

Zrání a oplození oocytů in vitro

Ing. Jaroslav Kalous, CSc.

Laboratoř biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR

Liběchov

Důvody pro *in vitro* zrání oocytů:

- a) Studium průběhu meiotického dělení (aktivace genů, exprese a funkce proteinů zapojených do regulace meiózy)
- b) Získání oocytů s ukončeným meiotickým zráním pro následné *in vitro* oplození

Důvody pro *in vitro* oplození oocytů:

- a) Získání časných embryí pro asistovanou reprodukci
- b) Studium průběhu mitotického dělení časného embrya (aktivace genů, exprese a funkce proteinů zapojených do regulace mitózy)

Zrání a oplození oocytů savců v podmínkách *in vitro*

In vitro zrání oocytů – podmínky, při kterých jsou oocyty schopné během *in vitro* kultivace přejít z profáze I. meiózy (1st meiotic arrest) do stádia metafáze II. meiotického dělení (2nd meiotic arrest)

In vitro oplození oocytů – podmínky zabezpečující úspěšné *in vitro* oplození oocytů spermii stejného druhu

In vitro kultivace embryí – kultivace časného embrya ze stádia oplozeného oocytu až do stádia blastocysty v podmínkách *in vitro*

Vytvoření podmínek pro *in vitro* zrání oocytů savců

Kultivační médium

- syntetická média obsahující pufry (Hepes, hydrogličitan), aminokyseliny, růstové faktory, makromolekulární složku (sérum, PVA), antibiotika
- pH kultivačního média – neutrální (pH 7 – 7,4)
- osmolarita kultivačního média 275 – 290 miliosmolů

Inkubátor (termostat)

- stabilní teplota (pro kultivaci oocytů 37,5 – 39,5 °C)
- stabilní složení kultivační atmosféry (5% CO₂ + vzduch)

Stádia meiotického zrání oocytů

Během meiotického zrání oocyt získává schopnost být oplozen. Zrání oocytů se účastní různé signální dráhy, které se se podílí na aktivaci maturation-promoting faktoru (MPF), jehož aktivita katalyzuje vstup do M-fáze meiózy I and meiózy II.

Oocyty se v ováriu nacházejí v profázi 1. meiózy.

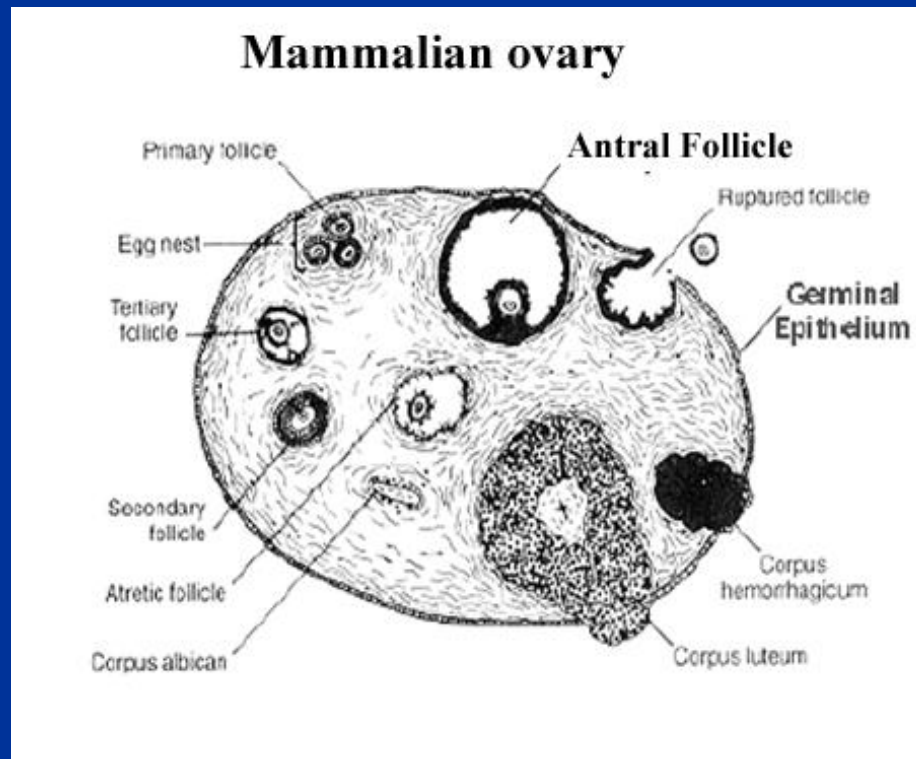
Meiotické zrání oocytů obratlovců zahrnuje:

- (1) znovuzahájení meiózy I jehož součástí je rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown [GVBD]), kondenzace chromatinu a formování vřeténka I-meiózy,
- (2) přechod mezi meiózou I and meiózou II, inhibici S-fáze,
- (3) blok meiózy v metafázi II způsobený aktivitou cytostatického faktoru (CSF). Meióza II je dokončena po oplození zralého oocytu nebo aktivací oocytu.

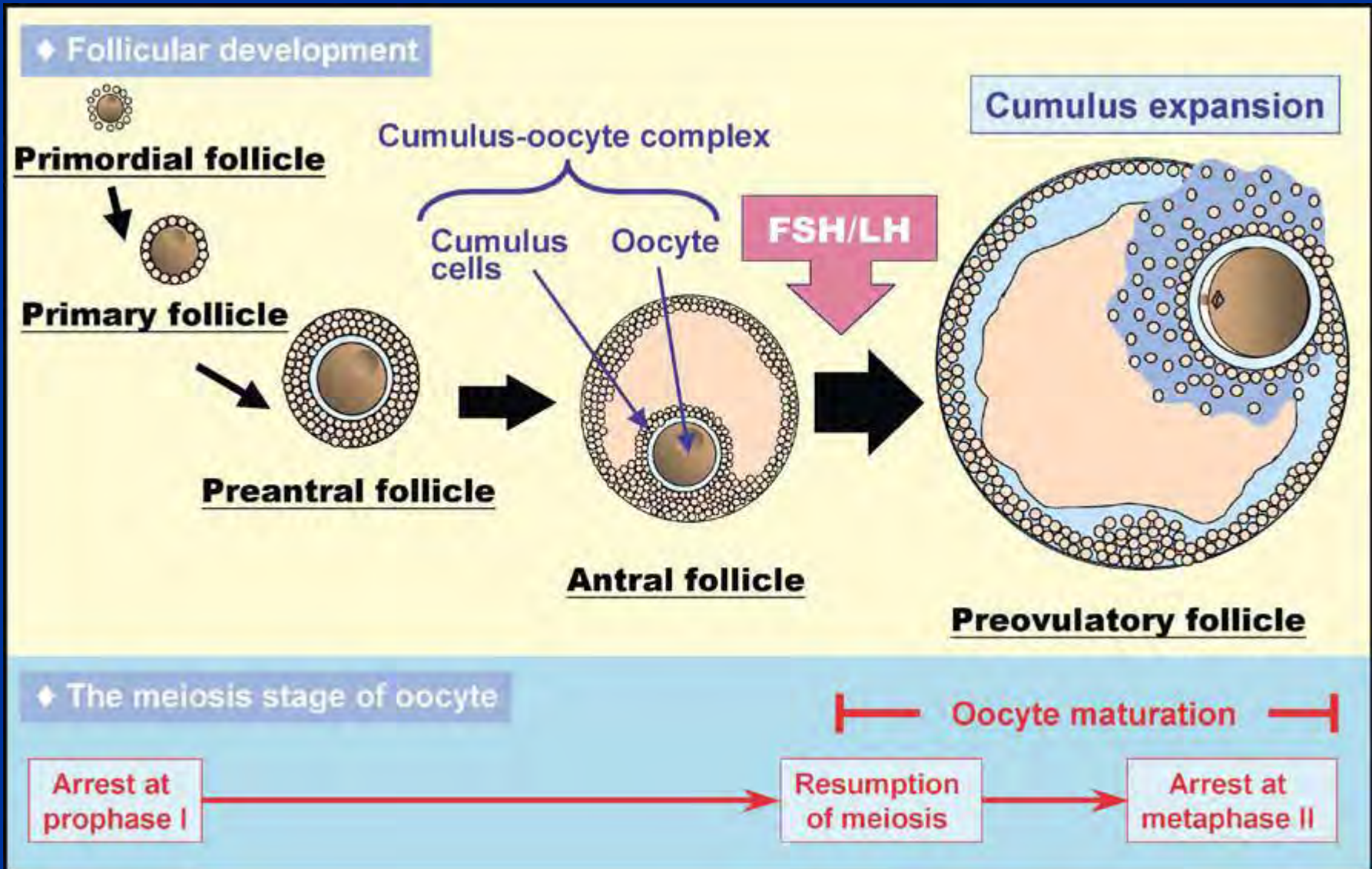
Zdroj oocytů pro in vitro kultivace

Oocyty jsou získávány z antrálních folikulů ovárií zvířat.

Izolované oocyty jsou ve stádiu zárodečného váčku (profáze I. meiózy)



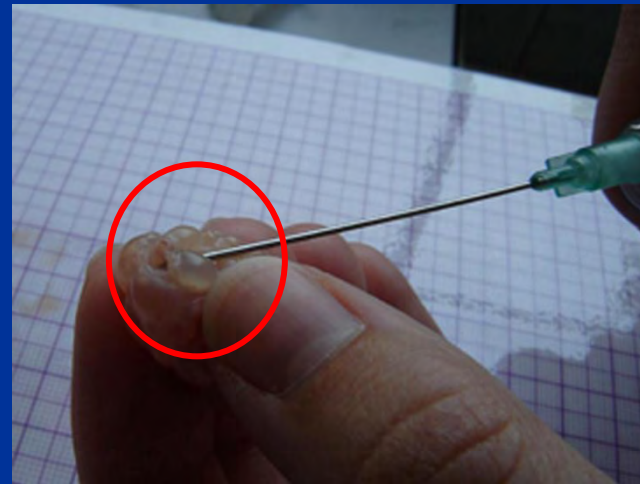
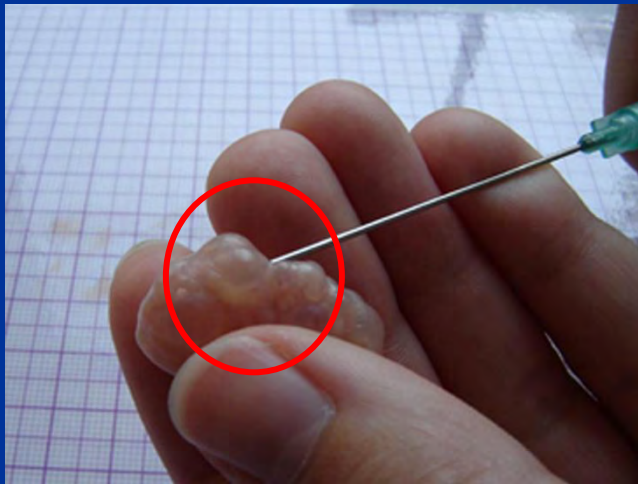
Follicular development and oocyte maturation



