

Savčí oocyt – nový pohled na staré dogma?

Josef Fulka

O samičí zárodečné buňce savců — vajíčku (oocytu) se nahromadilo v posledních třech desítkách let množství zásadních poznatků, a to nejen proto, že zastává zcela nezastupitelnou úlohu v přirozené reprodukci, ale také pro jeho uplatnění při produkci embryí *in vitro*, metodě hojně užívané v humánní medicíně, ale i při realizaci šlechtitelských programů u hospodářských zvířat. Klíčové místo mají oocyty také při rozpracování nových biotechnologií, včetně klonování, kde dosud jedině ooplazma (cytoplazma vajíčka) dokáže s větším či menším úspěchem indukovat reprogramaci přenášeného jádra embryonální či somatické buňky. Díky některým výjimečným vlastnostem našel savčí oocyt své místo i při studiu takových pochodů, jako jsou např. buněčný cyklus, a při studiu interakcí mezi cytoplazmou a jádrem. Pozornost se v těchto případech vztahuje převážně k oocytům, které již ukončily svůj růst nebo jsou v období krátce před jeho ukončením, neboť pouze z těchto oocytů může za běžných podmínek vzniknout nový jedinec.

Rozdíly v původu somatické a zárodečné buňky

Méně pozornosti bylo věnováno studiu zaměřenému na původ savčího oocytu a raným stádiím jeho vývoje. Z každé učebnice embryologie a reprodukční fyziologie se můžeme dovědět, že předchůdce savčího oocytu vzniká již ve velmi časném stadiu embryonálního vývoje jedince. Většina údajů pochází z experimentů prováděných na myši, ale lze je v základních rysech považovat za platné i pro ostatní savce. Liší se jen v časové posloupnosti a v délce trvání. Vzhledem k délce březosti, která trvá u myši okolo 20 dnů, postupuje u ní preimplantační i postimplantační vývoj rychleji, než u savců s délkou březosti 280 dnů (např. u skotu, koně ad.). Postupně se daří také objasňovat unikátní původ zárodečných buněk. Ty se na rozdíl od somatických buněk neodvozuji od žádného ze tří základních zárodečných listů (mezoderm, ektoderm a endoderm) utvářených dramatickým přesunem celých skupin buněk blastocysty, a to přibližně po dosažení 5 až 6 dnů stáří (myš). Jen pro hrubou orientaci, z vnějšího

zárodečného listu (ektodermu) se diferencují mimo jiné kožní epidermální buňky a buňky centrální nervové soustavy, ze středního (mezodermu) kostní dřev, ledviny, erytrocyty a obličejové svaly, a konečně z vnitřního (endodermu) vznikají tkáň tvořící základ trávicí soustavy a respiračního aparátu. V té době zde nejsou ještě náznaky toho, že by z některých buněk mohly v budoucnosti vznikat pohlavní buňky.

S rychle pokračující diferenciací se ale již o pouhý den později objevují u myši na rozhraní příštích embryonálních a extraembryonálních tkání (plodových obalů a placenty) buňky, které nazýváme primordiální zárodečné buňky (PGC — Primordial Germ Cells) a ty jsou vybaveny schopností změnit se postupně v oocyty či spermie (obr. 1). Okolo jejich vzniku zůstává stále řada nejasností, ale důležitá úloha při jejich diferenciaci se připisuje růstovým faktorům, zejména kostním morfogenetickým proteinům označovaným zkratkou BMP (Bone Morphogenetic Proteins). I další pochody podmiňující budoucí směřování této skupiny buněk provází množství hypotéz. S určitostí se však ví, že na počátku se vyskytují v ome-

