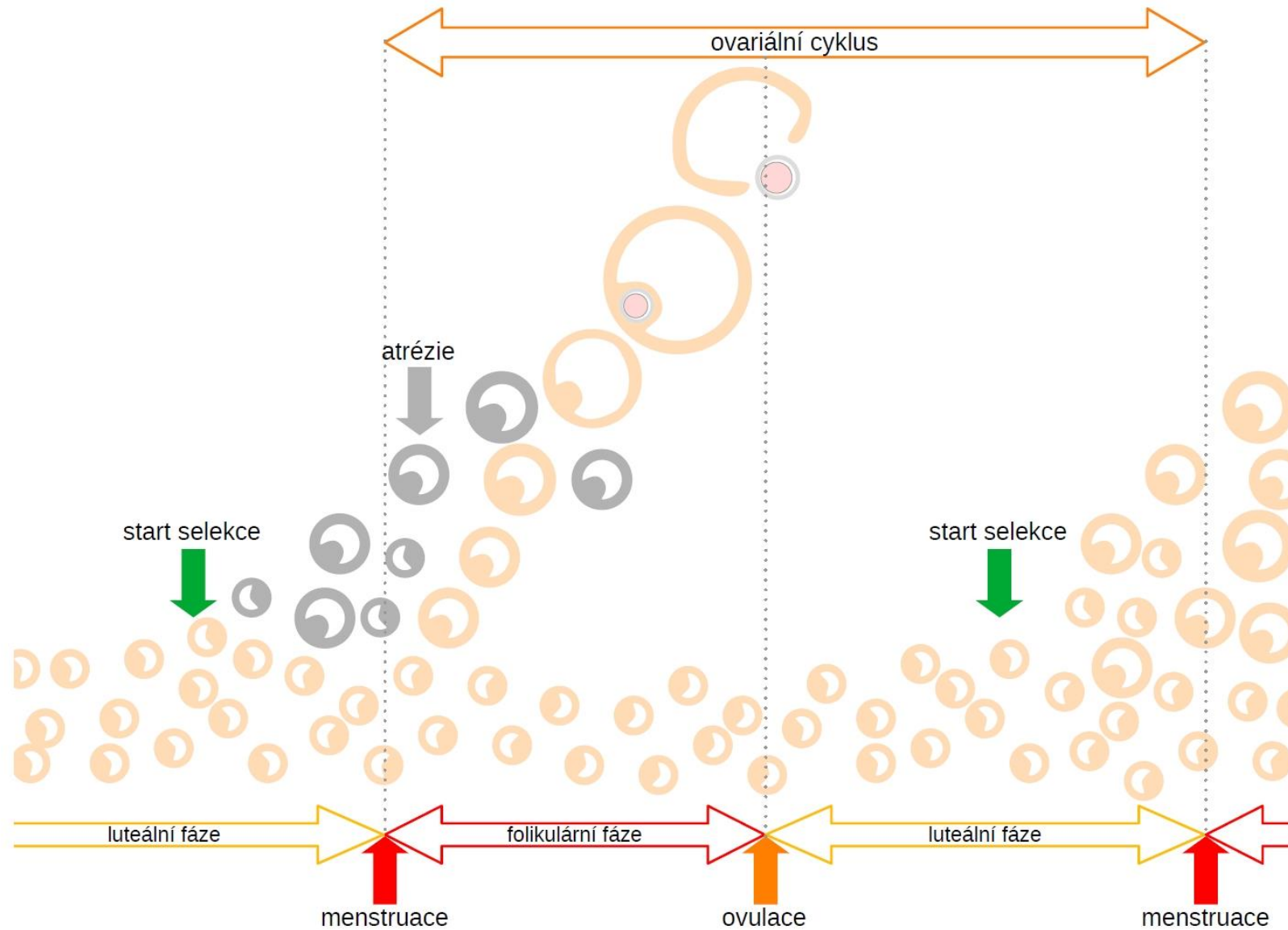
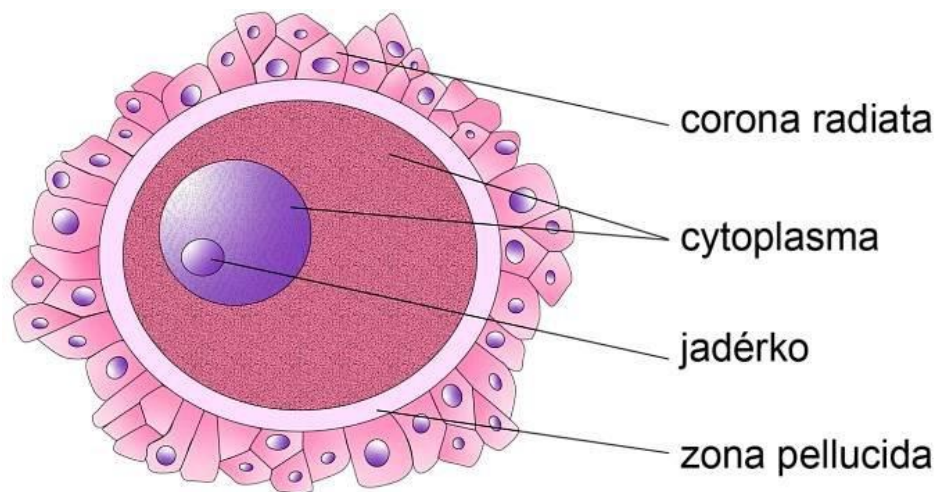


# **Fyziologie oocytu, ovulace, kapacitace spermií, oplození**

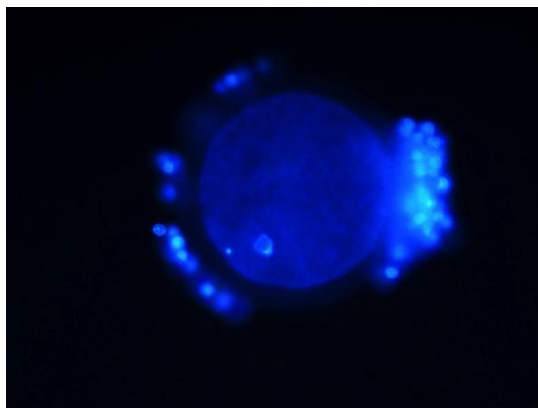
Marie Nováková



# Fyziologie oocytu



Zdroj: is.muni.cz



Metabolismus oocytu

Mitochondrie

ER

Centrioly

Transzonální výběžky

Membránové transportéry

Receptory

Chromatin a transkripce

Translace a sekreční aktivita

Cytoskelet a buněčné dělení

# Metabolismus oocytu – lidský oocyt je tzv. alecitální

## OOCYT

- Neobsahuje energetické zásoby (glykogen, lipidy)
- Zanedbatelná role  $\beta$ -oxidace
- Nízká aktivita fosfofruktokinázy + nutnost aktivně transportovat glc (kumulární bb, GLUT)

## FOLIKULÁRNÍ BUŇKY

- Vysoká aktivita fosfofruktokinázy – konverze glc na pyruvát, laktát a NADPH
- Transport do oocytu (transzonální výběžky, difuze přes zonu a periviteliní prostor)
- Citrátový cyklus – pyruvát a laktát metabolizovány, oxidativní fosforylace, tvorba ATP

**Mitochondrie oocyty** – klíčová úloha v oocyty (100 tis. ve zralém oocyty, tj. 1:50, 200 tis. kopií mtDNA)

## ENERGETIKA

- Efektivní konverze energie (1 glc = 18x více ATP než při glykolýze)
- Vznik ROS – **nebezpečí poškození mitochondriální DNA**