Izolace oocytů



Ovária skotu



Ovária prasat

Bezobratlí – častý zdroj oocytů
v biologickém výzkumu

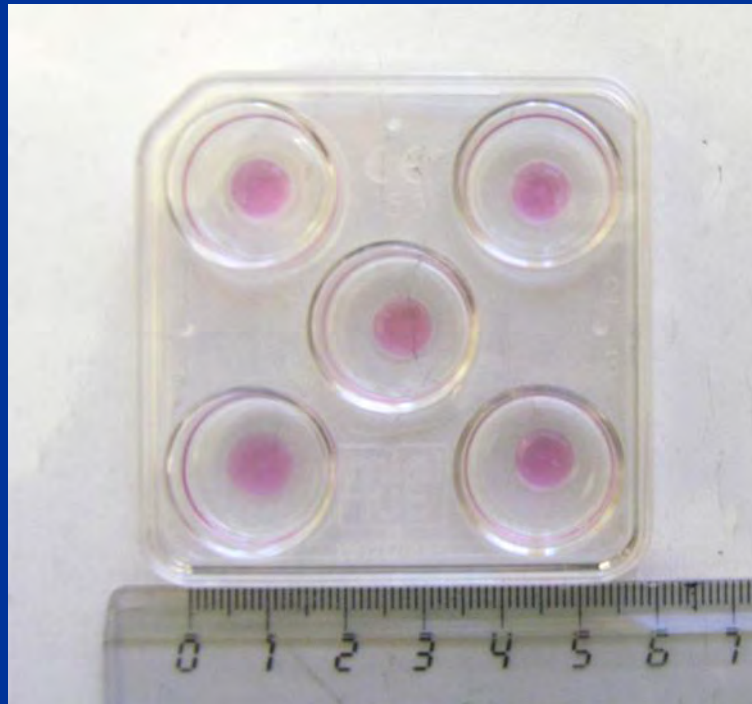


Vybavení laboratoře

Binokulární lupa



Kultivační miska

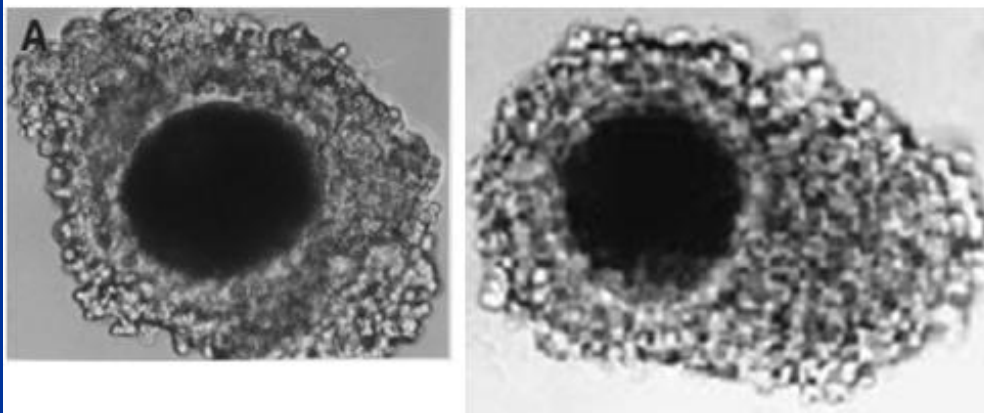


Inkubátor (termostat)

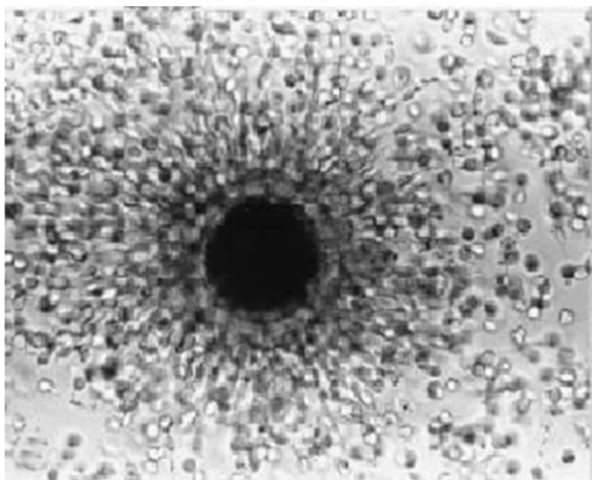




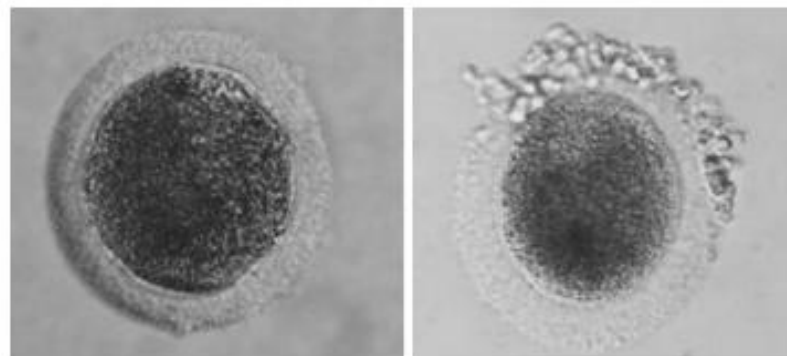
Oocyty s kompaktním kumulárním obalem



Oocyt s expandovanou kumulární vrstvou

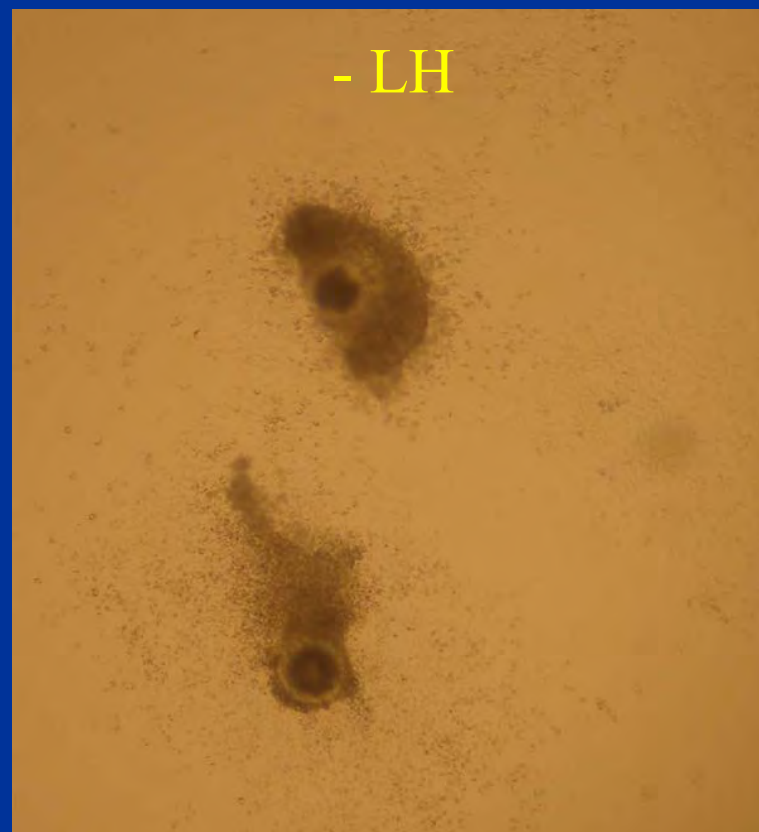
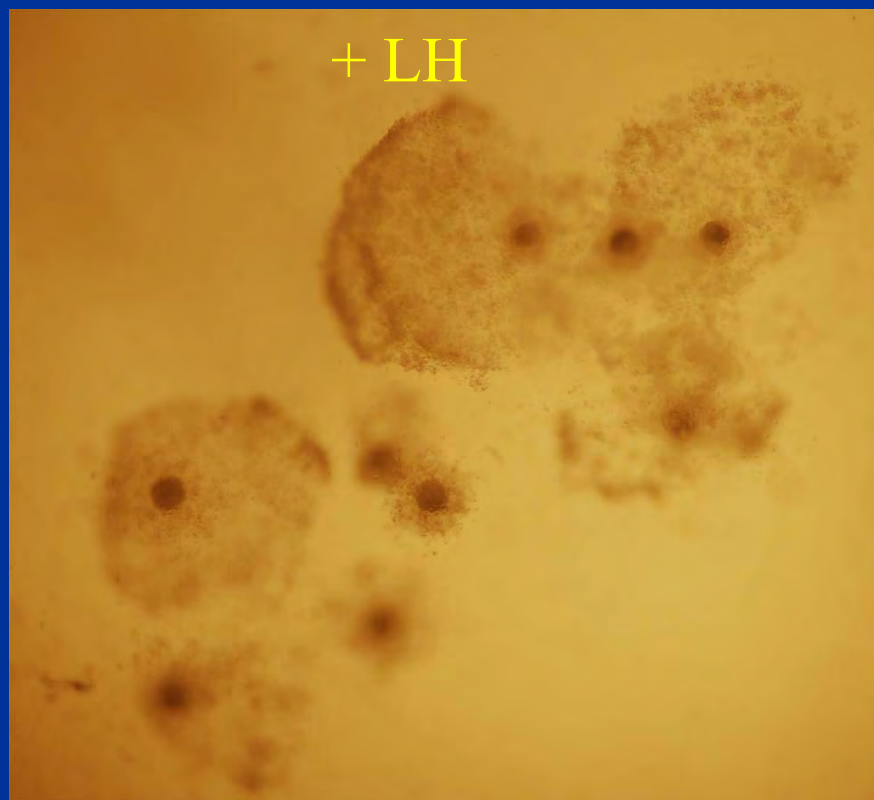


Oocyty bez kumulární vrstvy



In vitro kultivace oocytů prasete (44h)