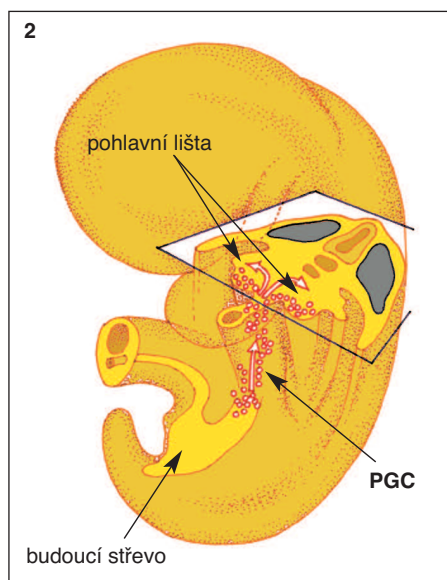
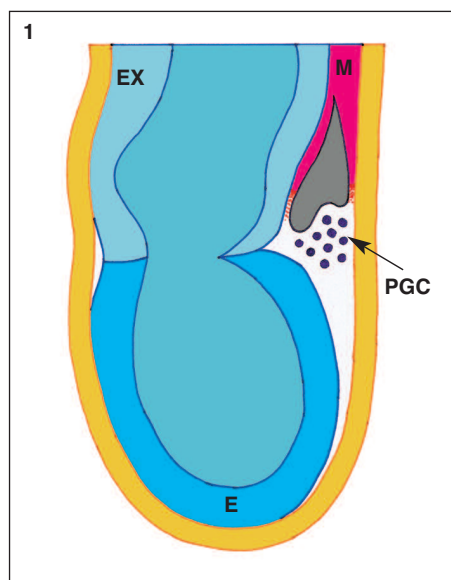
zeném počtu (několika desítek) a navíc nejsou zcela homogenní, jak dokazuje jejich rozdílné chování a odpověď k vnějším signálům, zejména pak k molekulám růstových faktorů. Část PGC odpovídá expresi genů pro povrchové proteiny *Fragilis* či *Stella* a především ty jsou považovány za skutečné předchůdce zárodečných buněk. O definitivním ustavení zárodečné linie pak svědčí i začínající možnost barvení na alkalickou fosfatázu, kterým se dá určit nejen jejich počet, ale i sledovat lokalizaci během následné migrace. K významným vlastnostem patří i vysoká mitotická aktivita, která vede ke zvýšení jejich počtu na několik tisíc, a to již před vstupem na místa konečného určení, do budoucích pohlavních žláz. Předtím však musí PGC podstoupit náročné tří- až čtyřdenní putování, včetně průchodu dutinou budoucího střeva (obr. 2). Na úrovni spekulací zůstávají názory o mechanismech odpovědných za řízení této migrace a o faktorech navádějících PGC po cestě k cíli.

Není také dosud zřejmé, zda všechny buňky doputují do budoucích gonád. Nelze tak ani vyloučit jejich prostup stěnou střeva, kde jim v novém prostředí buď hrozí zánik, nebo mohou kolonizovat některou z diferencujících se tkání. S jistotou se však ví, že se vlastnosti izolovaných pre- a postmigračních PGC liší jak v délce doby přežívání *in vitro*, tak i v reakci na přítomnost vybraných růstových faktorů. Těm jsou ostatně PGC vystaveny po celou dobu migrace, jejich výčet však stejně zůstává zatím jen velmi neúplný. I když časový interval vyhrazený pro migraci trvá zhruba čtyři dny, méně se během něho nejen početní stav, ale pod vlivem růstových faktorů také vlastnosti PGC. Navíc se nedávno podařilo dokázat, že po injekci do blastocysty (embryo ve stáří 5–6 dnů) se PGC nejen dále dělí, ale jsou již vybaveny schopností diferencovat se na buňky všech tkání a získávají tak charakter kmenových buněk — tím bylo pro ně vyhrazeno označení embryonálních zárodečných buněk (EGC).

Vstup do budoucího vaječnicku

V této fázi vývoje však mají primordiální zárodečné buňky k funkčnímu oocytu velmi daleko a čeká je velké množství zcela zásadních morfologických, strukturálních a metabolických proměn. Jejich skutečné dělení probíhá po vstupu do pohlavní lišty (seskupení buněk, ze kterých vznikají následně pohlavní žlázy), u myšičího embrya je to zhruba 11. den po oplodnění. Současně dochází u samic k přeměně párově uspořádaných pohlavních lišt na budoucí vaječnicku a v nich k velmi čilému mitotickému dělení zárodečných buněk, stále ještě silně se barvících na alkalickou fosfatázu. U samců v těchto místech vznikají varlata, ale pohlavní buňky (spermie) se tvoří podle zcela odlišné strategie. Ta však nebude předmětem další pozornosti. Krátce před kolonizací vaječnicku dosahuje populace zárodečných buněk zhruba počtu 5 000 a putování