## STRUKTURA

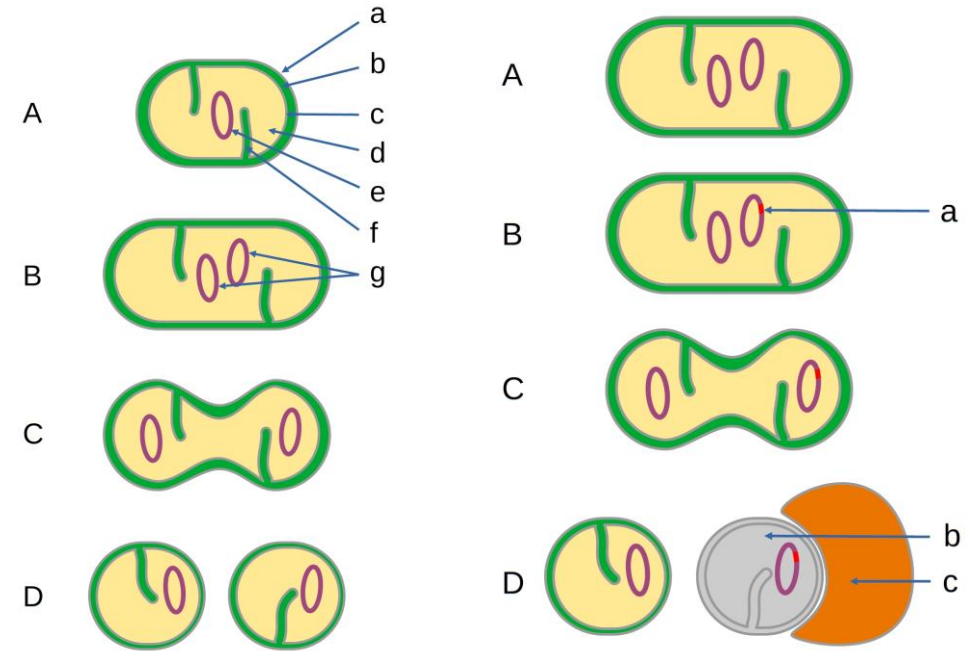
- Mitochondrie oocyty vs. mitochondrie somatické
- Menší počet kopií mtDNA (1-2)
- Kulaté, malé
- Přesuny v rámci oocyty podle energetických potřeb díky cytoskeletu
- V různých fázích vývoje oocyty různá pozice a kumulace mitochondrií
- Shlukování s ER na konci procesu maturace oocyty

# METABOLISMUS KALCIA

- Vápníkové kanály na mt membráně – vnitřní (MCU) i vnější (VDAC)
- **OSCILACE** koncentrace kalcia

# POŠKOZENÍ MITOCHONDRIÍ

- Malý mitochondriální genom + vysoká koncentrace ROS
- Přirozená eliminace poškozených mitochondrií



# Endoplazmatické retikulum

Pouze **hladké ER**, zásobárna kalcia, transportéry jako v jiných buňkách, při dozrávání se shlukuje s mitochondriemi

## Inaktivace mateřských centriolů

???

Přítomny pouze do pachytenního stadia meiózy I.

???

## Transzonální výběžky

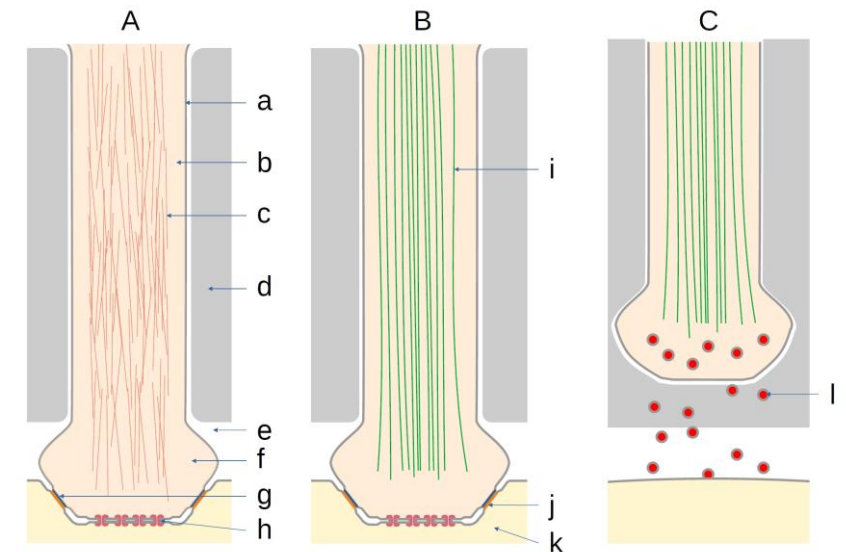
Kumulární bb. – zona pellucida – oolema (ev. cytoplazma)

Opора v cytoskeletu oocytu

Gap junctions + zonula adherens

Preovulační nárůst počtu – postovulační pokles

**FUNKČNÍ JEDNOTKA:** folikulární bb.(gap junctions) + oocyt (transzonální výběžky)



# Membránové transportéry

- Konexiny a panexiny (gap junctions)
- Kanál HVCN1 (voltage-gated protonový kanál, basifikace cytoplazmy oocyty)
- Transportéry monokarbonových kyselin (pyruvát+laktát, MCT1 a MCT2)
- Vápníkové kanály a výměníky (TRPM7, TRPV3, NCLX, Ca-T kanály, IP3-R)
- ATP-dependentní K<sup>+</sup> kanál (regulace MP a Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>)

# Receptory oocyty

- Receptory neurotrofních faktorů (NGF, neurotropiny, atd. - embryonální vývoj ovarií, folikulů, vitalita oocytů, exprese FSH-R..)
- Receptory endokannabinoidů (CB2R – zrání oocyty?)



# Chromatin a transkripce

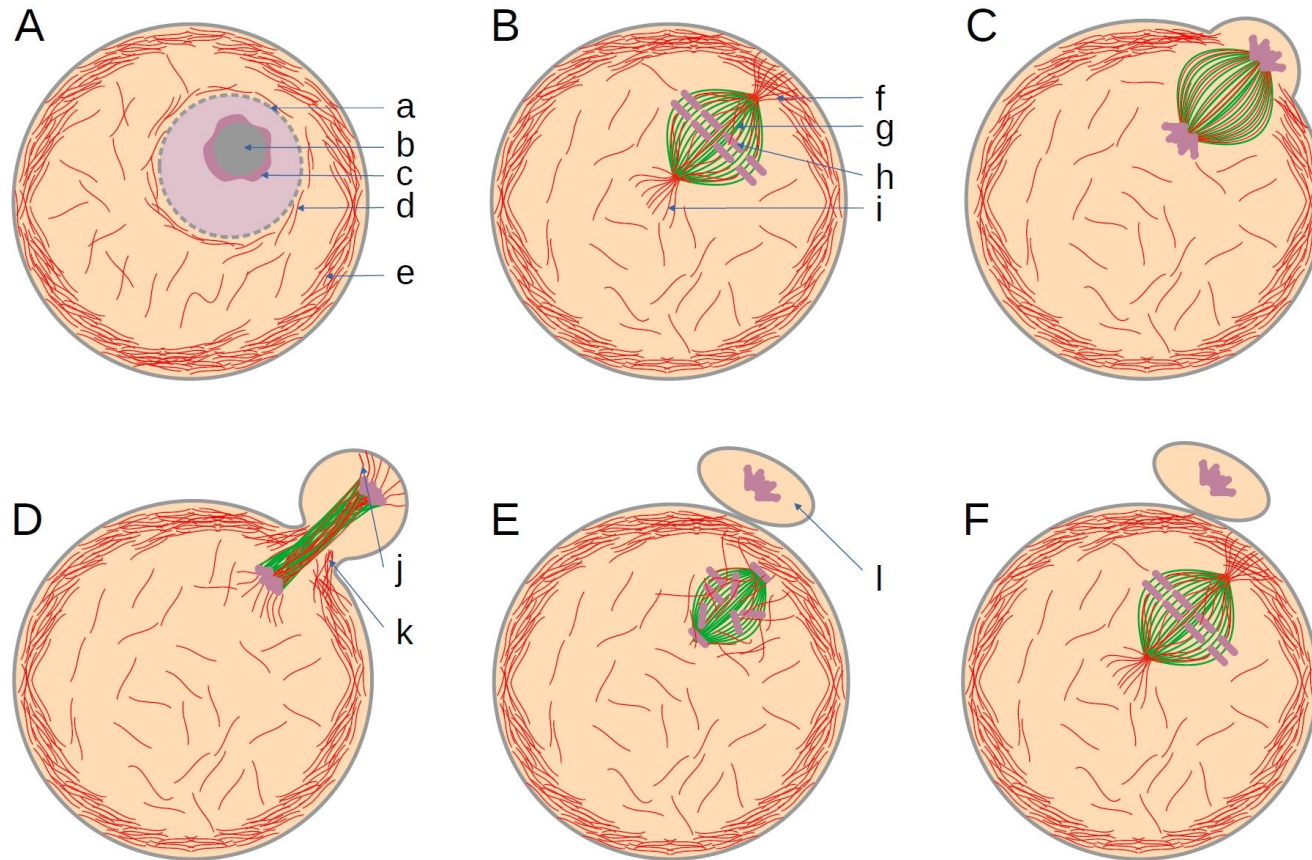
- Období klidu (minimální disperze chromatinu, minimální transkripce) vs. období dozrávání oocytu (maximální disperze chromatinu, intenzivní transkripce)
- Po ukončení růstu – kondenzace chromatinu (lem okolo jadérka), minimalizace transkripce
- Různé geny více nebo naopak méně transkribovány v porovnání se somatickými bb.
- Maternální RNA slouží k translaci ve stadiu oocytu, po oplození jako spící RNA, odstraněna po aktivaci embryonálního genomu

