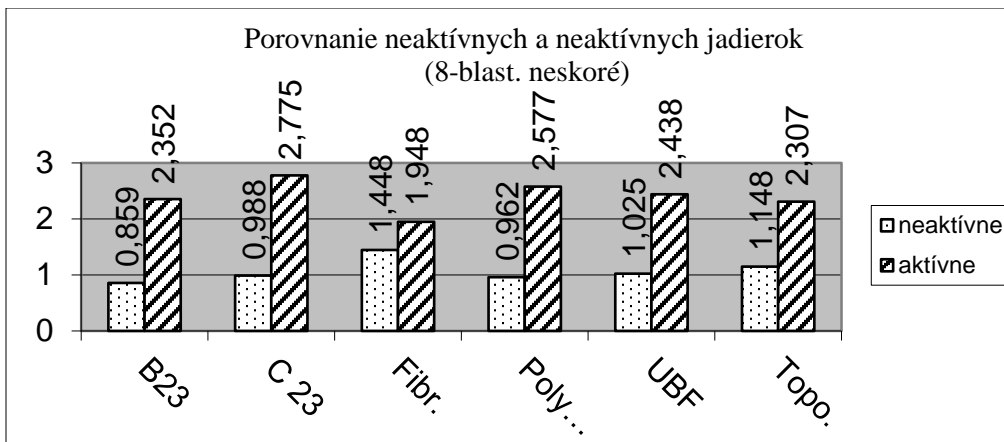
Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I



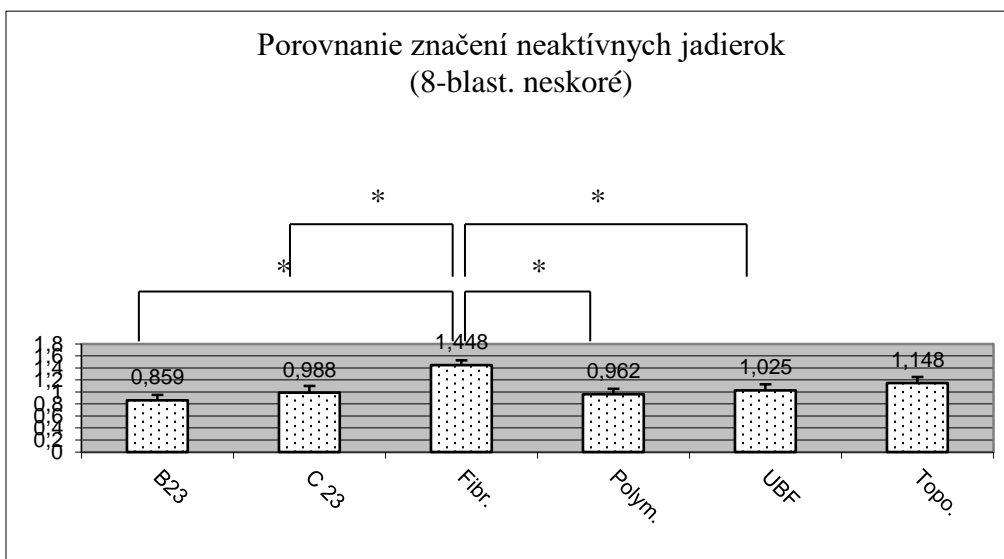
Graf č. 11: Porovnanie neaktívnych jadierok (8-blast. rané); \*  $P < 0,05$   
 Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I



Graf č. 12: Porovnanie značení aktívne jadierka (8-blast.rané); \*  $P < 0,05$   
 Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I

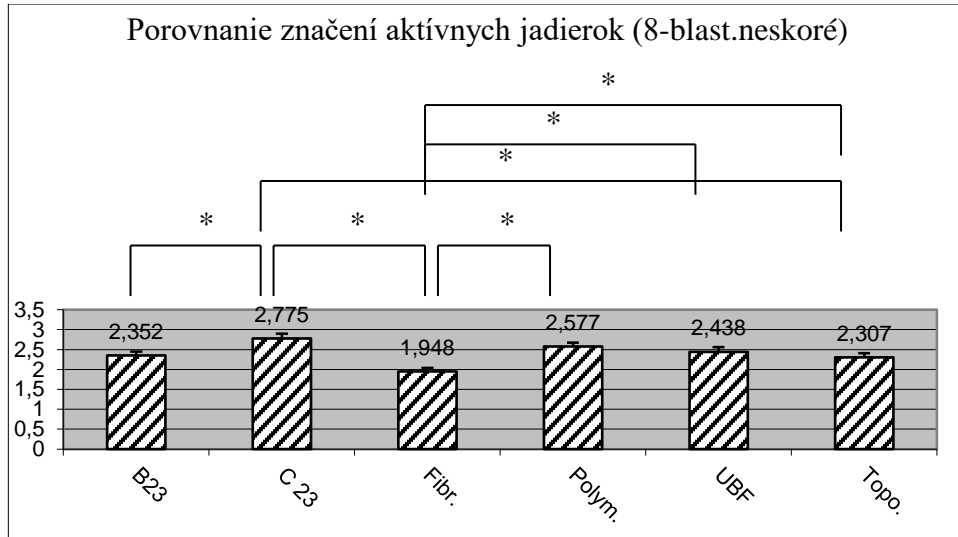


Graf č. 13: Porovnanie neaktívnych a aktívnych jadierok (8-blast. neskoré) Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I



Graf č. 14: Porovnanie značení neaktívnych jadierok (8-blast. neskoré); \*  $P < 0,05$

Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I



Graf č. 15: Porovnanie značení aktívnych jadierok (8-blast.neskoré); \*  $P < 0,05$

Čísla v jednotlivých skupinách predstavujú priemer značení na jednu blastoméru. B23- nukleofosmín, C23 nukleolín, fibr. – fibrilarín, Polym. – RNA polymeráza I, UBF- upstream binding factor, Topo. – topoizomeráza I



## 5.4 Stanovenie relatívneho obsahu proteínov

Stanovenie relatívnej koncentrácie proteínov jadierok bolo v našom prípade možné prostredníctvom enukleolácie. E nukleolácia ako technika bola prvýkrát opísaná Fulkom *et al.* v roku 2003. Jedná sa o unikátnu metódu, ktorá umožňuje odstránenie jadierok z oocytov bez toho, aby došlo k poškodeniu samotného oocytu. Proces zahŕňa mikromanipuláciu pomocou špecializovaných nástrojov a zariadení. Jadierko sa opatrne extrahuje z oocytu pomocou presných mikromanipulačných pohybov, čím sa zabezpečí minimálne narušenie okolitých bunkových štruktúr.