Obr. 1 Postupná lokalizace primordiálních zárodečných buněk (PGC) na rozhraní embryonální (E), extraembryonální mezodermální (M) a extraembryonální tkáň (Ex) u 7denního embrya myši ♦ Obr. 2 Migrace PGC u 10–11denního embrya myši oblastí budoucího střeva a počátek vstupu do pohlavní lišty (předchůdce vaječnicku). Podle S. F. Gilberta (2003) kreslil S. Holeček



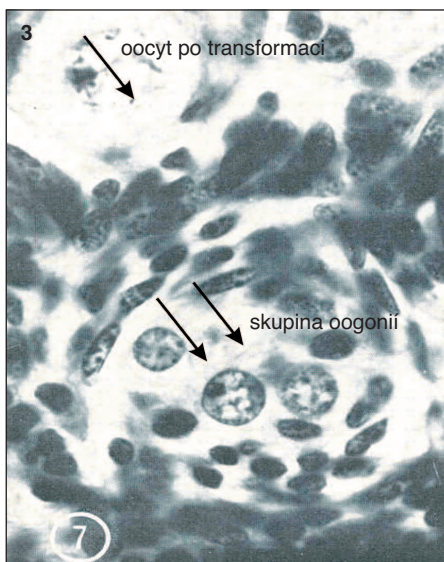
končí v jeho povrchové části. Postupně se mísí s mezodermálními buňkami a za stálého dělení vytváří hlubší oblast vaječníku. Početnost populace zárodečných buněk se dále dramaticky zvyšuje a dosahuje až několika milionů. Mezi 12. a 13. dnem po oplodnění mitotické dělení z blíže nedefinovaných příčin ustává. Obecně se soudí, že oogenie, jak se zárodečné buňky v tomto stadiu vývoje nazývají, vyčerpaly svoji mitotickou aktivitu a s ní spojenou schopnost syntézy DNA, která vždy předchází rozdělení buňky. Vstoupily tím na počátek klíčového a velmi složitého procesu, k přípravě meiotického (redukčního) dělení. To provázejí významné jaderné a cytoplazmatické změny, podmíněné aktivací řady genů. Jádro v té době má nezaměnitelnou podobu, zvanou zárodečný váček, s difuzně uspořádaným chromatinem a výrazným jádrem.

U myši trvá transformace celé populace oogenií v oocyty zhruba jen dva dny a končí na počátku poslední třetiny nitroděložního vývoje plodu. U jiných savců je průběh a ukončení transformace určen druhovou příslušností a u některých z nich zdaleka nebývají ukončeny ani v době narození. Mezi takové savce patří např. králík a křeček, ale také prase, u něhož se ještě pět týdnů po narození nacházejí vedle oocytů také skupiny oogenií, o nichž nevíme, zda se budou dále mitoticky dělit, nastoupí transformaci, nebo zaniknou (obr. 3). Relativně dlouhou dobu trvá transformace také u skotu, kde se její první známky objevují již po druhém měsíci březosti a k ukončení dochází teprve o tři měsíce později.

Osud oocytů ve vaječníku

Z pohledu reprodukce představuje ukončení transformace pro budoucnost oocytů jednu z klíčových událostí. Vzniklé oocyty jednak vstoupily do funkčního kontaktu se somatickými buňkami, ale především ztratily schopnost dále se dělit a tím zvyšovat početnost stávající populace. Ani množství histologických a histochemických studií na světelné a elektronoptické úrovni nepřineslo přesvědčivý důkaz o přítomnosti takových buněk, které by mohly kontinuálně zásobovat vaječník novými oocyty během dalších fází reprodukčního života samic savců. Naopak téměř ve všech studiích dochází ke vzácné shodě o trvalém ubývání počtu samičích zárodečných buněk (obr. 4). Bez ohledu na pokračující pokles zůstávají samice vybaveny relativně dostatečným počtem oocytů až do konečného zániku pohlavních funkcí. Pro člověka to např. znamená, že některé oocyty „čekají“ ve vaječníku ženy na naplnění reprodukčního poslání často i 40–50 let. U savců s kratším životním cyklem se doba čekání úměrně zkracuje a v souladu s ní klesá průběžně i počet oocytů přítomných ve vaječníku.