# Translace a sekreční aktivita

- Během růstu oocytu – transkripce i translace, intenzivní i během časně embryogeneze
- mRNA v komplexech s různými proteiny (RBP)

# Cytoskelet a buněčné dělení

- Významná úloha aktinových mikrofilament (mikroklky, migrace mitochondrií, zajištění tvaru oocytu, meiotické dělicí vřeténko...)
- Mikrotubuly v dělicím vřeténku



# Ovulace



Nábor folikulů

Vznik Graafova folikulu

Diferenciace kumulárních buněk

Mechanismy spuštění ovulace

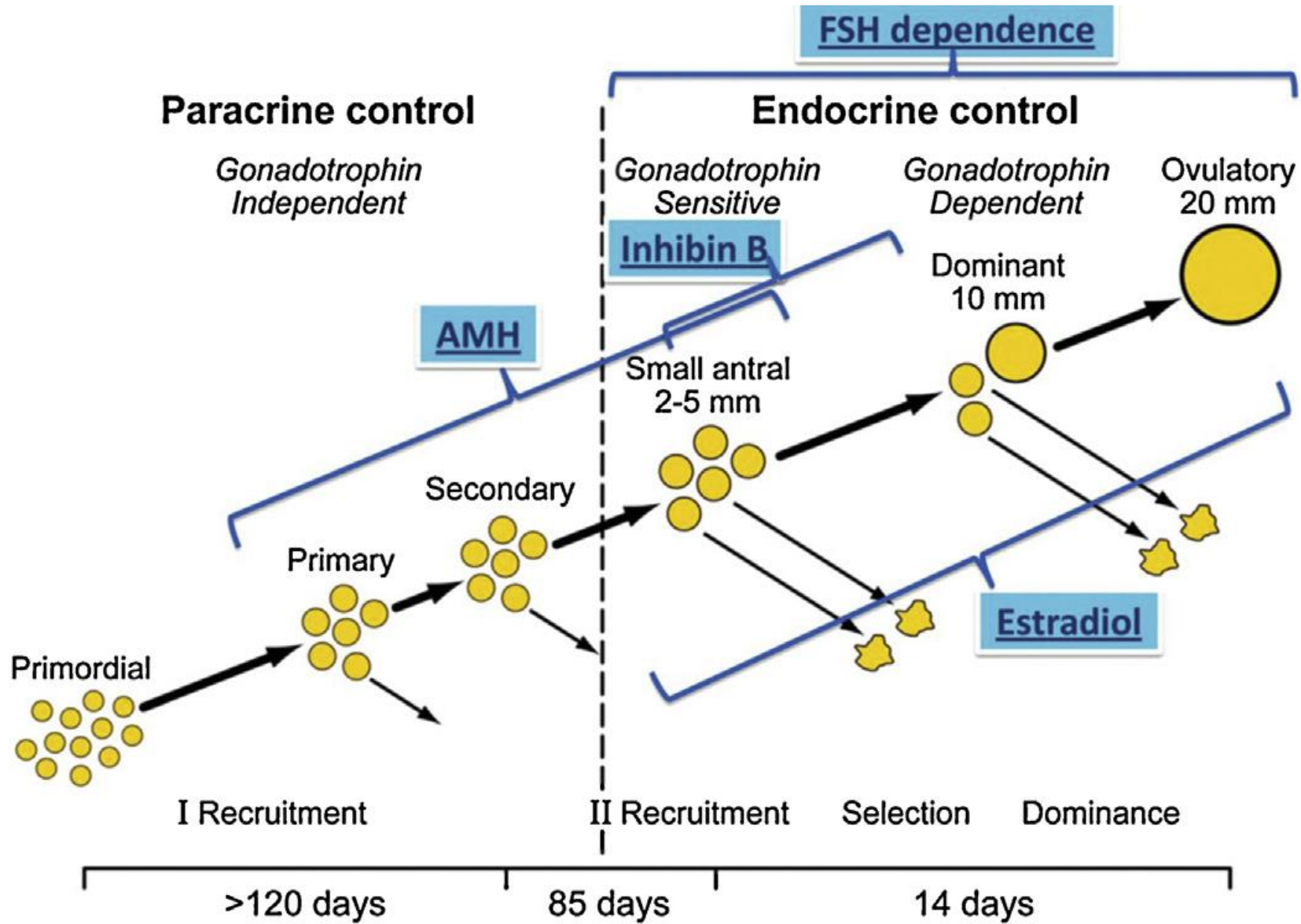
Aktivace signálních drah

Prostaglandiny

Matrix kumulu

Rekonstrukce folikulu

Vlastní ovulace

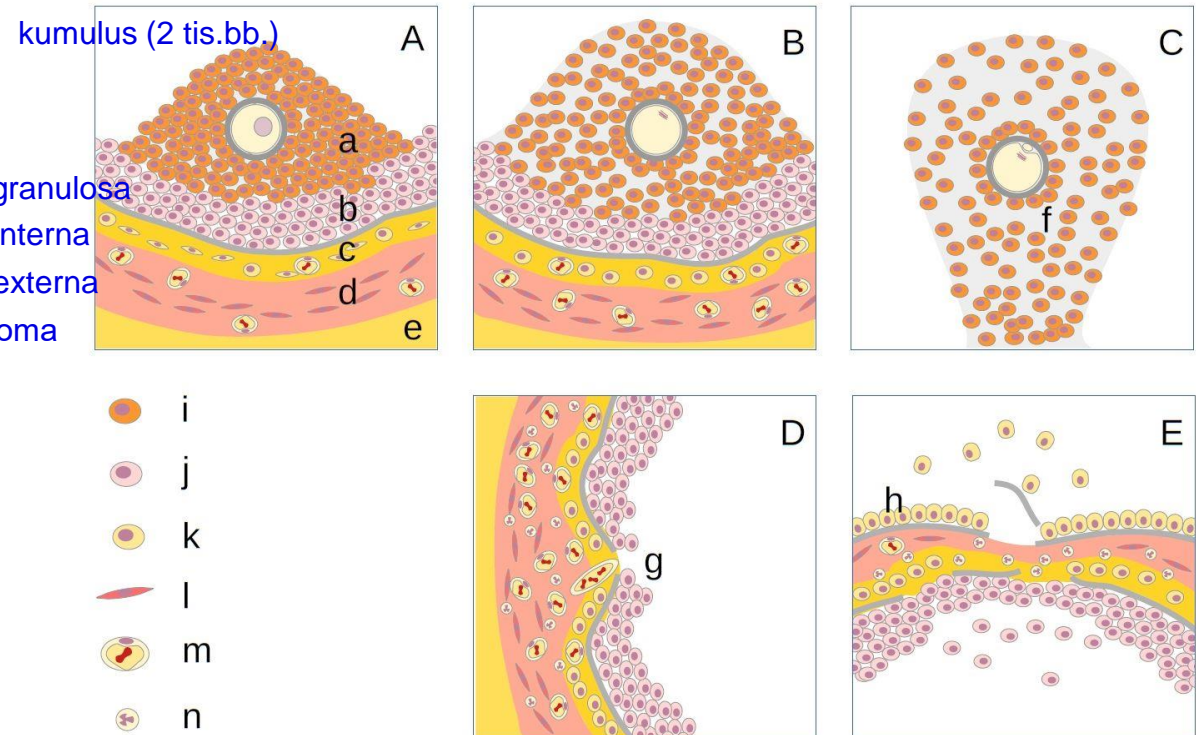
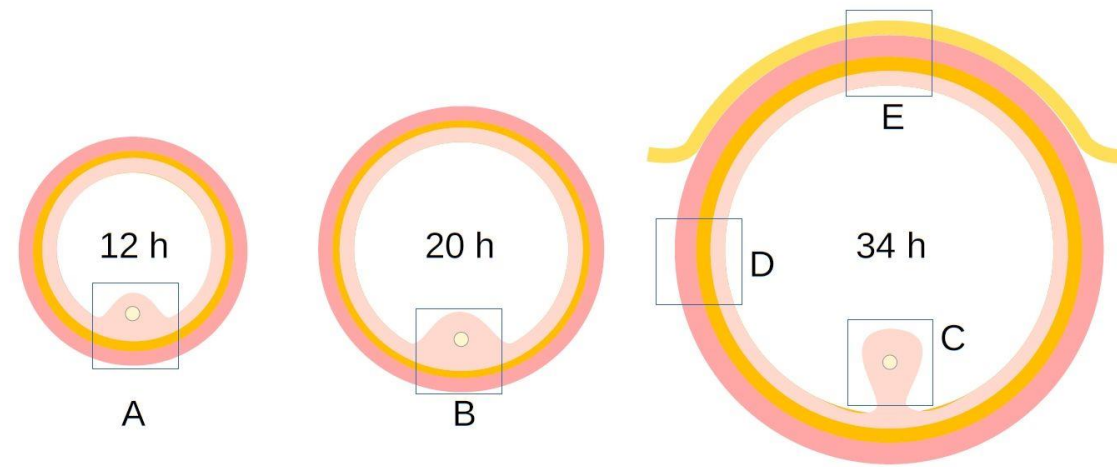


# VZNIK GRAAFOVA FOLIKULU

- Urychlení růstu (cca 6 dní před ovulací)
  - Komplexní mezibuněčná komunikace
  - Vznik komplexu **KUMULUS-OOCYT**
- Folikulární tekutina – filtrace plazmy
  - Oocyt (profáze I meiotického dělení) + 3 linie somatických bb
  - Diferenciace folikulárních bb. během růstu:
    - 1) **granulózové** bb. (v kontaktu s lamina basalis)
    - 2) **kumulární** bb. (v kontaktu s oocytem)

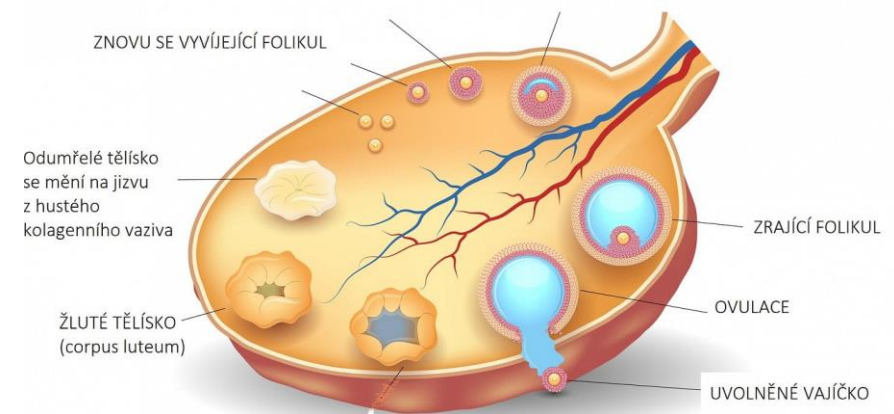
## PARAKRINIE

membrana granulosa  
theca folliculi interna  
theca folliculi externa  