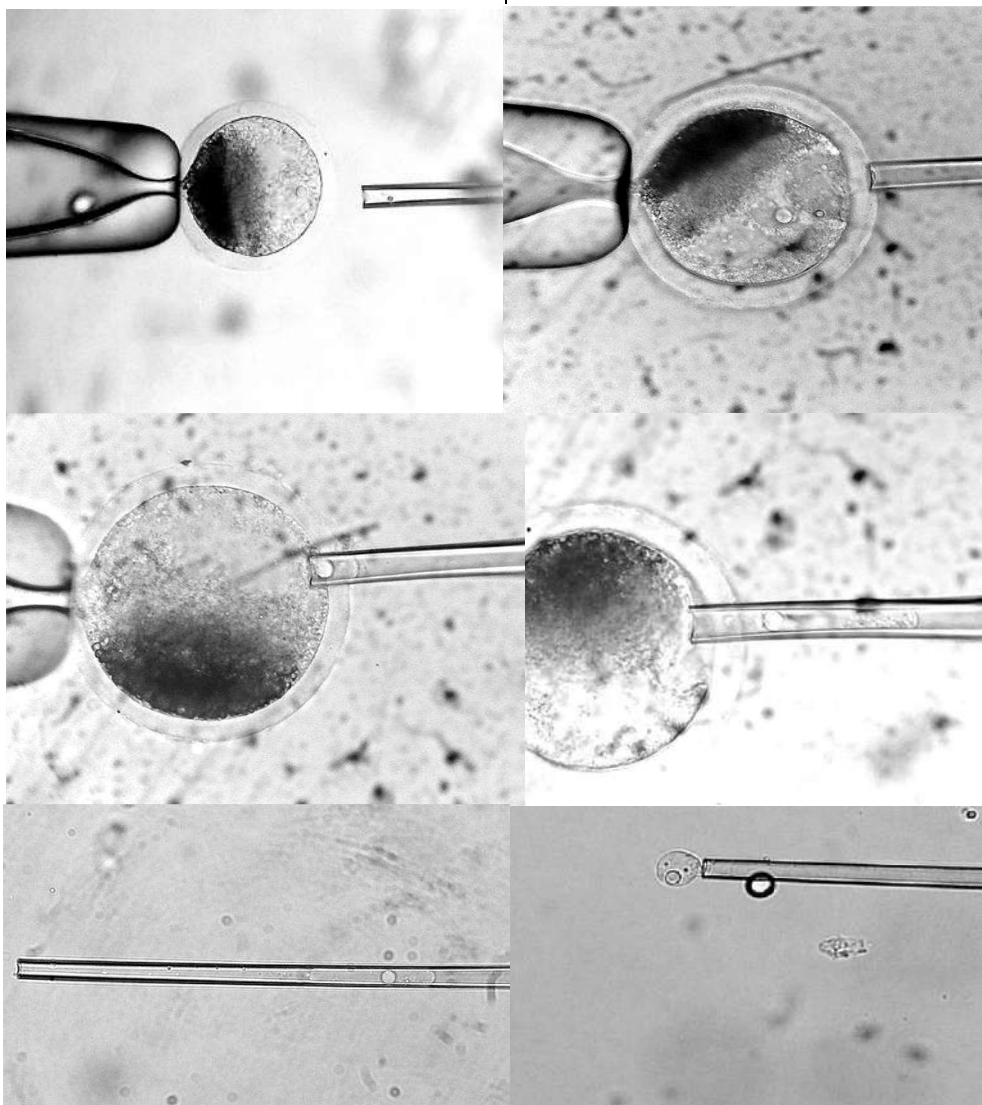
Pred samotným zahájením enukleolácie je potrebné zakúpenie komerčných manipulačných ihliel a holderov resp. ich manuálna príprava. V našich laboratórnych podmienkach sme si pripravili ihly a holder z borosilikátového skla pomocou prístroja Flaming/Brown micropipete puller MODEL P-97 (Sutter instrument, USA). Parametre potrebné na prípravu jednotlivých manipulačných ihliel a holderov sa líšia od nastavenia prístroja a mikroskopu s manipulačnou technikou. V našom prípade boli ihly upravené na priemer 10  $\mu\text{m}$  pod uhlom  $15^\circ$  a holdery na priemer 20  $\mu\text{m}$  pod uhlom  $15^\circ$  (Obr.18).

Enukleolácia oocytov ošípanej prebiehala zo stočených oocytov, čím sa zviditeľnili jadierka. Celý proces prebiehal v sterilnej miske zloženej z manipulačného média a oplachovacieho média (PVA) a PVP. Izolácia jadierok bola podmienená vznikom jednotlivých experimentálnych skupín na základe vitálnej selekcie pomocou LB farbenia. Po izolácii dostatočného množstva jadierok sme pomocou metódy značenia proteínov koloidným zlatom stanovili relatívne množstvá proteínov v jednotlivých experimentálnych skupinách. Na základe výsledkov sme dospeli k záveru, že pomocou LB vitálnej selekcie, vieme izolovať jadierka s rôznym obsahom proteínov (Tab.8, Obr. 29).

V rámci LB+ oocytov (menej kvalitné) sme detegovali signifikantne nižší obsah proteínov a to 0,71 ng na jeden NLB. V oocytoch z kontrolnej skupiny (bez farbenia LB) sme detegovali 0,97 ng na NLB a v LB- oocytoch (kvalitné oocytov), 10ng na NLB. Murín *et al.* (2019) rovnakou metódou stanovili obsah proteínov jednej NLB oocytu ošípanej na 0,86-0,96ng bez vplyvu BCB selekcie. Fulka *et al.*(2012) detegovali 1,6ng proteínov na jednu NLB myšacieho oocytu, kde možno predpokladať vznik rozdielov na základe druhej špecifity.

Tabuľka č.8: Relatívny obsah proteínov na jedno NLB

Experimentálna skupina	Obsah proteínov (ng/NLB)
Kontrolná skupina	0,976
LB+	0,71
LB-	1,106



Obrázok č. 29 E nukleolácia oocytu

**A.** prichytenie oocytu holderom **B.** penetrácia ihly cez zona pellucida bez poškodenia cytoplazmatickej membrány **C.** nasávanie jadierka s nukleoloplastom **D.** nasávanie jadierka **E. F.** odobraté jadierko s nukleoloplastom

(Zdroj: Bartková, 2021)

## Záver

Embryogenéza, tiež známa ako embryonálny vývoj, je komplexný proces, ktorý zahŕňa tvorbu a rast embryí z jednobunkovej zygoty do plne vyvinutého organizmu. Je to rozhodujúca etapa v životnom cykle všetkých mnohobunkových organizmov vrátane človeka. V 21. storočí významné prelomy vo vývojovej biológii spôsobili revolúciu v našom chápaní molekulárnych a bunkových mechanizmov, ktorými sa riadi embryogenéza. Tieto pokroky nielen zlepšili naše znalosti o ranej embryogenéze cicavcov, ale poskytli aj pohľad na ďalšie biologické otázky, ako sú kmeňové bunky, regenerácia, rakovina a tvorba tkanív a orgánov.