Čas od času se sice objevovaly v odborném tisku námitky zpochybnující dosud uznávanou „doktrínu“ o vzniku a zániku oocytů, ale předkládané argumenty nedosahovaly takové přesvědčivosti, aby vzbudily širší pozornost — reakce na podobné informace bývaly dost rozpačité, spíše ale vůbec žádné. Teprve nedávno publikovala skupina Jonathana Tillyho z Harvardu (*Nature* 2004, 428: 145–150) a později i rozšířený původní kolektiv (Cell 2005, 122: 303–315) zprávy o tom, že by vše, v co se věřilo o vzniku oocytů, mohlo být zcela jinak. Autoři ve svých pokusech popisují na

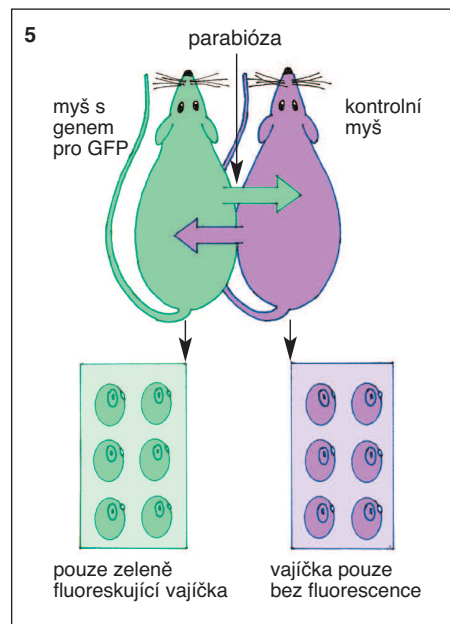
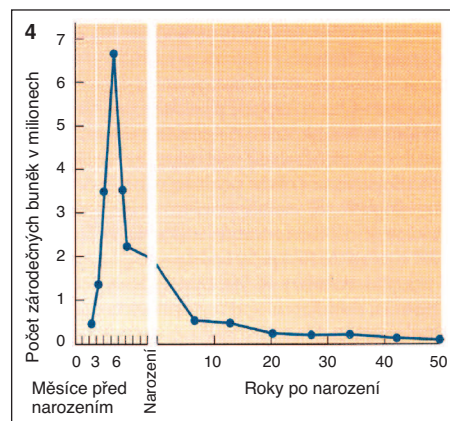


Obr. 3 Skupina oogenií ve vaječníku prasete 35 dnů po narození. V sousedství se již nachází oocyt ve vznikajícím folikulu. Foto z práce Fulka a kol. 1972

myších ovarích přítomnost specifických buněk, připomínajících svými vlastnostmi kmenové zárodečné buňky. Považují je tak za případné kandidáty schopné nahradit populaci oocytů, které zanikají přirozenými procesy (atresii), případně uměle vyvolanou ztrátou zárodečných buněk po podání busulfanu (farmaka toxického pro samčí i samičí zárodečné buňky). Svá tvrzení opírají o počty zanikajících a zdravých folikulů v ovarích různých starých myších samic a po vzájemném srovnání docházejí k závěru, že bez dalšího posilování populace zárodečných buněk ze záložních zdrojů by oocyty napočetané při narození pokryly jen velmi krátké období reprodukčního života.