ovariální stroma



# TŘI PODMÍNKY OVULACE

1. Linie kumulárních bb. odlišena od granulózových bb. + vzájemná komunikace s oocytem
2. Peak LH – mnohočetné kaskády v granulózových bb. – paralelní zrání oocytu a exprese ovulačních genů
3. Granulózové bb. a kumulární bb. spustí procesy rozrušení apexu folikulu a uvolnění komplexu ZRALÝ KUMULUS-OOCYT



## VEZIKULÁRNÍ FOLIKUL

### PRIMÁRNÍ FOLIKUL - FSH

Urychlení růstu prim. folikulu – přeměna na vezikulární folikul:

1) Estrogeny uvolňované do folikulu stimulují granul. bb.

↓  
zvýšení počtu **FSH** receptorů (up-regulace) – **VNITŘNÍ POSITIVNÍ ZPĚTNÁ VAZBA** (zvýšená citlivost pro FSH!!!)

2) **Zvýšení počtu (up-regulace) LH receptorů** (estrogeny a FSH) – další urychlení růstu díky „zcitlivění“ na LH

3) Zvýšená sekrece estrogenů a LH urychluje růst thek.buněk, zvyšuje se sekrece → **explozivní růst folikulu**

## DOMINANTNÍ FOLIKUL

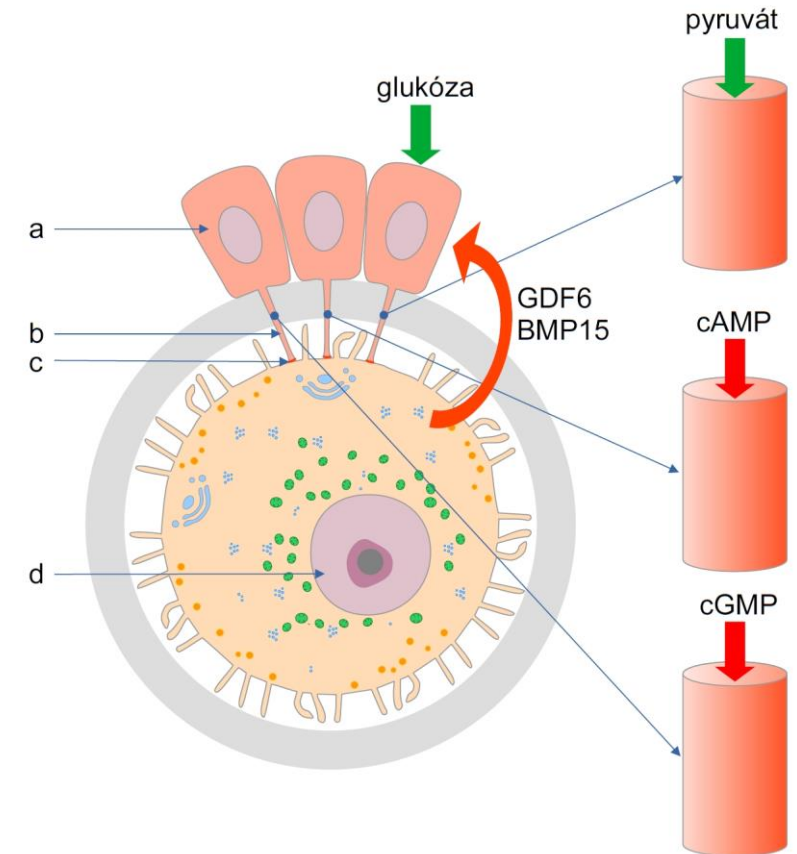
1. Vysoká hladina **estrogenů** z nejrychleji rostoucího folikulu
2. **Negativní** zpětná vazba na produkci FSH z adenohypofýzy
3. Pokles sekrece **FSH**
4. „**Dominantní** folikul“ roste dále díky své **vnitřní pozitivní** zpětné vazbě
5. Ostatní folikuly rostou pomaleji a postupně podléhají **atrezii**