V posledných rokoch výskumníci urobili pozoruhodný pokrok v definovaní a popise zložitých molekulárnych a bunkových mechanizmov, ktoré sú základom embryogenézy. Stavajúc na objavoch 20. storočia vedci používajú najmodernejšie techniky molekulárnej biológie na odhalenie zložitých signálnych dráh a génových regulačných sietí, ktoré organizujú embryonálny vývoj. Tieto pokroky umožňujú aj nám realizovať výskum a pokračovať v identifikácii kľúčových génov a proteínov zapojené do rôznych štádií embryogenézy.

Rýchly pokrok vo výskume embryogenézy možno pripísať aj technologickému pokroku v rôznych oblastiach. Techniky ako sekvenovanie novej generácie, sekvenovanie jednobunkovej RNA a nástroje na úpravu genómu ako CRISPR-Cas9 spôsobili revolúciu v štúdiu embryonálneho vývoja. Tieto nástroje aj v našom výskume umožnili analyzovať vzorce génovej expzie a poskytli nám bezprecedentný pohľad na dynamické zmeny vyskytujúce sa počas embryogenézy.

Pri pohľade do budúcnosti je pokrok vo výskume embryogenézy obrovským prísľubom pre rôzne oblasti. Poznatky získané štúdiom embryonálneho vývoja je možné aplikovať v regeneratívnej medicíne, kde je cieľom opraviť alebo nahradiť poškodené tkanivá a orgány. Pochopením procesov podieľajúcich sa na embryogenéze sa môžeme podieľať na vývine stratégie na vyvolanie regenerácie tkaniva u dospelých, čo môže spôsobiť revolúciu v liečbe degeneratívnych chorôb a zranení. Okrem toho poznatky získané z výskumu embryogenézy môžu tiež prispieť k nášmu pochopeniu vývojových porúch a samotného pôrodu.

## Conclusion

Embryogenesis, also known as embryonic development, is a complex process that involves the formation and growth of embryos from a one-cell zygote to a fully developed organism. It is a crucial stage in the life cycle of all multicellular organisms, including humans. In the 21st century, major breakthroughs in developmental biology have revolutionized our understanding of the molecular and cellular mechanisms governing embryogenesis. These advances have not only improved our understanding of early mammalian embryogenesis but have also provided insight into other biological questions such as stem cells, regeneration, cancer, and tissue and organ formation.

In recent years, researchers have made remarkable progress in defining and describing the complex molecular and cellular mechanisms underlying embryogenesis. Building on the discoveries of the 20th century, scientists are using state-of-the-art molecular biology techniques to unravel the complex signalling pathways and gene regulatory networks that orchestrate embryonic development. These advances also allow us to carry out research and continue to identify key genes and proteins involved in the various stages of embryogenesis.

The rapid progress in embryogenesis research can also be attributed to technological advances in various fields. Techniques such as next-generation sequencing, single-cell RNA sequencing, and genome-editing tools such as CRISPR-Cas9 have revolutionized the study of embryonic development. In our research, these tools also enabled the analysis of gene expression patterns and provided us with an unprecedented insight into the dynamic changes occurring during embryogenesis.

Looking ahead, advances in embryogenesis research hold great promise for various fields. Knowledge gained from the study of embryonic development can be applied in regenerative medicine, where the goal is to repair or replace damaged tissues and organs. By understanding the processes involved in embryogenesis, we can contribute to the development of strategies to induce tissue regeneration in adults, which may revolutionize the treatment of degenerative diseases and injuries. In addition, knowledge gained from embryogenesis research can also contribute to our understanding of developmental disorders and childbirth itself.

## Zoznam použitej literatúry

Aarabi, M., Balakier, H., Bashar, S. *et al.* (2014). Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *The FASEB Journal*, 28(10), 4434-4440.

Abdul-Rahman, F. (2023). Mechanisms of division of labor in mammalian tissue. *Cell Reports*, 42(5).

Aghaz, F., Vaisi-Raygani, A., Khazaei, M. *et al.* (2021). Enhanced cryoprotective effect of melatonin and resveratrol by coencapsulation: improved *in vitro* development of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes. *Biopreservation and biobanking*, 19(3), 184-193.

Albal, M. S., Silvestri, G., Kiazim, L. G. *et al.* (2022). Supplementation of porcine *in vitro* maturation medium with FGF2, LIF, and IGF1 enhances cytoplasmic maturation in prepubertal gilts oocytes and improves embryo quality. *Zygote*, 30(6), 801-808.

Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J. *et al.* (2004). Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *International journal of developmental biology*, 45(7), 797-809.

Alm, H., Brüssow, K. P., Torner, H. *et al.* (2006). Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reproductive Toxicology*, 22(1), 44-50.

Almonacid, M., Terret, M. E., Verlhac, M. H. (2018, October). Control of nucleus positioning in mouse oocytes. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 82, pp. 34-40). Academic Press.

Alvarez, G. M., Villanueva, S., Geller *et al.* (2018). Piezo-ICSI as alternative tool to improve oocyte activation in *in vitro* matured bovine oocytes model. *Fertility and Sterility*, 110(4), e217.

Arias, M. E., Vargas, T., Gallardo, V. *et al.* (2022). Simple and efficient chemically defined *In vitro* maturation and embryo culture system for bovine embryos. *Animals*, 12(21), 3057.

Au, C. E., Hermo, L., Byrne E. *et al.* (2015). Expression, sorting, and segregation of Golgi proteins during germ cell differentiation in the testis. *Molecular biology of the cell*, 26(22), 4015-4032.

Bailey, J. L. (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Systems biology in reproductive medicine*, 56(5), 334-348.

Baron, M. H. (2005). Early patterning of the mouse embryo: implications for hematopoietic commitment and differentiation. *Experimental hematology*, 33(9), 1015-1020.

Bartková, A. (2021). Porcine embryos production in *in vitro* condition. Dissertation thesis. Constantine the Philosopher University in Nitra. 2021, 131p.

Bartková, A. *et al.* (2020). Characterization of porcine oocytes stained with Lissamine Green B and their developmental potential *in vitro*. In *Animal Reproduction*, 2020, vol. 17, no.4.

Belli, M., Shimasaki, S. (2018). Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. *Vitamins and hormones*, 107, 317-348.

Bennabi, I., Terret, M. E., Verlhac, M. H. (2016). Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *Journal of Cell Biology*, 215(5), 611-619.

Besson, A., Dowdy, S. F., Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*, 14(2), 159-169.

Bockstaele, L., Coulonval, K., Kookan, H. *et al.* (2006). Regulation of CDK4. *Cell Division*, 1(1), 1-16.