Ve druhé publikaci jsou ve svých závěrech ještě odvážnější, když označují za zásobárnu budoucích oocytů tkáň bez přímé návaznosti na funkci vaječníku. Jako místo, kde předchůdci oocytů vznikají, označili kostní dřev. Ta podle jejich pozorování obsahuje mimo jiné i buňky s řadou znaků typických pro zárodečné buňky (Mvh, Dazi, Stella, Fragilis atd.). Autoři také došli k závěru, že injekční aplikace těchto buněk do krevního oběhu samic s eliminovanou folikulogenezi vlivem cyklofosfamidu nebo busulfanu nahrazuje ztrátu původních oocytů a vpravené buňky se údajně chovají jako předchůdci zárodečných buněk. Dokládají to i histologickým hodnocením vaječníků a nálezem řezů obsahujících folikuly ve všech stádiích vývoje. Správnost svých závěrů podporují i injekčním podáním izolovaných buněk kostní dřevě od transgenních jedinců s genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP). Po následném vyšetření vaječníků nacházeli u příjemců folikuly s GFP oocyty a považovali to za důkaz kolonizace vaječníků příjemce buňkami z injikované kostní dřevě dárce.

Není překvapující, že výsledky zveřejněné v tak vysoce ceněných časopisech vzbudily velkou pozornost a jak bývá obvyklé, vedly i k vyslovení odvážných názorů o významu pro humánní medicínu, mezi jinými i obnově folikulogeneze u žen po ozáření. Nechyběly ani spekulace o tom, že by u žen po transfúzi krve mohla vznikat vajíčka s genetickou výbavou dárce krve. Současně však s těmito spíše kuriózními před-



Obr. 4 Počet zárodečných buněk během nitroděložního a postnatálního života ženy. Nejvyšší hodnoty (7 milionů) jsou dosaženy okolo 6. měsíce těhotenství při končící transformaci oogenií v oocyty. K dramatickému poklesu zárodečných buněk dochází ještě před narozením a k pozvolnému snižování jejich populace až do konce reprodukčního života. Upraveno podle S. F. Gilberta (2003) ♦ Obr. 5 Ústavení společného krevního oběhu (parabiozy) mezi transgenní myši s genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP) a myši kontrolní. Výplach vejcovodu po ovulaci prokázal jednoznačně původ vajíček — zeleně fluoreskující pocházela od GFP transgenních samic a nefluoreskující od myši kontrolní. Výsledky jasně prokázaly neschopnost transformace buněk kostní dřevě na ovulující oocyt. Podle G. Vogela (2006) kreslil S. Holeček

stavami se objevily značně kritické hlasy. Vycházejí ze skutečnosti, že autoři výsledků formulovali své závěry na základě hodnocení oocytů, které neopustily vaječník a o jejich oplodnění a o vývojové schopnosti se neví zholna nic.

Bezprostřední reakce na zveřejněné výsledky se objevily až neočekávaně brzy, a to publikací článku v *Nature* (2006, 441: 1 109–1 114). Její autoři Karl Eggen s kolegy rovněž pracují na Harvardské univerzitě. Po uskutečnění vlastních originálních experimentů (také na myších) a po vyhodnocení výsledků jednoznačně zpochybnili vznik oocytů z buněk kostní dřevě nebo z periferní krve. Svě závěry vyvozují z elegantně provedených studií, ve kterých spojili pomocí parabiozy (krevní řečiště) transgenní

myši s genem pro GFP a myši s normálním genotypem (obr. 5). Po několikaměsíčním spojení a spolehlivém ustavení společného krevního oběhu mezi oběma samicemi nacházeli po stimulované ovulaci a výplachu vejcovodů pouze oocyty odpovídající genotypu dané samice. To znamená, že populace od dárců s genem pro GFP obsahovala pouze zeleně fluoreskující oocyty a naopak, z vejcovodů normálních jedinců nebyly získány oocyty se známkami fluorescence.

Ani další experimenty, ve kterých autoři podávali chemicky sterilizovaným příjemcům izolované buňky kostní dřene od dárců s genem pro GFP, nepotvrdily jejich kolonizaci a transformaci na oocyty. Ale ani tak jednoznačné výsledky se nevyhly kritickým připomínkám. Kritici postrádají důkladné vyhodnocení vaječníků a vylou-

čení, zda se v nich přece jen nenacházejí buňky připomínající buňky kmenové. Podle nich by jejich osud nemusel končit ovulací, ale mohly by poskytovat případnou, dosud blíže neurčenou podporu rostoucím a posléze ovulujícím oocytům. S přihlédnutím k současné úrovni poznání lze považovat také úvahy spíše za spekulace postrádající reálný základ.