# DIFERENCIACE KUMULÁRNÍCH BUNĚK

- Původ somatický – folikulární bb. preantrálních folikulů
- Přímý kontakt s oocytem
- Udržují zástavu meiózy, reagují odlišně na endokrinní regulační vlivy
- Diferenciaci granulózových buněk na kumulární přímo řídí oocyt
- Morfogeny (GDF9 a BMP15) – řízení exprese genů v kumulárních bb.
- Potlačení exprese LH-R
- Stimulace exprese genů pro řadu enzymů (glykolýza, syntéza cholesterolu)
- Vtok cAMP z kumulárních bb. do oocytu udržuje zástavu meiózy  
+ cGMP blokuje fosfodiesterázu 3A

## GAP JUNCTIONS (connexin-37)



Převzato z:

Pavel Trávník, Klinická fyziologie lidské reprodukce

# MECHANISMY SPUŠTĚNÍ OVULACE

- Minimální velikost Graafova folikulu – 15 mm
- Pozitivní zpětná vazba estradiolu, pokles hladiny těsně před ovulací (down-regulace receptorů, inhibice syntézy progesteronem)
- Postovulační pokles hladiny estradiolu
- Vrchol LH – pokračování meiózy, luteinizace granulózových bb., syntéza progesteronu

# AKTIVACE SIGNÁLNÍCH DRAH

- Aktivace řady signálních drah (PKA, **ERK1/2 kináza**, PKC, Ras) vede k zrání a ruptuře folikulu
- Aktivace adenylátcyklázy (LH-R) uzavře gap junctions – resumpce meiózy
- Aktivace ERK1/2 kináz - ruptura folikulu (peak LH, PG-R, progesteron, syntéza enzymů...)

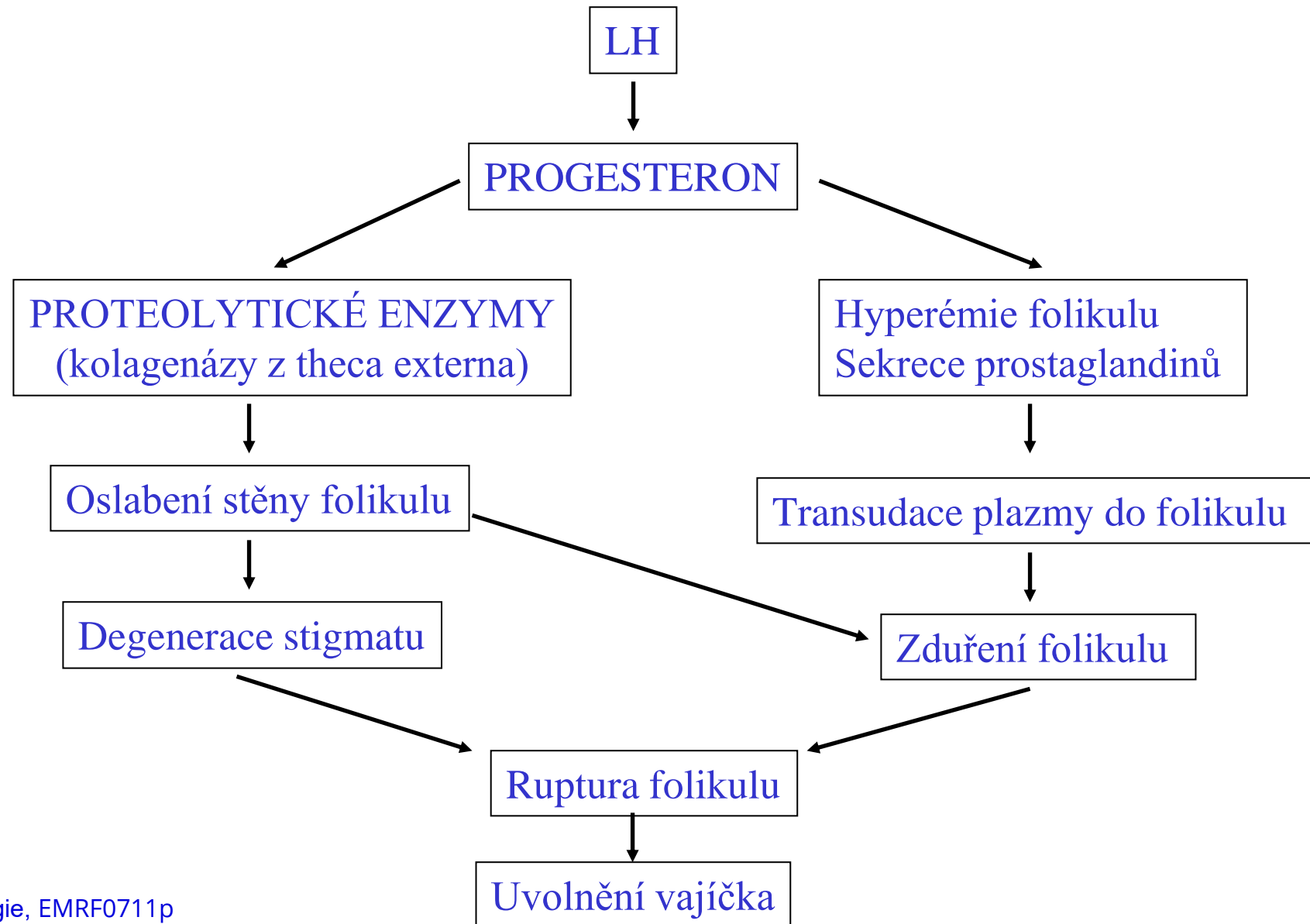
## PROSTAGLANDINY

- Peak LH – aktivace prostaglandin-syntázy2 (**cyklooxygenáza 2**) v granulózových bb.
- Majoritně produkován **prostaglandin E2** (EP2R)
- Indukce ruptury folikulu a angiogeneze

## MATRIX KUMULU

- Expanze matrix díky produkci proteinů, proteoglykanů a glykosaminoglukanů
- Hlavní složkou expandovaného kumulu je **hyaluronan**
- Regulováno parakrinně z granulózových bb. (kumulární bb. nemají LH-R)
- Klíčová úloha v postovulační fázi – adheze kumulu k řasinkovému epitelu vejcovodu - TRANSPORT