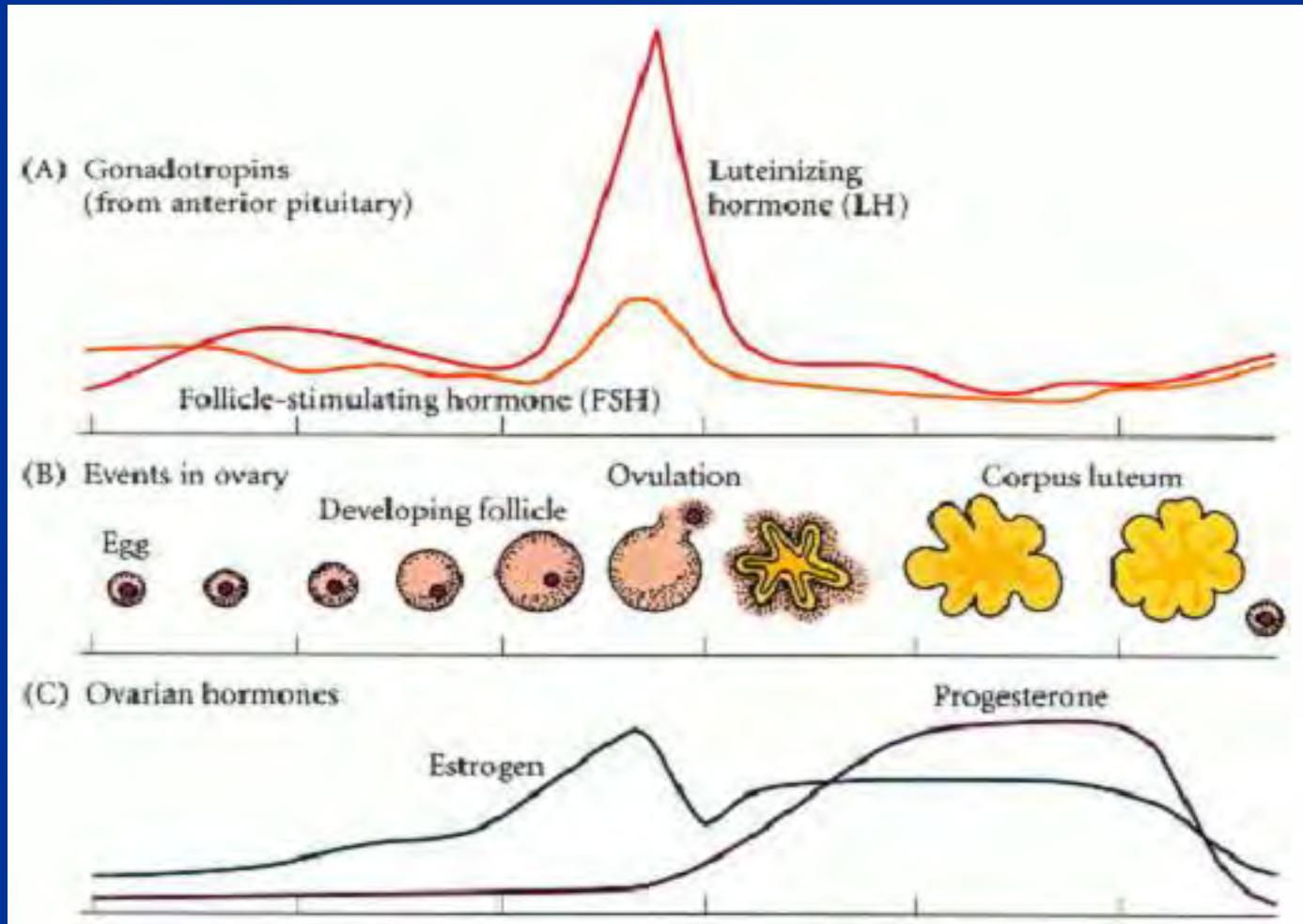
(účinek luteinizačního hormonu [LH]
navodí expanzi kumulární vrstvy)



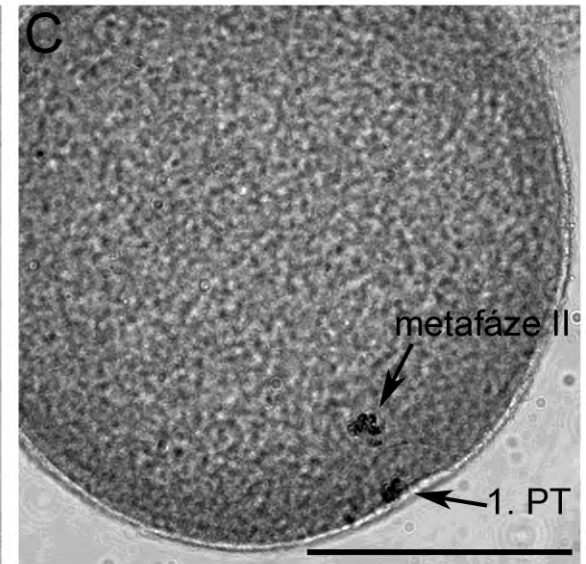
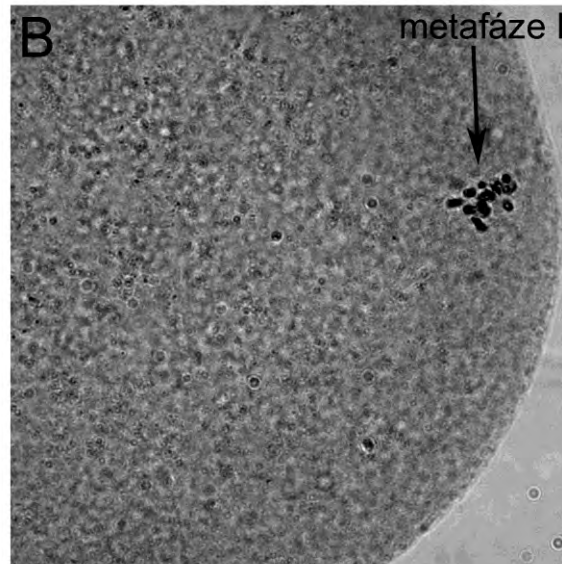
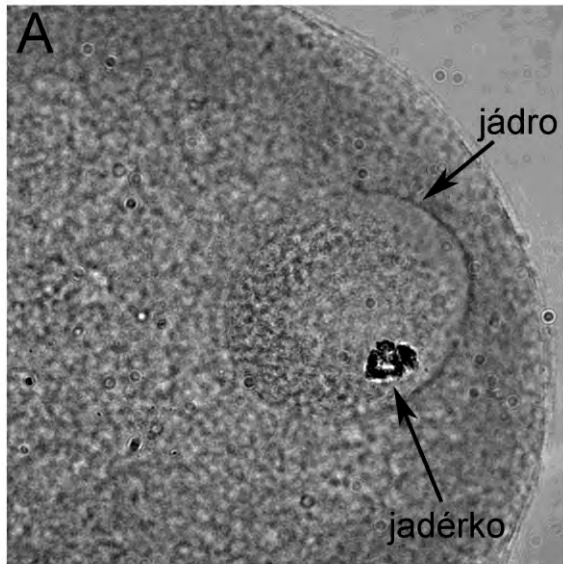
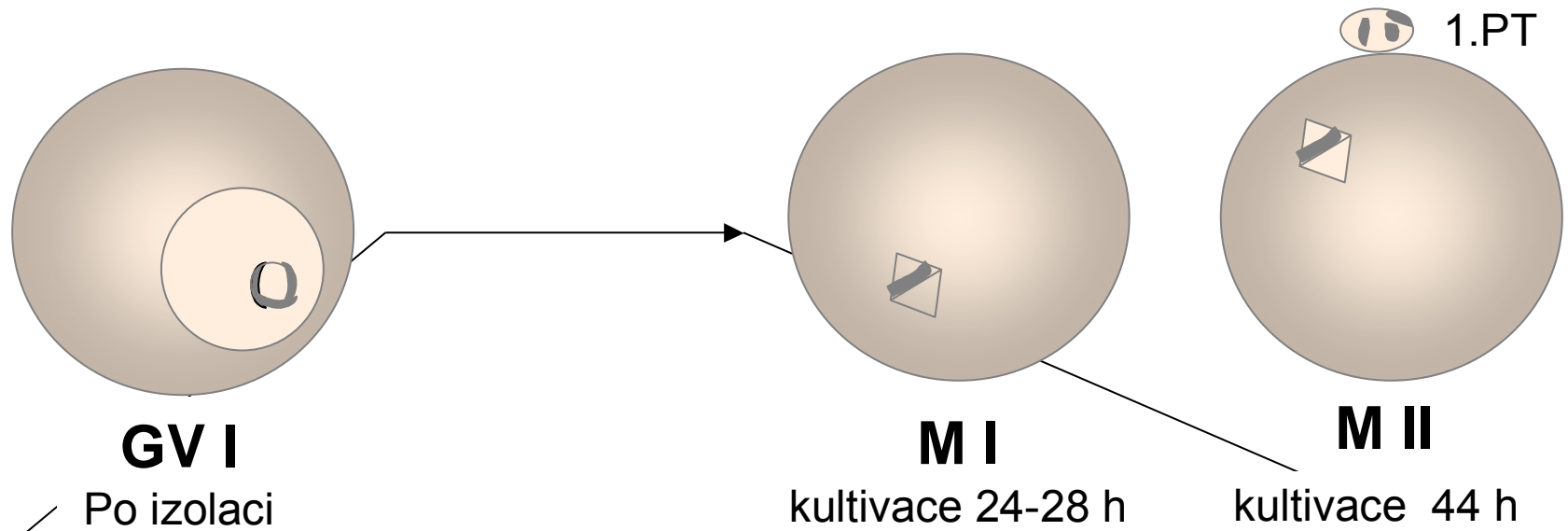
Spontánní versus indukované znovuzahájení meiózy

- LH se váže na LH receptory na membráně granulózních buněk, které následně produkují EGF-like molekuly. EGF-like faktory obsazují receptory na kumulárních buňkách, indukují expanzi kumulu a znovuzahájení meiózy oocyty
- V savčích oocytech vyňatých z folikulu a kultivovaných *in-vitro* probíhá spontánní znovuzahájení meiózy, které může být potlačeno inhibitory fosfodiesterázy (isobutylmethylxanthin - IBMX), stimulátory tvorby cAMP (forskolin) nebo nehydrolyzovatelnými analogy cAMP (dibutyryl cAMP)