Boni, R. (2012). Ovum pick-up in cattle—a 25-yr retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 9(3), 362-369.

Breton-Larrivière, M., Elder, E., McGraw, S. (2019). DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. *Animal reproduction*, 16, 465-474.

Briggs, J. A., Weinreb, C., Wagner, D. E. *et al.* (2018). The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution. *Science*, 360(6392), eaar5780.

Brinster, R. L. (1974). Embryo development. *Journal of animal science*, 38(5), 1003-1012.

Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M. *et al.* (2005). Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine*, 26, 301-316.

Caldon, C. E., Sergio, C. M., Schütte, J. *et al.* (2009). Estrogen regulation of cyclin E2 requires cyclin D1 but not c-Myc. *Molecular and cellular biology*, 29(17), 4623-4639.

Cao, Z., Sui, L., Li, Y. *et al.* (2012). Effects of chemically defined medium on early development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and cloning. *Zygote (Cambridge, England)*, 20(3), 229–236.

Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K. *et al.* (2000). Embryo implantation. *Developmental biology*, 223(2), 217-237.

Cecconi, S., Ciccarelli, C., Barberi, M. *et al.* (2004). Granulosa cell-oocyte interactions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 115, S19-S22.

Collin, J., Lako, M. (2011). Concise review: Putting a finger on stem cell biology: Zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells. *Stem cells*, 29(7), 1021-1033.

Combelles, C. M. H., Cekleniak, N. A., Racowsky, C. *et al.* (2002). Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Human Reproduction*, 17(4), 1006-1016.

Combelles, C. M., Racowsky, C. (2005). Assessment and optimization of oocyte quality during assisted reproductive technology treatment. In *Seminars in reproductive medicine*, 23(03), 277-284

Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M. *et al.* (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 356(1-2), 65-73.

Coticchio, G., Dal Canto, M., Mignini Renzini, M. *et al.* (2015). Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human reproduction update*, 21(4), 427-454.

Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L. *et al.* (2004). What criteria for the definition of oocyte quality?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034(1), 132-144.

Cran, D. G., Cheng, W. T. K. (1985). Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete research*, 11(3), 311-319.

Da Silva-Buttkus, P., Jayasooriya, G. S., Mora, J. M. *et al.* (2008). Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *Journal of cell science*, 121(23), 3890-3900.

de Ávila, A. C. F. C. M., Da Silveira, J. C. (2020). Role of extracellular vesicles during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 56-64.

de Nooij, J. C., Graber, K. H., & Hariharan, I. K. (2000). Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo is regulated by cyclin E. *Mechanisms of development*, 97(1-2), 73-83.

De Sousa, P. A., Dobrinsky, J. R., Zhu, J. *et al.* (2002). Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biology of reproduction*, 66(3), 642-650.

Diaz, F. J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of cell science*, 120(8), 1330-1340.

Ding, J., Moor, R.M., Foxcroft, G.R.(1992): Effect of protein synthesis on maturation , sperm penetration and pronucleus development in porcine oocyte. *Mol. Reprod. Develop*, 33, 59-66.

Ding, Z., Duan, H., Ge, W. *et al.* (2022). Regulation of progesterone during follicular development by FSH and LH in sheep. *Animal reproduction*, 19(2), e20220027.

Do, L. T. K., Luu, V. V., Morita, Y. *et al.* (2015). Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reproductive Biology*, 15(2), 86–93.

Dorey, K., Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 137(22), 3731.

Druhy ryhovania [online]. (2023). [cit. 12.8.2023]. Dostupné z: <<https://www.chegg.com/>>

Dubois, M. L., Boisvert, F. M. (2016). The Nucleolus: Structure and Function. *The Functional Nucleus*, 29–49.

Dumollard, R., Carroll, J., Duchen, M. R. *et al.* (2009). Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 3, pp. 346-353). Academic Press.

Eleftheriou, K., Peter, A., Fedorenko, I. *et al.* (2022). A transition phase in late mouse oogenesis impacts DNA methylation of the early embryo. *Communications Biology*, 5(1), 1047.

Embryogenéza [online]. (2023). [cit. 10.6.2023]. Dostupné z: <<https://www.mechanobio.info/development>>

Escoffier, J., Lee, H. C., Yassine, S. *et al.* (2016). Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Human molecular genetics*, 25(5), 878-891.

Fan, H.-Y., Sun, Q.-Y. (2019). Oocyte Meiotic Maturation. V The Ovary (s. 181–203). Elsevier.

Fan, Z., Li, W., Lee, S. R. *et al.* (2014). Efficient gene targeting in golden Syrian hamsters by the CRISPR/Cas9 system. *PloS one*, 9(10), e109755.

Feitosa, W. B., Lopes, E., Visintin, J. A. *et al.* (2020). Endoplasmic reticulum distribution during bovine oocyte activation is regulated by protein



kinase C via actin filaments. *Journal of Cellular Physiology*, 235(7-8), 5823-5834.

Ferrer-Buitrago, M., Bonte, D., De Sutter, P. *et al.* (2018). Single Ca<sup>2+</sup> transients vs oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits. *Reproduction*, 155(2), R105-R119.

Feyen, D. A., McKeithan, W. L., Bruyneel, A. A. *et al.* (2020). Metabolic maturation media improve physiological function of human iPSC-derived cardiomyocytes. *Cell reports*, 32(3).

Field, S. L., Dasgupta, T., Cummings, M. *et al.* (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular reproduction and Development*, 81(4), 284-314.

Fissore, R. A., Kurokawa, M., Knott, J., *et al.* (2002). Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction-Cambridge*, 124(6), 745-754.

Flesch, F. M., Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197-235.

Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal reproduction science*, 78(3-4), 135-163.

Fulka, J. JR., Moor, R. M., Loi, P. *et al.* (2003). Enucleation of porcine oocytes. In *Theriogenology*, 2003, vol. 59, 1879-1885.

Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K. *et al.* (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction*, 15(2), 395-401.

Gilchrist, R. B., Lane, M., Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update*, 14(2), 159-177.

Goetz, J. G., Nabi, I. R. (2006). Interaction of the smooth endoplasmic reticulum and mitochondria. *Biochemical Society Transactions*, 34(3), 370-373.

Goldberg, M. W., Fiserova, J., Huttenlauch, I. *et al.* (2008). A new model for nuclear lamina organization. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1339-1343.

Goovaerts, I. G. F., Leroy, J. L. M. R., Jorssen, E. P. A. *et al.* (2010). Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*, 74(9), 1509-1520.

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (Vol. 27). Cabi.

Govan, A. D., Black, W. P. (1975). Ovarian morphology in oligomenorrhea. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 5(6), 317–325.

Greer Card, D. A., Hebbar, P. B., Li, L. *et al.* (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 28(20), 6426-6438.