# MECHANISMUS OVULACE



# REKONSTRUKCE FOLIKULU

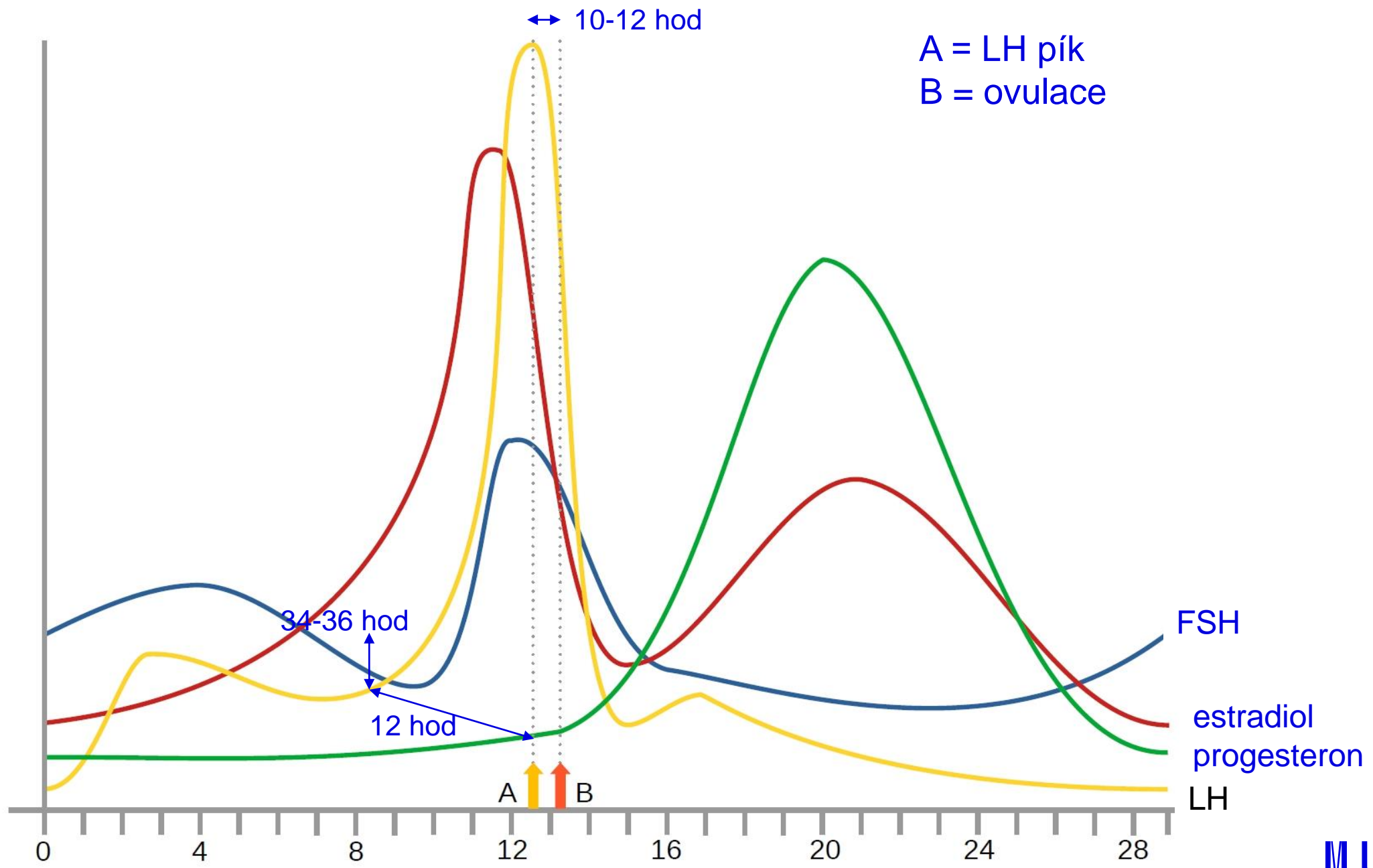
- Před samotnou ovulací – kompletní přestavba folikulu
- Digesce stěny proteázami (PG-R aktivuje gen ADAMTS-1 kódující metaloproteinázu)
- Angiogeneze v okolí folikulu – VEGF (sekrece v odpovědi na peak LH)
- Vazokonstrikce – endoteliny
- Zánětu podobné procesy – PG-R (infiltrace stěny folikulu imunitními bb.)

# VLASTNÍ OVULACE

- Pokles cAMP v oocytu, resumpce meiózy, jaderné a cytoplazmatické dozrání oocytu – plně

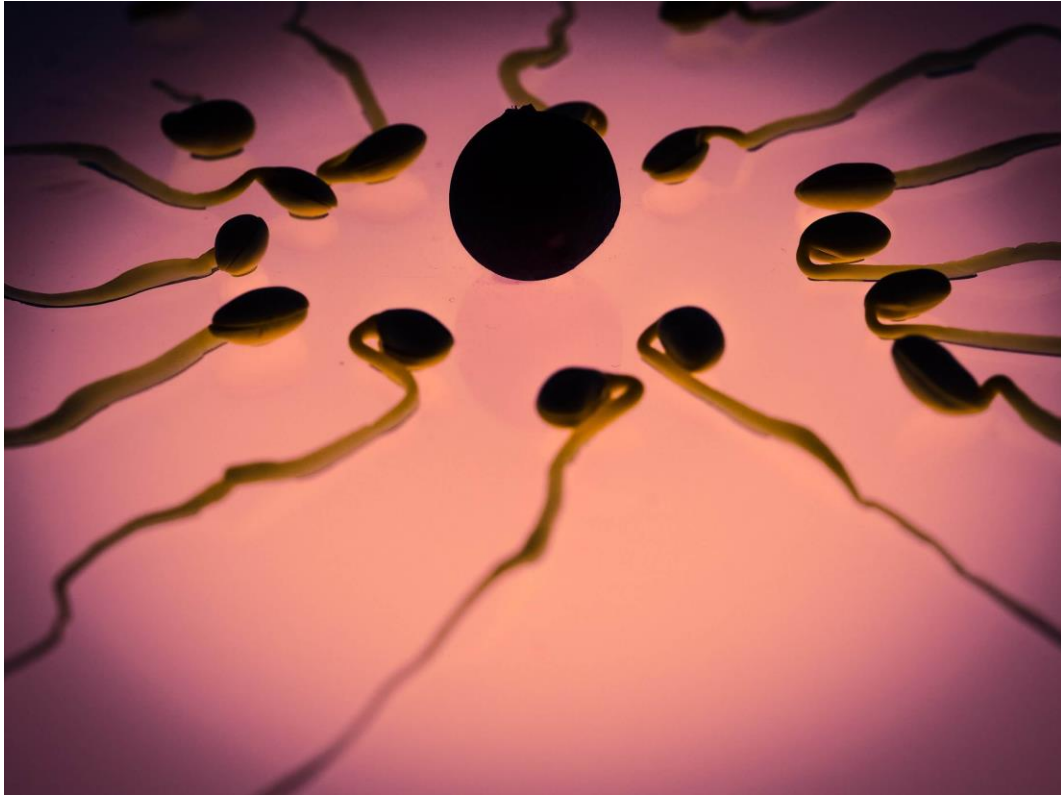
## **KOMPETENTNÍ OOCYT**

- Exprese dalších proteáz (mmP-2, mmP-9, mmP-14, MMP-19, katepsin, kallikrein, kolagenáza typ I)
- Imunitní bb. (makrofágy, neutrofily) – elastáza
- Zvýšení intrafolikulárního tlaku – OVULACE (cumulus oophorus)



A = LH pík  
 B = ovulace

# Oplození



Zdroj: targetzink.com

Kapacitace spermií

Průběh oplození:

1. Spermie ve vejcovodu
2. Akrosomová reakce
3. Interakce spermie s oocytem
4. Aktivace oocytu
5. Ochrana proti polyspermii
6. Děje před sjednocením genomů
7. Sjednocení parentálních genomů
8. Přínos gamet embryu

# KAPACITACE SPERMIÍ (intraindividuálně stabilní, interindividuálně odlišná)

- „Kapacitace spermií je transformační proces zahrnující funkční změny spermií začínající odstraněním a/nebo redistribucí molekul, které spermie získaly v seminální plasmě, pokračuje během průchodu ženským pohlavním traktem a je završen, když spermie získají schopnost prodělat akrosomální reakci v odpověď na ligandy zona pellucida.“ Pavel Trávník, Klinická fyziologie lidské reprodukce
- Probíhá jinak *in vivo* a *in vitro*

## KAPACITOVANÉ SPERMIE JSOU SCHOPNÉ CHEMOTAXE A CHEMOREPULSE

- Inicializace kapacitace - periovulační cervikální hlen (90 sec, složení populace spermií a jejich membrány)
- Zvýšení obsahu cholesterolu po kontaktu spermie se seminální plazmou brání kapacitaci a akrosomální reakci **vs.** pokles obsahu cholesterolu díky albuminu a LTP-1 v sekretu vejcovodu
- Zvýšení membránové fluidity + laterální pohyb cholesterolu
- V lipidových raftech cholesterol zůstává!
- Phospholipid scrambling díky zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  (aktivace PAK – odplavení cholesterolu albuminem)