LH jako primární stimulus pro znovuzahájení meiózy *in vitro*



Oocyt prasete během *in vitro* zrání



From LH to resumption of meiosis

LH peak

LHR on granulosa cells

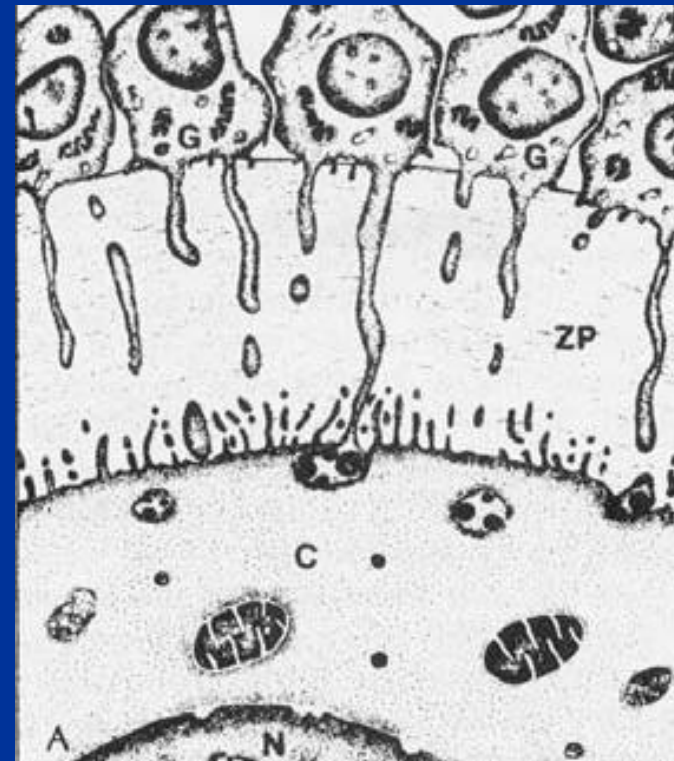
EGF-like molecules

Cumulus cells and oocyte complex

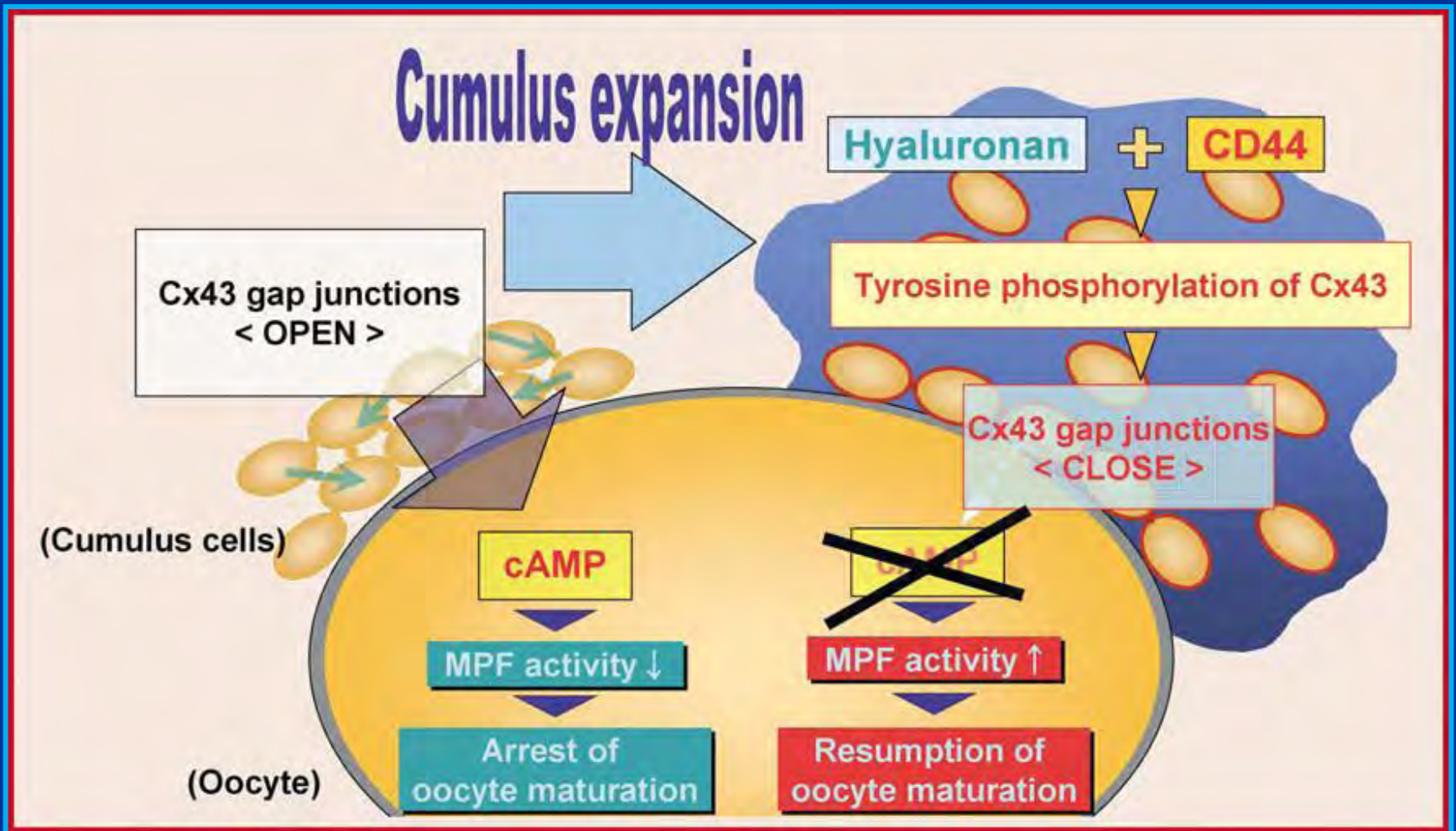
Cumulus expansion

resumption of meiosis
GVBD

Komunikaci kumulárních buněk s oocytem zajišťují cytoplasmatické výběžky kumul. buněk, které procházejí zónou pellucidou (ZP) do cytoplasmy oocytu.