I když jako model pro vyslovení základní představy o vzniku oocyty sloužila myš, mnoho argumentů dokazuje její platnost i pro převážnou většinu ostatních savců včetně člověka. Potvrdil to ve své monografii An Atlas of Human Prenatal Developmental Mechanics (Atlas prenatálního vývoje člověka) z r. 2004 i J. E. Jirásek z Ústavu péče o matku a dítě v Podolí v Praze. Také drtivá část komentářů z pera předních od-

borníků, které byly v návaznosti na téma oogeneze v poslední době zveřejněny, se přiklání k tradičnímu pojetí vzniku oocyty, i když někteří opatrnější kritici nevykládají nepředvídaná překvapení. Ta by se však mohla dotknout problematiky oogeneze spíše jen okrajově a zahrnovat pouze specifické případy, jako je např. vznik oocytů z embryonálních kmenových buněk či dalších podobných typů buněk nacházejících se např. v kůži.

Je třeba připomenout, že problematiku zárodečných buněk není jednoduché postihnout v takové šíři, aby si čtenář mohl vytvořit ucelenou představu o její složitosti. Proto zveřejňované příspěvky, nevyjímaje tento pokus, nabízejí jen neúplný výčet událostí, které se na původu, růstu a vůbec na osudu oocytů podílejí.

K statolitové teorii profesora Bohumila Němca

„Byl jsem v zimě r. 1900 na návštěvě u prof. Vejdovského a hovořili jsme o statických orgánech... Když jsem vyšel na ulici do chladného podzimního vzduchu, problesklo mi hlavou, že takovým statickým orgánem u rostlin jsou buňky, které obsahují přepadavá škrobová zrníčka. Znal jsem takové buňky z různých orgánů rostlinných, věděl jsem, že jsou umístěny právě v rostlinných částech, v nichž je tíže recipována (vrcholy kořenů a koleptil trav), měl jsem řadu pokusů, jimž chyběla jenom syntéza jednotné myšlenkou. Nemohl jsem spát rozčilenou touhou, abych provedl další pokusy a revidoval dosavadní.“
(Vzpomínky, Archiv AV ČR 2002)

Alexander Lux, Olga Votrubová

Autoři věnují honorář Nadaci Živa

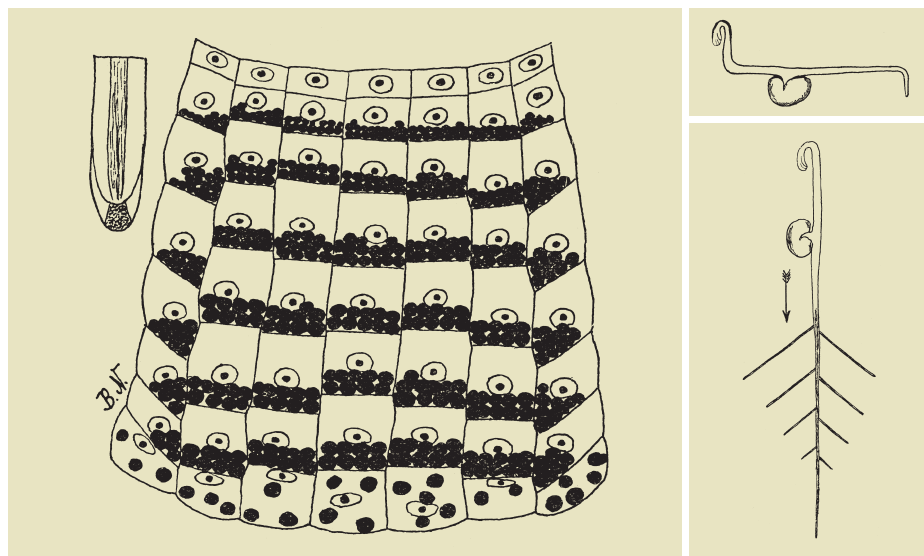
K najznámejším objavom prof. Bohumila Němca patrí statolitová teória formulovaná v dvoch publikáciách z r. 1900. Tato teória položila základy pre vysvetlenie reakcie rastlín na pôsobenie zemskej tiaže, ktorá umožňuje rastlinám orientáciu v priestore a správny rast ich orgánov, koreňov smerom do stredu Zeme (pozitívne geotropicky) a stoniek opačným smerom (negatívne geotropicky).