- Změny pH a koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  v různých částech mužského i ženského reprodukčního systému
- pH: 6,8 (epididymis) – 4,4 (vagina) – 7 (děloha)
- V reprodukčním traktu ženy je vyšší pH, vyšší koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  a vyšší koncentrace albuminu
- Alkalinizace intracelulárního prostoru spermie – Hv1 (pH 6,94 ejakulované vs. 7,08 kapacitované spermie)
- Klíčová úloha PKA v regulaci pH spermie (CFTR, SLC26A3, ...A6, ...A8)
- Klíčová úloha vápníkových iontů v kapacitaci: součást řady signálních drah, rovnováha v koncentraci vně a uvnitř spermie,  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin spouští hyperaktivovanou motilitu spermií
- Vápníkové transportéry ve spermii: membránová  **$\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áza** a  **$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -výměník**, **CatSper vápníkový kanál** v bičíku (aktivován progesteronem, aktivace dráhy cAMP/PAK), **IP3R** v krčku a akrosomu, **RYA** v krčku, **SERCA2** v akrosomu a středním oddílu, vápníková pumpa **SPCA** v akrosomu.
- ROS v kapacitaci spermií: aktivace adenylcyklázy, oxidace cholesterolu (a vyplavení z membrány), aktivace tyrosinfosfatázové aktivity, oxidace thiolových skupin proteinů, atd. Nejreaktivnější peroxynitrit a peroxid vodíku. Spermie si „vyrábí“ ROS samy anebo ROS pochází z leukocytů. Spermie jsou na ROS velmi citlivé (malý objem a přitom velké množství cytoplazmy) a mohou být poškozeny - **apoptóza**.

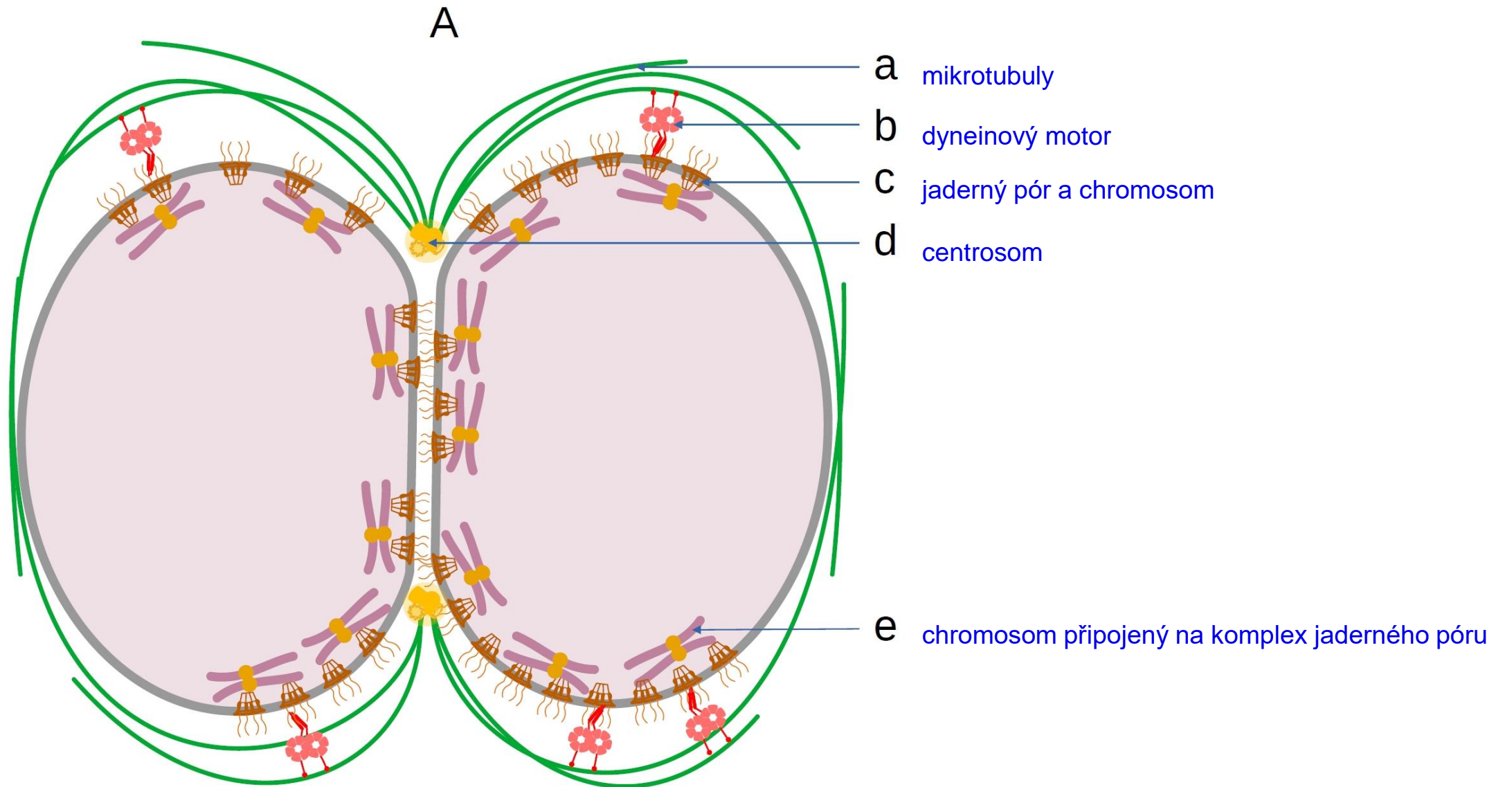
- Kapacitace je spuštěna společným působením koncentrace  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS a změn ve složení membrány
- Alkalizace intracelulárního prostředí různými mechanismy
- cAMP, aktivovaná PKA
- AKAP (A-kinázu kotvící proteiny, typ 3 a 4) zabezpečí zacílení fosforylace
- Exchange proteins (EPAC1 a 2) v hlavičce spermie, cAMP
- Fosforylace tyrosinu (ovlivnění intracelulárního pH)
- Chaperon Hsp90 a jeho kochaperon Cdc37 regulují aktivitu další kináz (ERK1/2 a p38)
- Membránový potenciál je -36mV u nekapacitované a -60mV u kapacitované lidské spermie (hromadění cAMP)
- Hyperaktivní pohyb spermií – vyšší rychlost, větší amplituda vlnění, kruhový pohyb, ovlivněn membránovým potenciálem, intracelulárním pH a intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  (Ksper, Hv1, CatSper). Nejprve aktivace kanálu Dsper/TRPV4 vede k depolarizaci membrány spermie, což podpoří funkci Hv1 a CatSper a vede k hyperaktivaci spermie.
- Časový průběh kapacitace: spermie kapacitují „po skupinách“, což vede ke konstantní frakci kapacitovaných spermií, spermie nevyužité pro oplození podléhají apoptóze a jsou fagocytovány 😊

# PRŮBĚH OPLOZENÍ

- Interakce mezi kapacitovanou spermií a komplexem kumulus-oocyt (humorálně aktivní – progesteron, prostaglandiny, cytokiny – **chemotaxe** a **chemorepulze**)
- *In vivo* ve vejcovodu
- **Úzké časové okno pro oplození!!!** (vitalita spermie max. 140 hodin, ideální doba pro oplození do 48 hodin od ejakulace, spermie s rychlým progresivním pohybem + vitalita oocytu)
- Spermie ve vejcovodu – očištěné, selektované, kapacitované, vázané na řasinkový epitel vejcovodů
- Akrosomová reakce – aktivace vazbou spermie na receptory v zona pellucida a současně vazbou progesteronu na jeho receptor na spermii (předtím akrosom stabilizován vazbou přes CD46 na integrin); zahrnuje 1) zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  2) aktivace fosfolipázy C 3) produkce IP3/DAG 4) uvolnění gelsolinu 5) depolymerizace vláknitého F-aktinu 6) monomerní G-aktin 7) IP3 otevře  $Ca^{2+}$  vnější akrosomové membrány, a sníží tak obsah  $Ca^{2+}$  v akrosomu 8) aktivace  $Ca^{2+}$  dependentního  $Ca^{2+}$  kanálu v cytoplazmatické membráně zvýší obsah  $Ca^{2+}$  ve spermii 9) to spolu s DAG aktivuje PKC a vede k akrosomové reakci