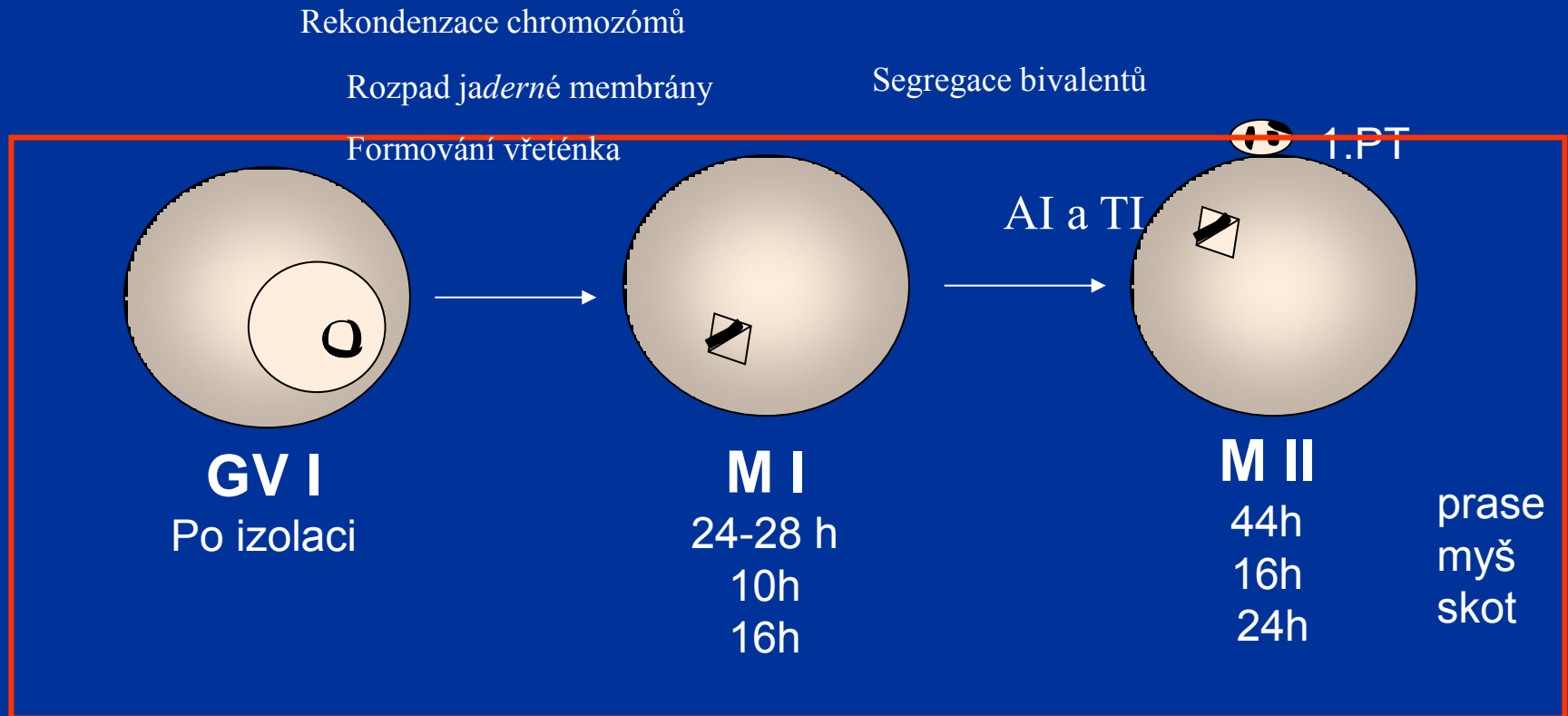


CUMULUS-OOCYTE INTERACTIONS DURING OOCYTE MATURATION

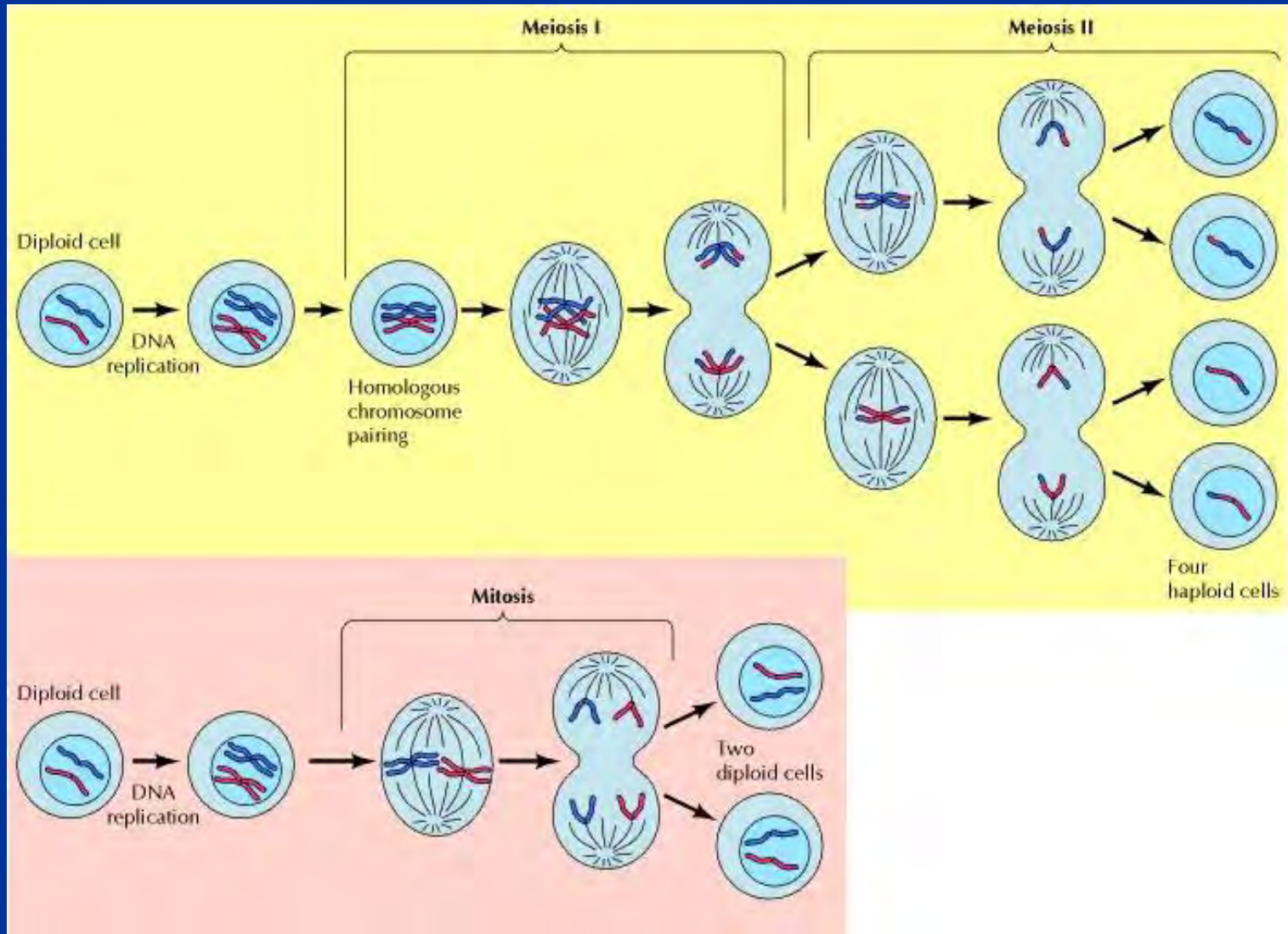


In vitro zrání oocytů savců

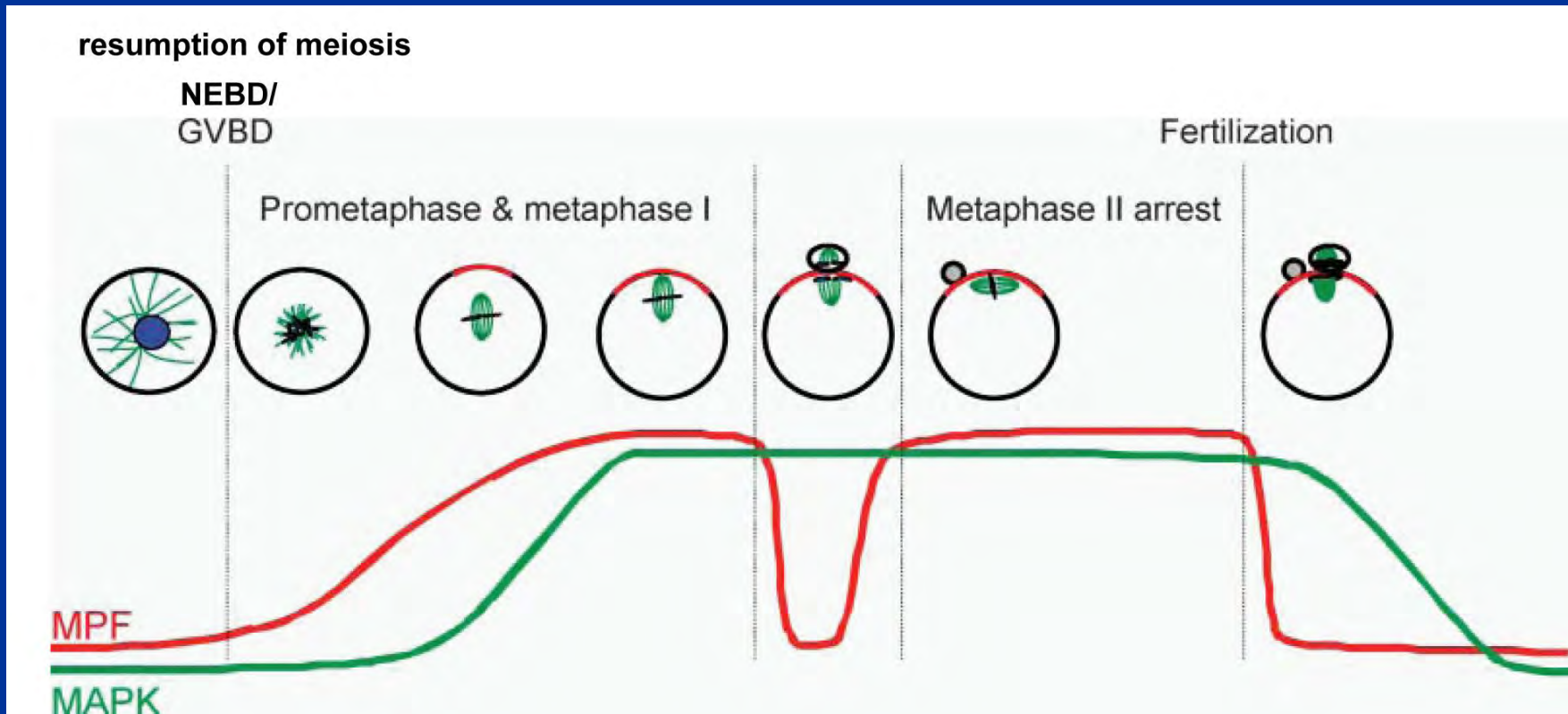
Časový průběh meiózy oocytů
různých druhů savců se liší