Grive, K. J., Freiman, R. N. (2015). The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*, 142(15), 2554-2563.

Gruber, I., Klein, M. (2011). Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist?. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 12(2), 110–117.

Guo, J., Shi, L., Gong, X. *et al.* (2016). Oocyte-dependent activation of MTOR in cumulus cells controls the development and survival of cumulus–oocyte complexes. *Journal of Cell Science*, 129(16), 3091-3103.

Guo, X., Yi, H., Li, T. C. *et al.* (2021). Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human embryo implantation: clinical implications. *Biomolecules*, 11(2), 253.

Gupta, S., Santoro, R. (2020). Regulation and roles of the nucleolus in embryonic stem cells: from ribosome biogenesis to genome organization. *Stem Cell Reports*, 15(6), 1206-1219.

Halvaei, I., Khalili, M. A., Nottola, S. A. (2016). A novel method for transmission electron microscopy study of cytoplasmic fragments from preimplantation human embryos. *Microscopy research and technique*, 79(6), 459–462.

Hammoud, I., Molina-Gomes, D., Albert, M. *et al.* (2010). Are zona pellucida laser drilling and polar body biopsy safe for *in vitro* matured oocytes?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27, 423-427.

Hao, Y., Tang, S., Yuan, Y. *et al.* (2019). Roles of FGF8 subfamily in embryogenesis and oral-maxillofacial diseases. *International Journal of Oncology*, 54(3), 797-806.

Hasley, A., Chavez, S., Danilchik, M. *et al.* (2017). Vertebrate embryonic cleavage pattern determination. *Vertebrate Development: Maternal to Zygotic Control*, 117-171.

Hassouna, T., Seeberger, K. L., Salama, B. *et al.* (2018). Functional maturation and *in vitro* differentiation of neonatal porcine islet grafts. *Transplantation*, 102(10), e413-e423.

He, M., Zhang, T., Yang, Y. *et al.* (2021). Mechanisms of oocyte maturation and related epigenetic regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 654028.

Hermo, L., Pelletier, R.-M., Cyr, D. G. *et al.* (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, 73(4), 241–278.

Hirshfield A. N. (1985). Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. *Biology of reproduction*, 32(4), 979–987.

Hornick, J. E., Duncan, F. E., Shea, L. D. *et al.* (2013). Multiple follicle culture supports primary follicle growth through paracrine-acting signals. *Reproduction (Cambridge, England)*, 145(1).

Hunter, R. H. F. (1974). Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *The Anatomical Record*, 178(2), 169-185.

Hunter, R. H. F. (1991). Fertilization in the pig and horse. In *A comparative overview of mammalian fertilization* (pp. 329-349). Boston, MA: Springer US.

Hutt, K. J., Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive biomedicine online*, 14(6), 758-764.

Hyttel P. *et al.*, 2000. Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed *in vivo*. In *Biol Reprod*, 2000, vol. 63, 1848–1856p.

Hyttel, P. 2011. Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. In: Tosti E, Boni R, editors. In *Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History for a Short Event*. Belgium: Bentham Science Publishers, 2011, 1-37p.

Hyun, S. H., Lee, G. S., Kim, D. Y. *et al.* (2003). Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. *Theriogenology*, 59(7), 1641-1649.

Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F. *et al.* (2001). The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Molecular biology of the cell*, 12(7), 2047-2060.

Chauvin, S., Cohen-Tannoudji, J., Guigon, C. J. (2022). Estradiol Signaling at the Heart of Folliculogenesis: Its Potential Deregulation in Human Ovarian Pathologies. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 512.

Cheeseman, L. P., Boulanger, J., Bond, L. M. *et al.* (2016). Two pathways regulate cortical granule translocation to prevent polyspermy in mouse oocytes. *Nature Communications*, 7(1), 13726.

Chen, C. H., Sun, Y. H., Pei, D. S. *et al.* (2009). Comparative expression of zebrafish *lats1* and *lats2* and their implication in gastrulation movements. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(11), 2850-2859.

Chronopoulou, E., Harper, J. C. (2015). IVF culture media: past, present and future. *Human reproduction update*, 21(1), 39-55.

Ibrahimian, P. (2020). *Characterization of Aurka Knockout in Mouse Oocytes* (Doctoral dissertation, Rutgers The State University of New Jersey, School of Graduate Studies).

Jadierko [online]. (2023). [cit. 7.8.2023]. Dostupné z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleolus>>

Jaffe, L. A., Egbert, J. R. (2017). Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. V Annual Review of Physiology (Roč. 79, s. 237–260). Annual Reviews Inc.

Jiménez, V. M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.

Khalin, I. V., Musina, N. Z., Alyautdin, R. N. *et al.* (2015). Prospects of Using Brain-Derived Neurotrophic Factor for the Treatment of Optic-Nerve Neuropathy (A Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48, 699-702.

Khokhlova, E. V., Fesenko, Z. S., Sopova, J. V. *et al.* (2020). Features of DNA repair in the early stages of mammalian embryonic development. *Genes*, 11(10), 1138.

Kidder, G. M., Mhawi, A. A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 123(5), 613-620.

Kirillova, A., Smitz, J. E., Sukhikh, G. T. *et al.* (2021). The role of mitochondria in oocyte maturation. *Cells*, 10(9), 2484.

Kollins, K. M. (2003). *Development of cerebellar granule neuron polarity and the regulation of morphogenesis by brain derived neurotrophic factor*. University of Maryland, College Park.

Kolonin, M. G., Finley Jr, R. L. (2000). A role for cyclin J in the rapid nuclear division cycles of early Drosophila embryogenesis. *Developmental biology*, 227(2), 661-672.

Kresoja-Rakic, J., Santoro, R. (2019). Nucleolus and rRNA Gene Chromatin in Early Embryo Development. *Trends in genetics : TIG*, 35(11), 868–879.

Kuijk, E. W., Du Puy, L., Van Tol, H. T. *et al.* (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics*, 237(4), 918-927.

Kupriyanova, L., Safronova, L. (2023). A Brief Review of Meiotic Chromosomes in Early Spermatogenesis and Oogenesis and Mitotic Chromosomes in the Viviparous Lizard *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) with Multiple Sex Chromosomes. *Animals*, 13(1), Article 1.

Kyogoku, H., Fulka Jr, J., Wakayama, T. *et al.* (2014). De novo formation of nucleoli in developing mouse embryos originating from enucleolated zygotes. *Development*, 141(11), 2255-2259.

Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R. *et al.*, The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 165–182 (2021).

Large, M. J., DeMayo, F. J. (2012). The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 358(2), 155-165.

Latham, K. E., Schultz, R. M. (2001). Embryonic genome activation. *Front Biosci*, 6, D748-D759.