Na prelome 19. a 20. storočia sa nahromadil dostatok poznatkov, aby sa mohli formulovať predstavy o schopnostiach rastlín registrovať podnety prichádzajúce z vonkajšieho prostredia a reagovať na ne. Prof. Němec sa okrem mnohých iných problémov zaoberal aj týmito otázkami a svoje úvahy zhrnul v práci O smyslové a reflektivní činnosti rostlín, publikovanej v r. 1901. Hlav-

nou témou jeho prác z tejto oblasti sa stal geotropizmus (gravitropizmus). Je viac ako pravdepodobné, že bol pritom ovplyvnený svojimi predchádzajúcimi štúdiami z oblasti zoológie. Svoju vedeckú dráhu začal totiž ako žiak významného českého zoológa prof. F. Vejdovského, známeho zavádzaním nových pokrokových metód do štúdia živočíchov. Pod jeho vedením sa zaoberal štú-

diom kôrovcov (korýšů), živočíchov s jednoduchými statickými orgánmi, ktoré slúžia k priestorovej orientácii práve na základe vnímania polohy tela voči zemskej tiaži. V podstate ide o dutiny vyplnené tekutinou, v ktorých sa nachádzajú statolity, telieska s vyššou hmotnosťou, ktoré pri zmene polohy tlačia na určité oblasti buniek schopných na tento tlak reagovať. Němec sám uvádza v svojej obsiahlej štúdiu Ueber die Wahrnehmung des Schwerkraftes bei den Pflanzen (O vnímaní gravitace u rostlin) z r. 1901: „Vlastní pozorování mě přivedla k poznání, že buňky s tělísky, která se chovají jako specificky těžší nebo lehčí tělesa v kapalině, jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny. Starší studie sluchových orgánů nižších živočichů, zejména korýšů, ve mně vzbudily myšlenku, že toto by mohla být zařízení umožňující rostlinám percepci směru působení zemské tíže. Posléze byla správnost této myšlenky potvrzena experimentálně, což jsem předběžně uvedl ve vztahu ke kořenům (práce Němec, B.: Die reizleitende Strukturen bei den Pflanzen. Biol. Centralblatt, 1900) a později publikoval jako předběžné sdělení (Němec, B.: Ueber die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft, 1900).“ (Preklad O. Votrubová.)

V rovnakom čísle tohto časopisu bola publikovaná aj podobná práca Němcovho súčasníka, významného rakúskeho anatóma Gottlieba Haberlandta (Über die Perzeption des geotropischen Reizes), ktorá prišla do redakcie len o desať dní neskôr ako práca Němca a ktorá sa zaoberá predovšetkým geotropizmom stoniek. Haberlandt tu už cituje Němcovu prácu z Biol. Centralblatt a uvádza: „Němcova správa ma primála k tomu, aby som svoje, dovoľal kusé pozorovania tohto javu už teraz v krátkosti publikoval.“ (Preklad O. Votrubová.) Němec aj Haberlandt prišli k zhodnému záveru: ako statolity fungujú amyloplasty — plastidy so



Vľavo schéma pozdĺžneho rezu koreňovou špičkou (kolumela vybodkovaná — vytečkovaná) a pozdĺžny rez kolumelou so škrobovými zrnami (čierne telieska) v spodnej časti buniek, nad nimi bunkové jadrá ♦ Vpravo hore klíčna rastlina bôbu (Vicia faba) v horizontálnej polohe, ktorá ukazuje ohyb koreňa smerom dole a stonky smerom hore ♦ Vpravo dole klíčna rastlina bôbu vo vertikálnej polohe s koreňom, ktorý rastie pozitívne geotropicky, a stonkou, ktorá rastie negatívne geotropicky. Originály B. Němca