Porovnání průběhu meiózy a mitózy

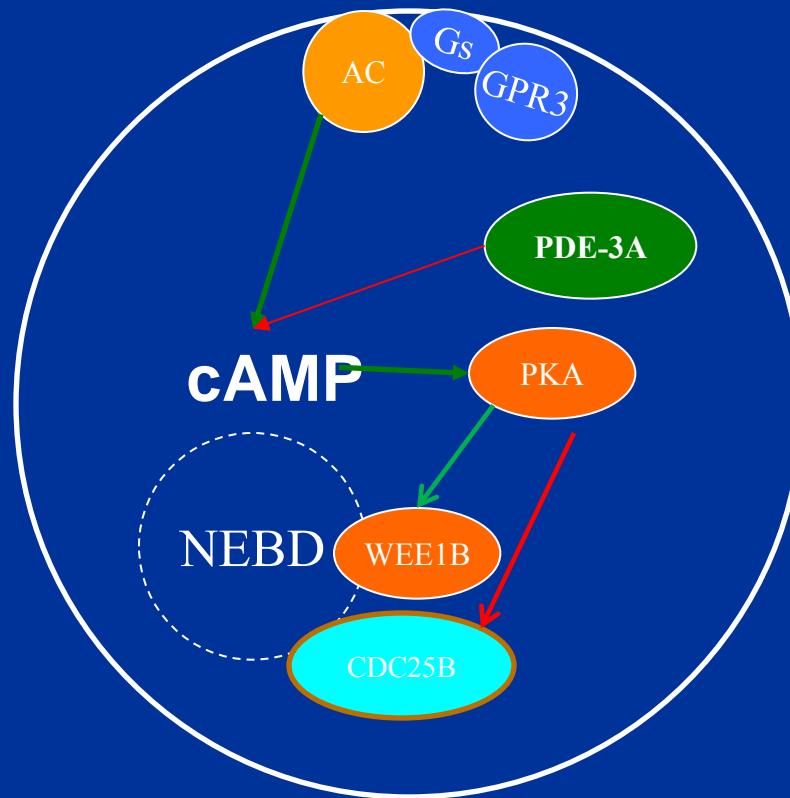


Přehled průběhu meiotického zrání

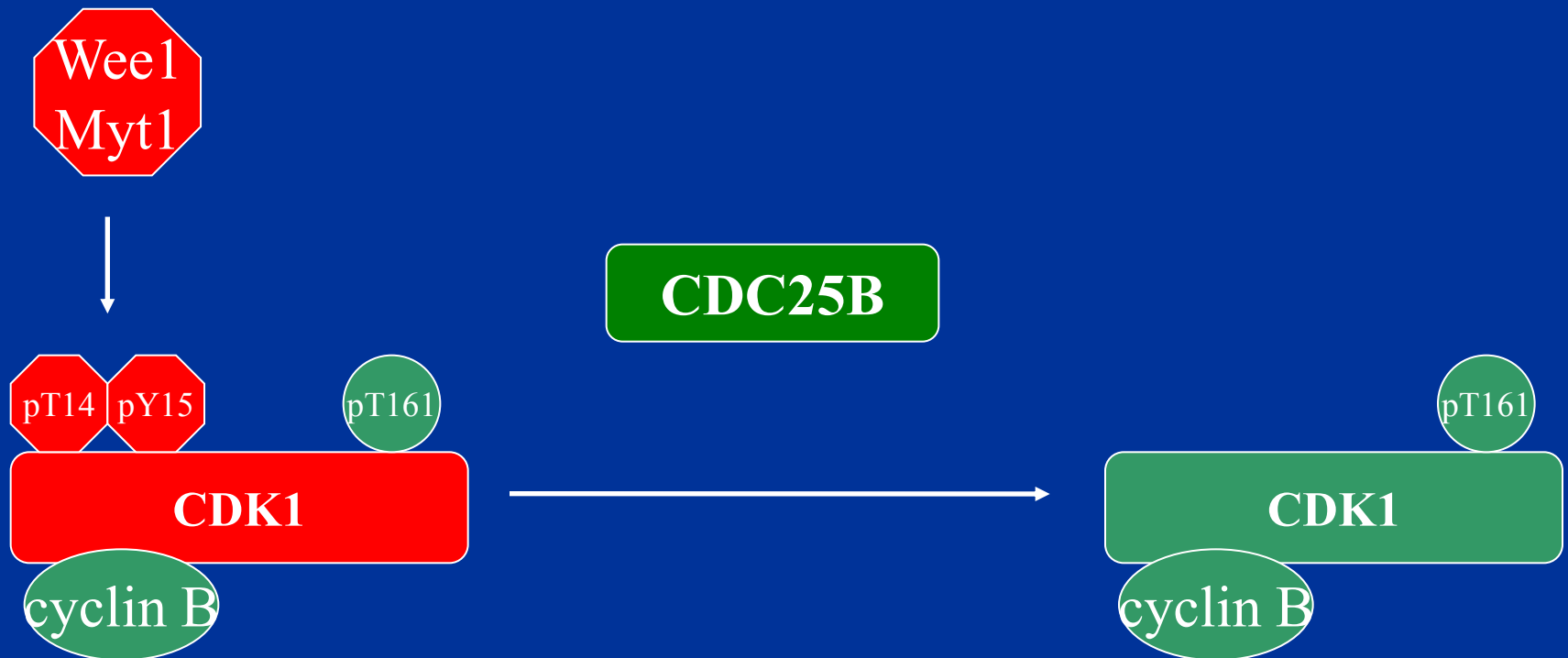


Slightly modified from Reproduction (2005) 130 801–811

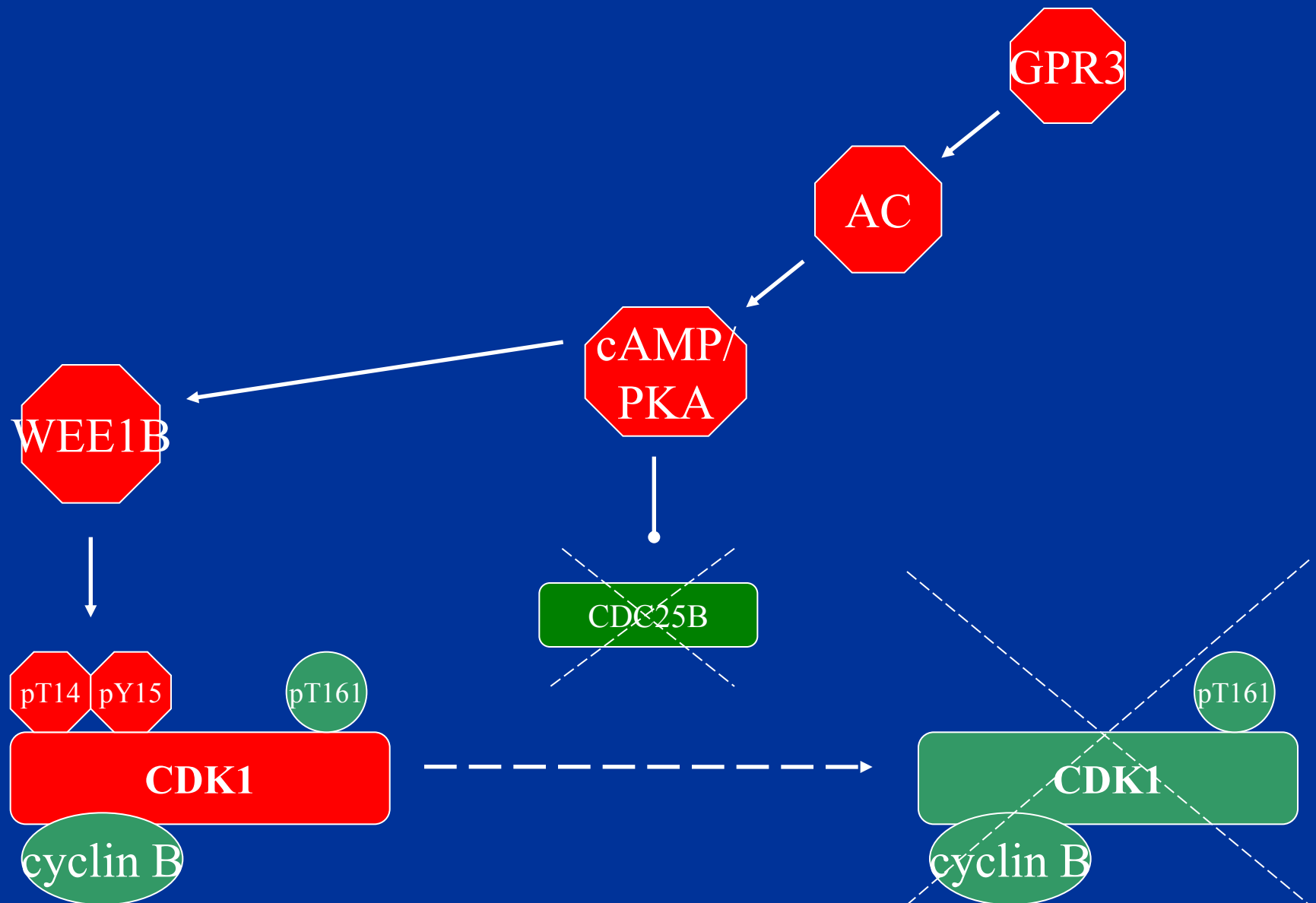
Změny hladiny cAMP regulují znovuzahájení meiózy v oocytech



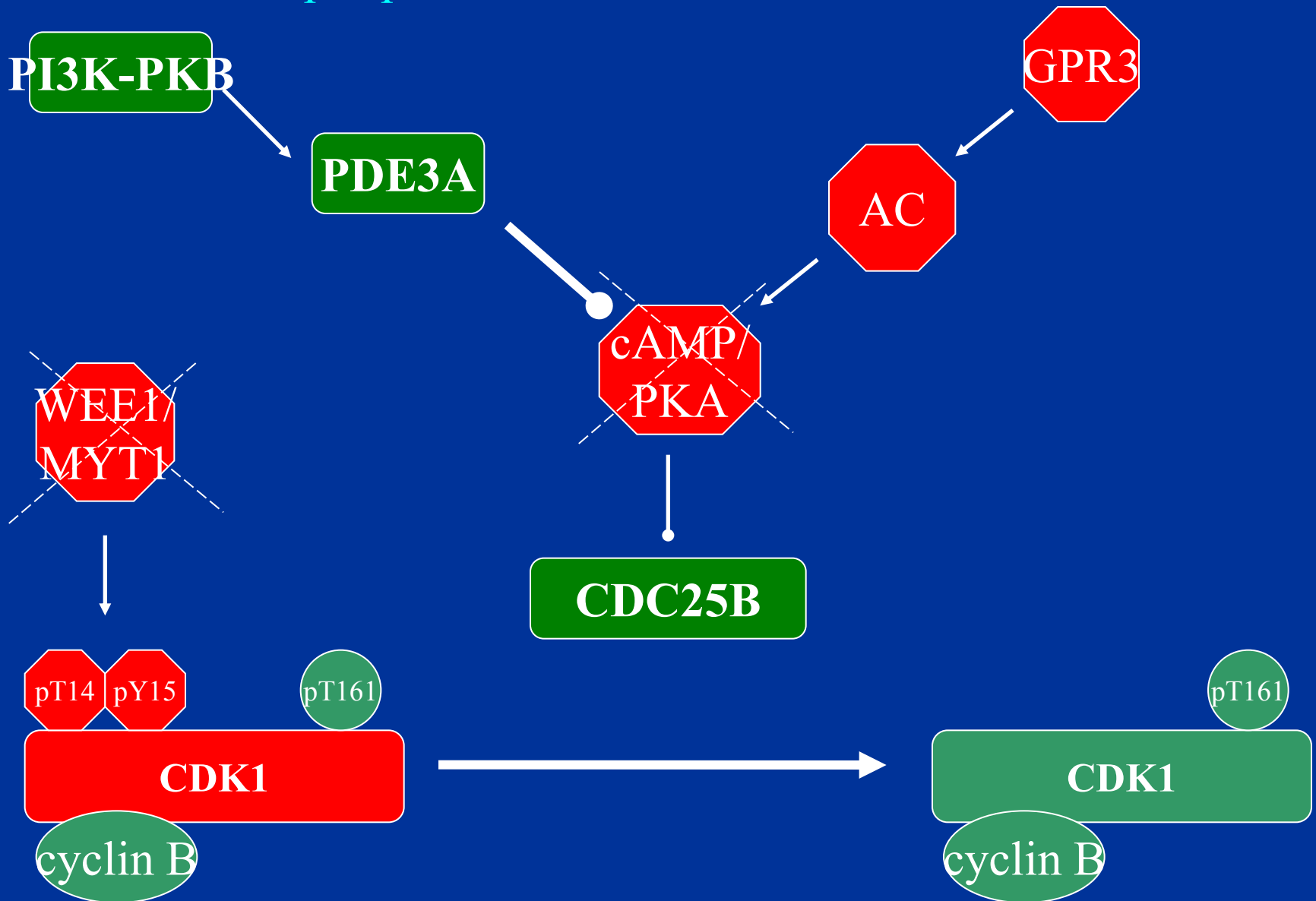
CDK1 je pozitivně i negativně
regulována fosforylací
(CDK1 = cell division kinase 1)