Laurincik, J., Kopečný, V., Hyttel, P. (1996). Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vivo: Ultrastructure and cell cycle chronology. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 43(1), 62-69.

Laurinčík, J. *et al.*, 2004. Biotechnologie živočichov. Nitra: UKF, 2004. p. 172. ISBN 80-8050-860-7

Laurinčík, J., Hyttel, P., Baran, V. *et al.* (1997). Pronucleus development and organization of intranuclear bodies during the first bovine embryonic cell cycle in vitro. *Theriogenology*, 1(47), 326.

Laurinčík, J., Hyttel, P., Baran, V. *et al.*(1998). A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: Cell-cycle chronology and ultrastructure. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 50(2), 192-199.

LaVoie, H. A. (2005). Epigenetic control of ovarian function: the emerging role of histone modifications. *Molecular and cellular endocrinology*, 243(1-2), 12-18.

Lee, K., Davis, A., Zhang, L. *et al.* (2015). Pig oocyte activation using a Zn<sup>2+</sup> chelator, TPEN. *Theriogenology*, 84(6), 1024-1032.

Lee, S., Kang, H. G., Jeong, P. S. *et al.* (2020). Effect of oocyte quality assessed by brilliant cresyl blue (BCB) staining on cumulus cell expansion and sonic hedgehog signaling in porcine during *in vitro* maturation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4423.

Levi, M., Ghetler, Y., Shulman, A. *et al.* (2013). Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes. *Human Reproduction*, 28(9), 2482-2489.

L'Hernault, S. W. (2006). Spermatogenesis. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*.

Li, P., Li, C., Zhao, X. *et al.* (2004). p27Kip1 stabilization and G1 arrest by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25260-25267.

Liang, X., Ma, J., Schatten, H., Sun, Q. (2012). Epigenetic changes associated with oocyte aging. *Science China Life Sciences*, 55, 670-676.

Licht, P., Russu, V., Wildt, L. (2001). On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 19, No. 01, pp. 037-048). Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Liu, M. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 9, 149.

Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76(9), 1594-1601.

Lonergan, P., Forde, N., Spencer, T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 66-74.

Ma, H., O'Neil, R. C., Marti Gutierrez, N. *et al.* (2017). Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell*, 20(1), 112–119.

Maddox-Hyttel, P., Svarcova, O., Laurincik, J. (2007). Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. *Theriogenology*, 68, S63-S70.

Makarevich, A. V. (2012). 8 Quality Assessment of Mammalian Preimplantation Embryos. In: Laurinčík, J. *et al.* (2012) *Embryotechnology*. Nitra: Prírodovedec, 165p.

Makrigiannakis, A., Vrekoussis, T., Zoumakis, E. *et al.* (2017). The role of HCG in implantation: a mini-review of molecular and clinical evidence. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1305.

Malinský, J.; Lichnovský, V; Michalíková, Z. (2004). Přehled histologie člověka v obrazech. II. díl. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. p.153. ISBN 80-244-0850-3.

Manku, G., Culty, M. (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction (Cambridge, England)*, 149(3), R139–R157.

Mao, L., Lou, H., Lou, Y. *et al.* (2014). Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(3), 284-299.

Marangos, P., FitzHarris, G., Carroll, J. (2003). Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei.

Martin, R. H. (2008). Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(4), 523-531.

Martinsson-Ahlzén, H. S., Liberal, V., Grünenfelder, B. *et al.* (2008). Cyclin-dependent kinase-associated proteins Cks1 and Cks2 are essential during early embryogenesis and for cell cycle progression in somatic cells. *Molecular and cellular biology*, 28(18), 5698-5709.

Matavel, A., Medei, E., Lopes, C. M. (2010). PKA and PKC partially rescue long QT type 1 phenotype by restoring channel-PIP2 interactions. *Channels*, 4(1), 3-11.

McGinnis, L. K., Rodrigues, P., Limback, D. (2018). Structural Aspects of Oocyte Maturation. V M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* (s. 176–182). Academic Press.

Mihajlović, A. I., FitzHarris, G. (2018). Segregating chromosomes in the mammalian oocyte. *Current Biology*, 28(16), R895-R907.

Morbeck, D. E., Krisher, R. L., Herrick, J. R. *et al.* (2014). Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertility and Sterility*, 102(3), 759-766.

Mork, L., Tang, H., Batchvarov, I., Capel, B. (2012). Mouse germ cell clusters form by aggregation as well as clonal divisions. *Mechanisms of development*, 128(11-12), 591-596.

Motlik, J., Fulka, J. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25(1), 87-96.

Moustakas, A., Heldin, C. H. (2007). Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science*, 98(10), 1512-1520.

Mutembei, H., Tsuma, V., Muasa, B. *et al.* (2015). Bovine in-vitro embryo production and its contribution towards improved food security in Kenya. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 15(68), 9722–9743.

Nakatani, T., Torres-Padilla, M. E. (2023). Regulation of mammalian totipotency: a molecular perspective from *in vivo* and *in vitro* studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 81, 102083.

Narayanan, A., Eifert, J., Marfatia, K. A. *et al.* (2003). Nuclear RanGTP is not required for targeting small nucleolar RNAs to the nucleolus. *Journal of cell science*, 116(1), 177-186.

Nawshad, A., LaGamba, D., Polad, A., Hay, E. D. (2005). Transforming growth factor- $\beta$  signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs*, 179(1-2), 11-23.

Nemcova, L., Bartkova, A. R., Kinterova, V., Toralova, T. (2023). Importance of Supplementation during In Vitro Production of Livestock Animals. *Theriogenology-Recent Advances in the Field*.

Neugebauer, J. M., Amack, J. D., Peterson, A. G. *et al.* (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature*, 458(7238), 651-654.

Nikiforaki, D., Meerschaut, F. V., De Roo, C. *et al.* (2016). Effect of two assisted oocyte activation protocols used to overcome fertilization failure on the activation potential and calcium releasing pattern. *Fertility and Sterility*, 105(3), 798-806.

Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G. *et al.* (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 661-687.

Nishijima, C., Kawamura, K., Okamoto, N. *et al.* (2014). Regulation of preimplantation embryo development in mice by FMS-like tyrosine kinase 3 ligand. *Journal of Mammalian Ova Research*, 31(1), 45-51.

Ogushi, S., Palmieri, C., Fulka, H. *et al.* (2008). The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science*, 319(5863), 613-616.

Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, 140(22), 4471-4479.



Oktem, O., Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Human reproduction*, 25(12), 2944-2954.

Olivennes, F., Belaisch-Allart, J., Emperaire, J. C. *et al.* (2000). Prospective, randomized, controlled study of *in vitro* fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). *Fertility and sterility*, 73(2), 314-320.

Olson, M. O., Dundr, M., Szebeni, A. (2000). The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in cell biology*, 10(5), 189-196.