- Interakce spermie s oocytem je umožněna depolymerací F-aktinu, kdy splyne vnější akrosomová membrána s cytoplasmatickou membránou za vzniku pórů a rozpuštění membrán – odhalí vnitřní akrosomovou membránu, kde je vázán enzym **akrozin** a proteiny umožňující penetraci oocytu
- Pevnou vazbu spermie na zona pellucida zajišťuje řada různých ligandů, hlavně **ZP2** (druhově specifické!)
- Průnik spermie zajištěn mechanicky, působením akrosomových proteáz a vazbou na ZP2
- Vazbu spermie na oolemu umožňuje řada receptorů na ní (**JUNO**), na které se váže celá řada proteinů přítomných v membráně spermie (např. IZUMO1)
- Po splynutí membrán oocytu a spermie je spermie internalizována – **aktivace oocytu**
- Hlavička spermie – mužské prvojádro, centrioly – do další generace bb. embrya, mitochondrie aktivně zničeny, zbytky spermie autofagovány
- V oplozovaném oocytu osciluje intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  (kompartmentově i časově, 1x za 30-60 min) díky **CICR** (IP3 a RYR v ER), klíčovou roli hraje fosfolipáza C zeta asociovaná k vnitřní akrosomové membráně, ale také cGMP, NADP, NO

- Blok proti polyspermii zajišťuje především **kortikální reakce**, i když také Zn ionty mohou distančně blokovat spermie blízke oocytu.
- **Kortikální granula** (proteázy, glykosidázy, lektiny, Zn ionty, aj) pod cytoplazmatickou membránou zvyšují mechanickou pevnost zona pellucida a odstraňují receptory pro spermie v zoně – 10 sekund po oplození, později štěpení ZP2 ovastacinem, deglykosylace ZP3, zesílení glykanů lektiny a inkorporace Zn do zony
- Původní membrána tvoří měchýřky pokryté receptorem JUNO, je nahrazena membránou z kortikálních granul, měchýřky vážou nadbytečné spermie
- **Děje před sjednocením parentálních genomů** zahrnují vývoj prvojader (6-14 hodin od splynutí gamet, reprogramování genomu a S-fáze cca 7-9 hodin od splynutí gamet), reprogramování genomu (aktivní demethylace DNA v mužském prvojádře, pasivní v ženském, cca 4 hodiny pro splynutí gamet), centrioly ze spermie (oocyt je nemá!), sjednocení parentálních genomů (prvojádra na periférii zygoty, migrace do centra – dynein, mikrotubuly, komplexy jaderných pólů, centrosom, poté rozpad jaderných obalů, mitóza).



- Přínos gamet embryu je asymetrický: **spermie** – haploidní počet autochromosomů, X nebo Y chromosom, centrioly, proteiny, RNA, aktivuje přeměnu oocyty v zygotu a zygoty v časné embryu, **oocyt** - haploidní počet autochromosomů a X chromosom, cytoplasma, zásoba ribonukleových kyselin pro první tři dny vývoje, enzymy, mitochondrie, organely.



# **Fyziologie těhotenství a porodu**

Marie Nováková

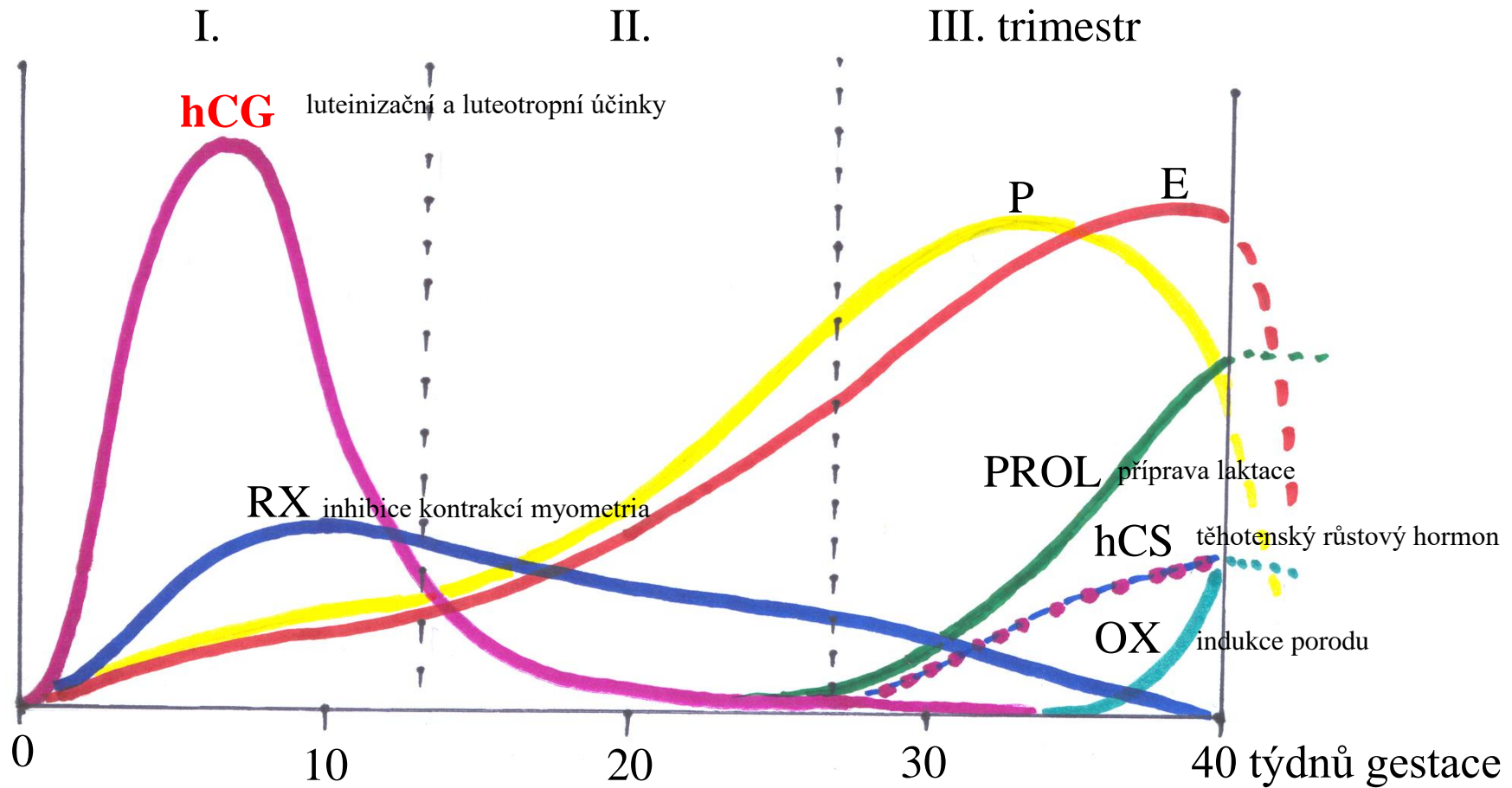


# HORMONÁLNÍ PROFIL GRAVIDITY

*Corpus luteum graviditatis, placenta* (8. týden!!!)

E, P, relaxin

hCG, E, P, hCS



Placentární – maternální – fetální zdroj

# INDUKCE PORODU

maternální  
placentární  
fetální

$P > E \longrightarrow E > P$