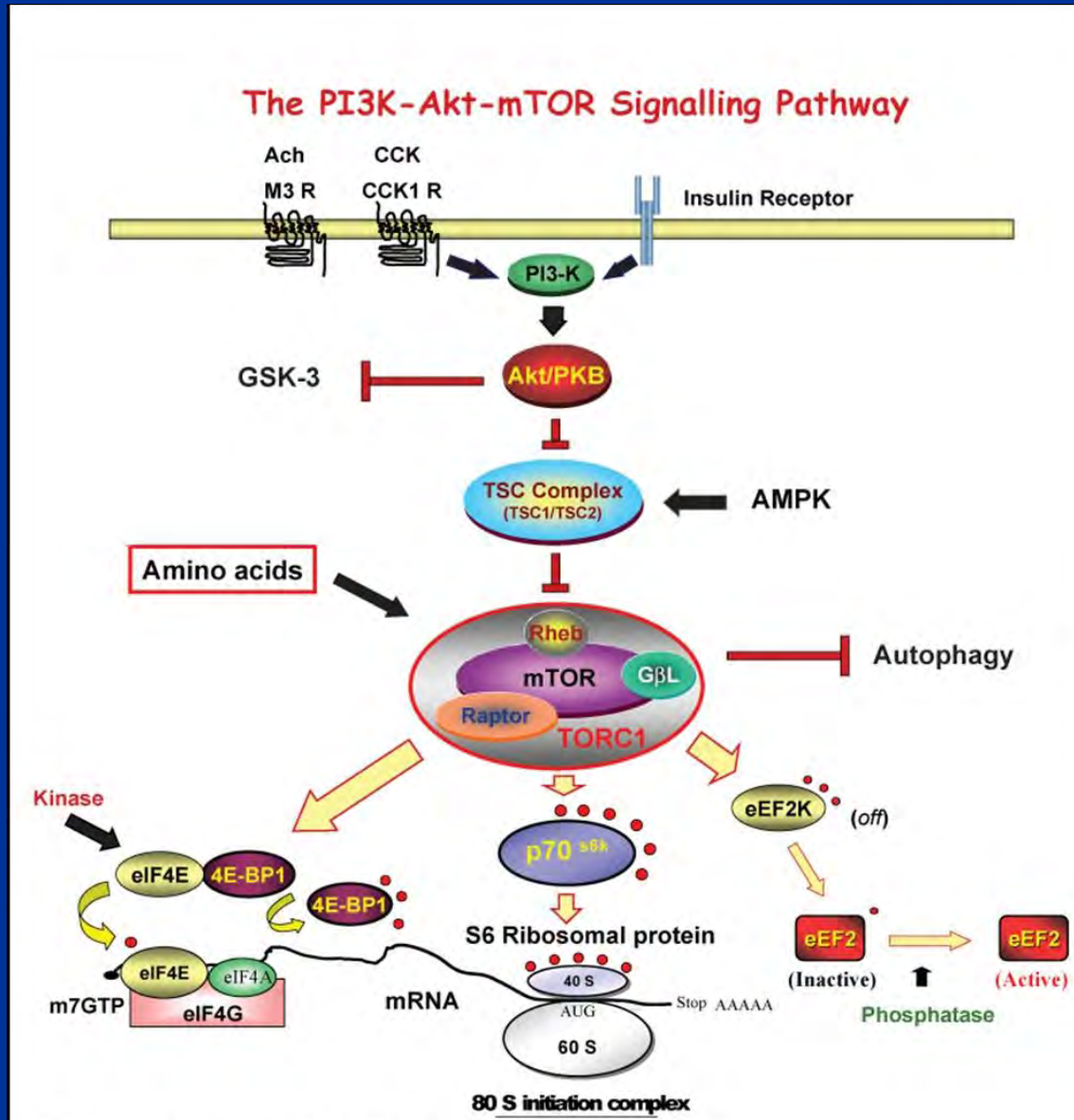
Vysoká hladina cAMP inhibuje aktivaci CDK1



PDE3A (fosfodiesteráza 3) je nezbytná pro pokles cAMP a aktivaci CDK1

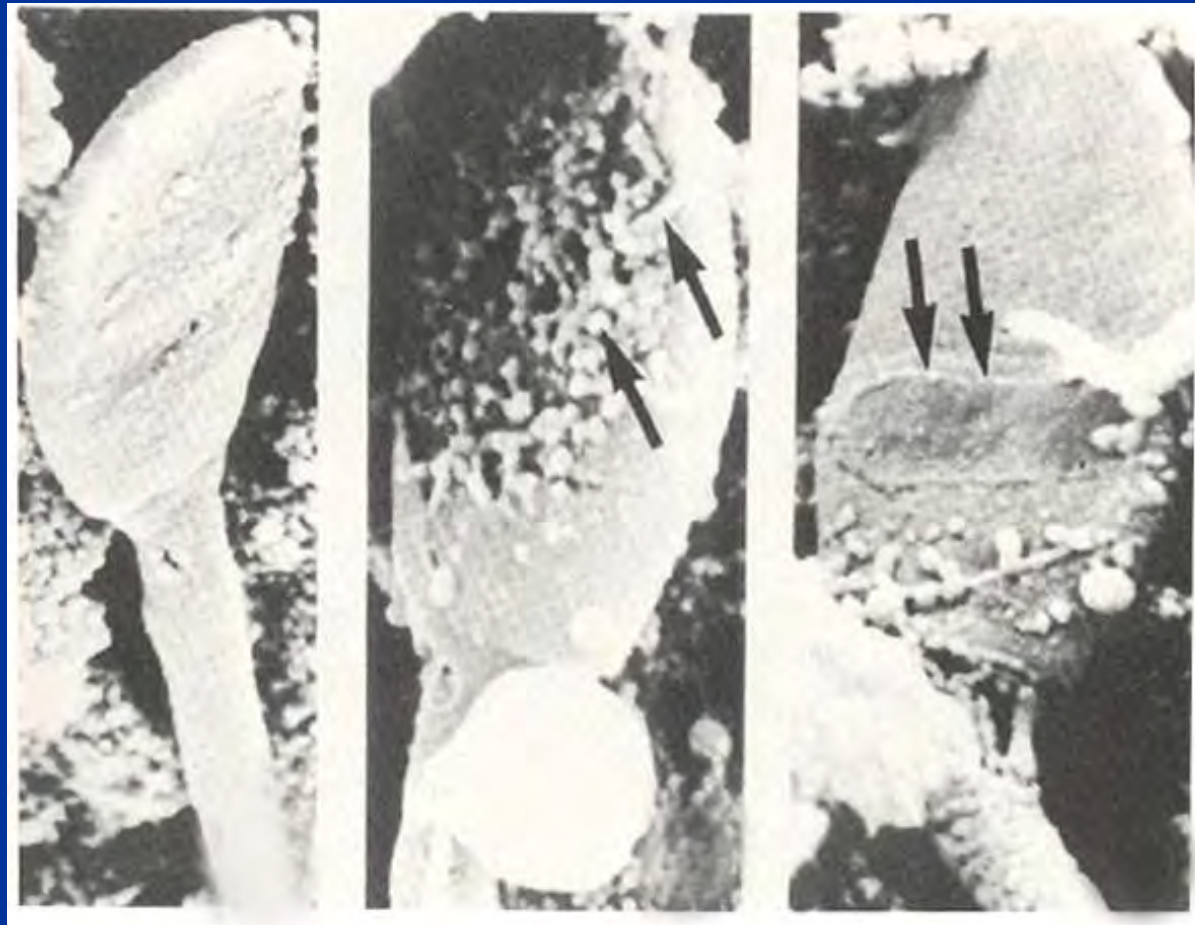


Meiotického zrání oocytů se účastní mnoho jiných signálních drah
 (např. aktivita proteinkinázy B /PKB [také nazývané Akt]
 je součástí regulace syntézy proteinů v oocytech)

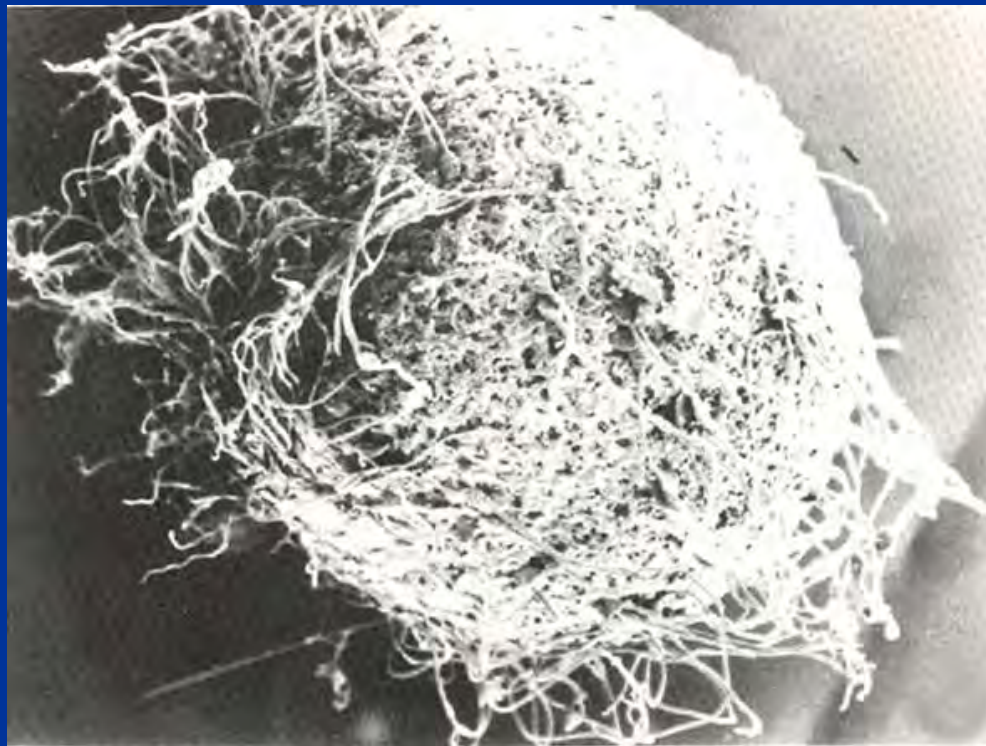


Oplození oocytů savců *in vitro*

(průběh akrozomální reakce na akrozomu hlavičky spermie)

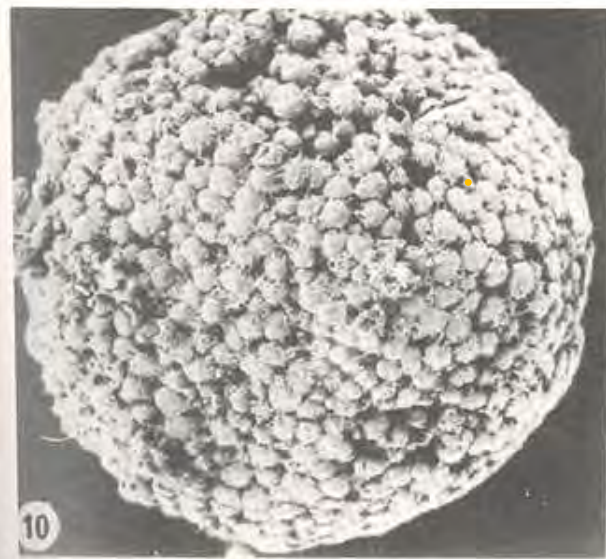


Bičíky spermií na povrchu oocytu

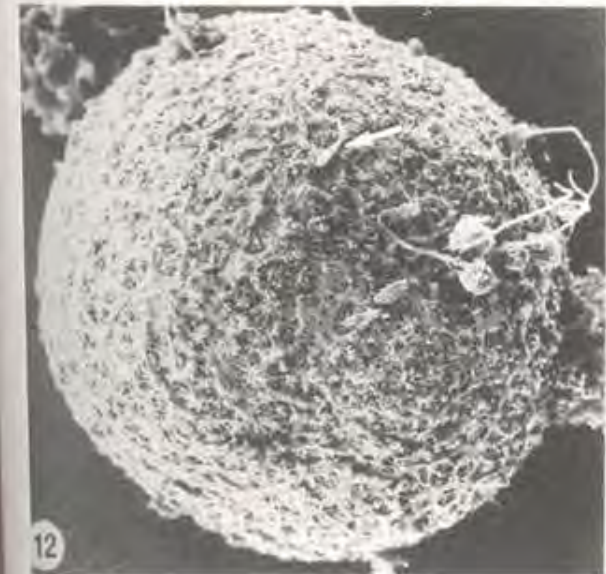


Oplození oocyty myši

(elektronová mikroskopie)