Oxender, W. D., Colenbrander, B., van deWiel, D. F. *et al.* (1979). Ovarian development in fetal and prepubertal pigs. *Biology of reproduction*, 21(3), 715-721.

Pastor, W. A., Aravind, L., Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(6), 341-356.

Patton, B. K., Madadi, S., Pangas, S. A. (2021). Control of ovarian follicle development by TGF $\beta$  family signaling. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, 18, 102-110.

Paulini, F., Melo, E. O. (2011). The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in domestic animals*, 46(2), 354-361.

Pederson, T. (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), a000638.

Pereira, G. R., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F. *et al.* (2013). Influence of equine growth hormone, insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and cytoskeleton morphology in equine oocytes. *Animal*, 7(9), 1493-1499.

Picton, H. M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, 55(6), 1193-1210.

Pongsuthirak, P., Songveeratham, S., Vutyavanich, T. (2015). Comparison of blastocyst and Sage media for *in vitro* maturation of human immature oocytes. *Reproductive sciences*, 22(3), 343-346.

Pyoos, G. M., Maqhashu, A. M., Scholtz, M. M. *et al.* (2018). The comparison of three media on the *in vitro* maturation rate of pig oocytes. *South African Journal of Animal Science*, 48(6).

Reader, K. L., Stanton, J. A. L., Juengel, J. L. (2017). The role of oocyte organelles in determining developmental competence. *Biology*, 6(3), 35.

Richard Albert, J., Au Yeung, W. K., Toriyama, K. *et al.* (2020). Maternal DNMT3A-dependent de novo methylation of the paternal genome inhibits gene expression in the early embryo. *Nature communications*, 11(1), 5417.

Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L. *et al.* (2016). Ovarian folliculogenesis. *Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development*, 167-190.

Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis. *et al.* (2008). Oogenesis: prospects and challenges for the future. *Journal of cellular physiology*, 216(2), 355-365.

Roy, S., Gandra, D., Seger, C. *et al.* (2018). Oocyte-Derived Factors (GDF9 and BMP15) and FSH Regulate AMH Expression Via Modulation of H3K27AC in Granulosa Cells. *Endocrinology*, 159(9), 3433–3445.

Roy, S., Gandra, D., Seger, C. *et al.* (2018). Oocyte-derived factors (GDF9 and BMP15) and FSH regulate AMH expression via modulation of H3K27AC in granulosa cells. *Endocrinology*, 159(9), 3433-3445.

Russell, D. F., Baqir, S., Bordignon, J., Betts, D. H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1255-1270.

Saitou, M., Hayashi, K. (2021). Mammalian in vitro gametogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6563), eaaz6830.

Saitou, M., Miyauchi, H. (2016). Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell*, 18(6), 721–735.

Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., Nomikos, M. (2020). Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: an update. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 28.

Sanchez, F.- Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. In *Biochim Biophys Acta*, 2012, no. 1822, 1896–1912p.

Satyanarayana, A., Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925-2939.

Sciorio, R., Miranian, D., Smith, G. D. (2022). Non-invasive oocyte quality assessment. *Biology of Reproduction*, 106(2), 274-290.

Selman, H. A., De Santo, M., Sterzik, K., Coccia, E., El-Danasouri, I. (2002). Effect of highly purified urinary follicle-stimulating hormone on oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 78(5), 1061-1067.

Sharma, A., Tiwari, M., Gupta, A. *et al.* (2018). Journey of oocyte from metaphase-I to metaphase-II stage in mammals. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 5530-5536.

Sheng, G., Martinez Arias, A., Sutherland, A. (2021). The primitive streak and cellular principles of building an amniote body through gastrulation. *Science*, 374(6572), abg1727.

Shi, J., Chen, Q., Li, X. *et al.* (2015). Dynamic transcriptional symmetry-breaking in pre-implantation mammalian embryo development revealed by single-cell RNA-seq. *Development*, 142(20), 3468-3477.

Shishova, K. V., Lavrentyeva, E. A., Dobrucki, J. W., Zatsepina, O. V. (2015). Nucleolus-like bodies of fully-grown mouse oocytes contain key nucleolar proteins but are impoverished for rRNA. *Developmental biology*, 397(2), 267-281.

Scheffler, K., Uraji, J., Jentoft, I. *et al.* (2021). Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nature communications*, 12(1), 841.

Schiøtt, M., Romanowsky, S. M., Bækgaard, L. *et al.* (2004). A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(25), 9502-9507.

Schnabel, C. A., Selleri, L., Jacobs, Y. *et al.* (2001). Expression of Pbx1b during mammalian organogenesis. *Mechanisms of development*, 100(1), 131-135.

Schultz, R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human reproduction update*, 8(4), 323-331.

Schulze, J., Schierenberg, E. (2011). Evolution of embryonic development in nematodes. *EvoDevo*, 2, 1-17.

Schwarzacher, H. G., Wachtler, F. (1993). The nucleolus. *Anatomy and embryology*, 188(6), 515–536.

Silva, A. F. B., Lima, L. F., Morais, A. N. P. *et al.* (2022). Oocyte in vitro maturation with eugenol improves the medium antioxidant capacity and total cell number per blastocyst. *Theriogenology*, 192, 109–115.

Smith, R., Zakar, T., Madsen, G. (2013). Mammalian labor: variations on a theme by amniota.

Smitz, J. E., Cortvriendt, R. G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*, 123(2), 185-202.

Son, Y. B., Jeong, Y. I., Hossein, M. S. *et al.* (2022). Influence of PMSG on Superstimulation and Embryo Development Following Somatic Cell Nuclear Transfer in Holstein Cows in the United Arab Emirates. *Frontiers in veterinary science*, 9, 895325.

Stewart, K. R., Veselovska, L., Kim, J. *et al.* (2015). Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes. *Genes & development*, 29(23), 2449-2462.

Stival, C., Puga Molina, L. D. C., Paudel, B. *et al.* (2016). Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization*, 93-106..

Summers, M. C., Biggers, J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human reproduction update*, 9(6), 557-582.

Susor, A., Jansova, D., Anger, M., Kubelka, M. (2016). Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell and tissue research*, 363, 69-84.

Swain, J. E., Pool, T. B. (2008). ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human reproduction update*, 14(5), 431-446.

Swann, K., Lai, F. A. (2016). Egg activation at fertilization by a soluble sperm protein. *Physiological reviews*, 96(1), 127-149.

Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., Lai, F. A. (2006, April). PLC $\zeta$  (zeta): A sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 17, No. 2, pp. 264-273). Academic Press.

Takeuchi, M., Okabe, M., Aizawa, S. (2009). The genus Polypterus (bichirs): a fish group diverged at the stem of ray-finned fishes (Actinopterygii). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(5), pdb-emo117.

Tam, P. P., Loebel, D. A. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 368-381.

Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S. *et al.* (2009). Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular human reproduction*, 15(1), 1-9.

Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T. *et al.* (2012). Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 427(2), 285-292.

Tesarik, J., Hazout, A., Mendoza, C. (2003). Luteinizing hormone affects uterine receptivity independently of ovarian function. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(1), 59-64.

Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Meikle, A. *et al.* (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction-Cambridge-Supplement*, 253-266.

Tománek, M., Kopecný, V., Kanka, J. (1989). Genome reactivation in developing early pig embryos: an ultrastructural and autoradiographic analysis. *Anatomy and embryology*, 180(3), 309-316.

Tomanek, R. J., Ishii, Y., Holifield, J. S. *et al.* (2006). VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo. *Circulation research*, 98(7), 947-953.

Töpfer-Petersen, E., Čechová, D., Henschen, A. *et al.* (1990). Cell biology of acrosomal proteins: Zellbiologie akrosomaler Proteine. *Andrologia*, 22(S1), 110-121.

Trebichalská, Z., Kyjovská, D., Kloudová, S. *et al.* (2021). Cytoplasmic maturation in human oocytes: An ultrastructural study. *Biology of reproduction*, 104(1), 106-116.

Trombly, D. J., Woodruff, T. K., Mayo, K. E. (2009). Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. *Seminars in reproductive medicine*, 27(1), 14–23.

Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K. *et al.* (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1053-1063.

Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., De Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology?. *Reproductive biomedicine online*, 7(6), 664-670.

Vanorny, D. A., Prasasya, R. D., Chalpe, A. J. *et al.* (2014). Notch signaling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(4), 499–511.

Vantman, D., Vega, M. (2010). Reproductive physiology and evolutive changes with women age. *Rev. Med. Clin. Condes*, 21(3), 348-62.

Varga, E., Pataki, R., Lőrincz, Z. *et al.* (2008). Parthenogenetic development of *in vitro* matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Animal reproduction science*, 105(3-4), 226-233.

Virant-Klun, I. (2015). Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 49-60.

Voeltz, G. K., Rolls, M. M., Rapoport, T. A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 3(10), 944-950.

Wassarman, P. M. 2013. *Gametogenesis*. Londýn: Academic Press, 2013, 435p. ISBN 978-0-12-416024-8

Wassarman, P. M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z. *et al.* (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. *Molecular and cellular endocrinology*, 234(1-2), 95-103.

Wassarman, P. M., Litscher, E. S. (2022). Female fertility and the zona pellucida. V *ELife* (Roč. 11). eLife Sciences Publications Ltd.

Wathes, D. C., Taylor, V. J., Cheng, Z., Mann, G. E. (2003). Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reproduction supplement*, 61, 219-237.

Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of animal science*, 85(suppl\_13), E1-E3.

Werneburg, I., Laurin, M., Koyabu, D., Sánchez-Villagra, M. R. (2016). Evolution of organogenesis and the origin of altriciality in mammals. *Evolution & Development*, 18(4), 229-244.

Wiesen, J. F., Midgley, A. R., Jr. (1994). Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biology of reproduction*, 50(2), 336–348.

Wigglesworth, K., Lee, K. B., Emori, C. *et al.* (2015). Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. *Biology of reproduction*, 92(1), 23-1.

Wilhemová, R. *et al.* [online]. (2020). [cit. 12.7.2023]. Vznik a vývoj těhotenství. Dostupné z: <[https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps19/porodni\\_asistence/web/pages/2\\_1.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps19/porodni_asistence/web/pages/2_1.html)>

Williams, C. J. (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human reproduction update*, 8(4), 313-321.

Wu, G., Bazer, F. W., Satterfield, M. C. *et al.* (2013). Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino acids*, 45, 241-256.

Wu, J., Xu, B., Wang, W. (2007). Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(9), 419–424.

Xu, C. S., Pang, S., Shtengel, G. *et al.* (2021). An open-access volume electron microscopy atlas of whole cells and tissues. *Nature*, 599(7883), 147-151.

Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y. *et al.* (2018). Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6412), 356–360.

Yamashiro, C., Sasaki, K., Yokobayashi, S., Kojima, Y., Saitou, M. (2020). Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. *Nature Protocols*, 15(4), Article 4.

Yang, X., Chrisman, H., Weijer, C. J. (2008). PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression.

Yelin, R., Kot, H., Yelin, D., Fainsod, A. (2007). Early molecular effects of ethanol during vertebrate embryogenesis. *Differentiation*, 75(5), 393-403.

Yi, X., Xi, H. L., Zhang, S.-L., Yang, J. (2019). Relationship between the positions of cytoplasmic granulation and the oocytes developmental potential in human. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1.

Yin, Z., Zhu, M., Bottjer, D. J. *et al.* (2016). Meroblastic cleavage identifies some Ediacaran Doushantuo (China) embryo-like fossils as metazoans. *Geology*, 44(9), 735-738.

Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A. *et al.* (2002). Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of reproduction*, 66(1), 112–119

Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C. *et al.* (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology*, 4(1), 33-41.

Zeleznik, A. J., Wildt, L., Schuler, H. M. (1980). Characterization of ovarian folliculogenesis during the luteal phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys using [3H] thymidine autoradiography. *Endocrinology*, 107(4), 982–988.

Zhang, C. P., Yang, J. L., Zhang, J. *et al.* (2011). Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology*, 152(6), 2437-2447.

Zhang, T., Zheng, Y., Han, R. *et al.* (2022). Effects of pyruvate on early embryonic development and zygotic genome activation in pigs. *Theriogenology*, 189, 77-85.

Zuccotti, M., Garagna, S., Merico, V. *et al.* (2005). Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes. *Molecular and cellular endocrinology*, 234(1-2), 11-17.

**Názov publikácie:** *In vitro* produkcia embryí

Edícia Prírodovedec č. 828

**Autori:** RNDr. Alexandra Rosenbaum Bartková, PhD.  
prof. RNDr. František Strejček, PhD.

**Recenzenti:**

prof. Ing. Peter Chrenek, DrSc.

Odbor genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat; Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum; Hlohovecká 2, 951 41 Lužianky Slovenská republika

prof. MVDr. Massányi Peter, DrSc.

Katedra fyziológie živočíchov; Ústav aplikovanej biológie; Fakulta biotechnológie a potravinárstva; Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre; Tr. A. Hlinku 2; 94976 Nitra; Slovenská Republika

Rukopis bol schválený Edičnou komisiou FPVaI UKF v Nitre s odporúčaním zaradenia do kategórie vedecká monografia.

**Edícia:** Prírodovedec č. 828

**Formát:** B5

**Rok vydania:** 2023

**Počet strán:** 144

**Počet výtlačkov:** 100

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou

Vydala: © FPVaI UKF v Nitre, 2023

ISBN 978-80-558-2100-9