Obr. 10
Oocyt myši s kumulárním obalem
(tzv. oocyte-cumulus complex)



Obr. 11 Spermie přichycená na oocyt
(ZP - zóna pellucida, CC – cumulus cell)

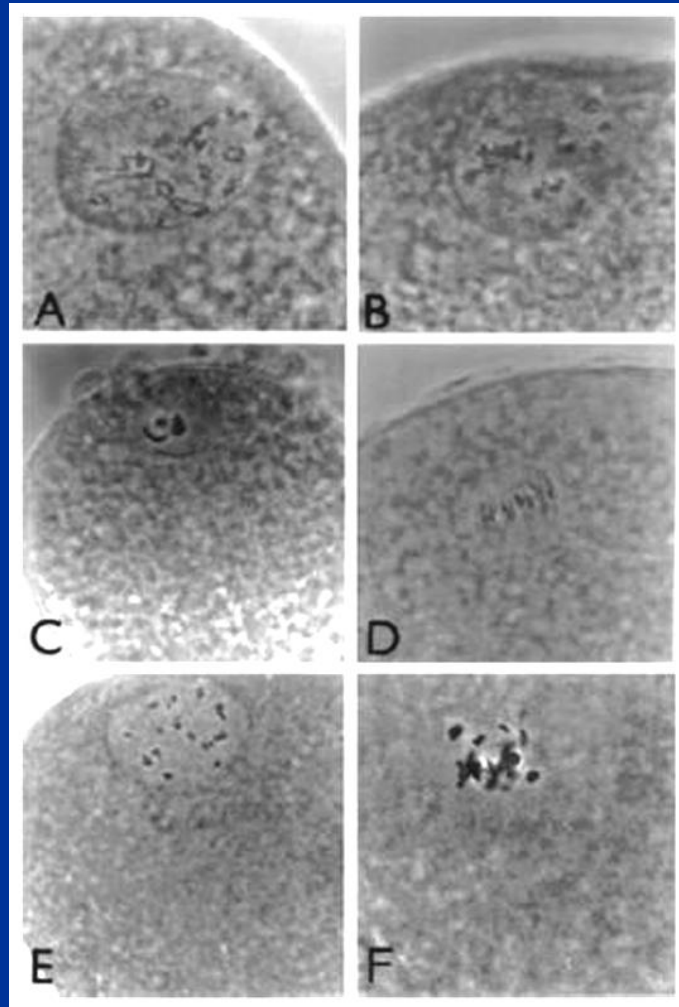
Obr. 12 +13 Spermie přichycené na oocyt
(oocyt je zbaven kumulární vrstvy
a zóny pellucidy)

Metody studia meiotického zrání oocytů

- mikroskopické hodnocení
- biochemické analýzy
- molekulárně genetické přístupy

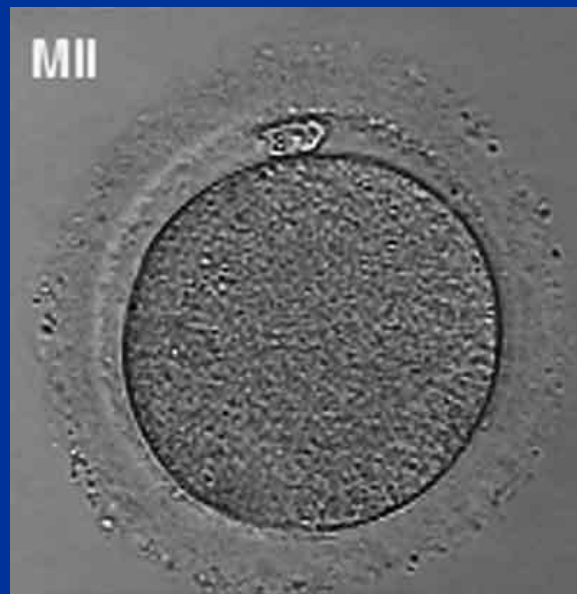
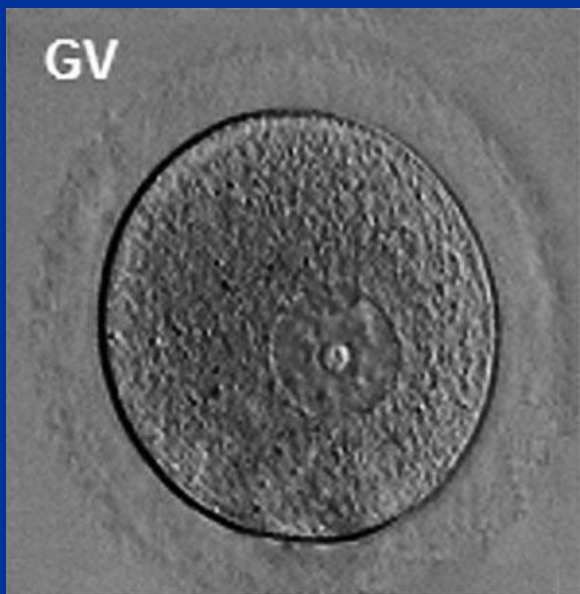
Jádro oocyty prasete

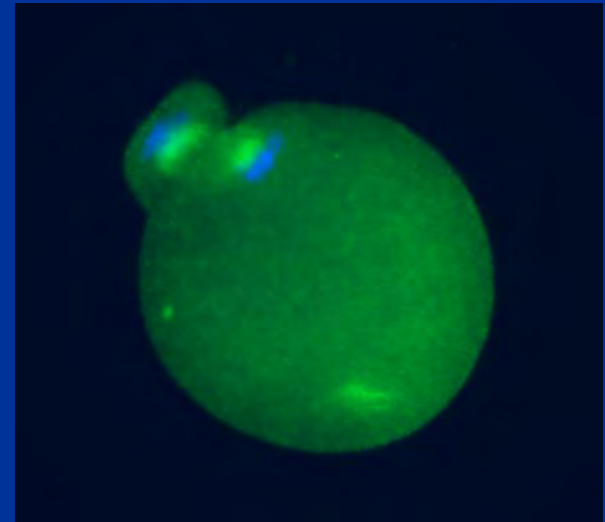
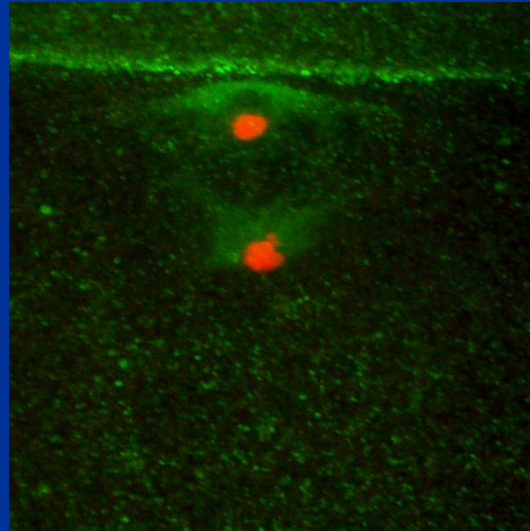
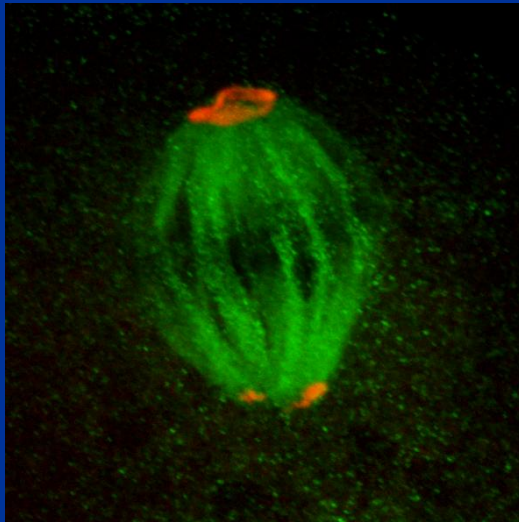
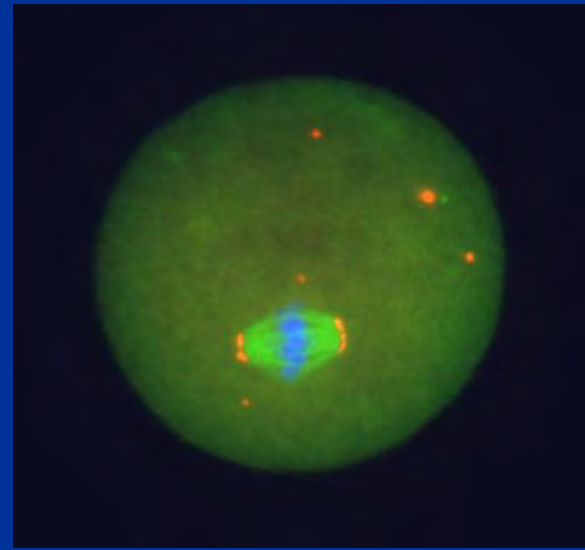
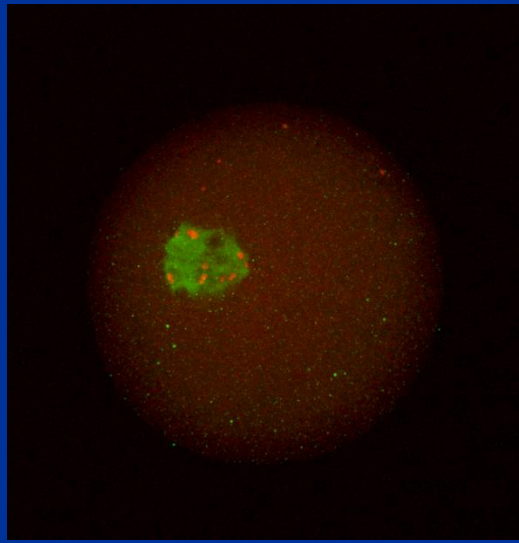
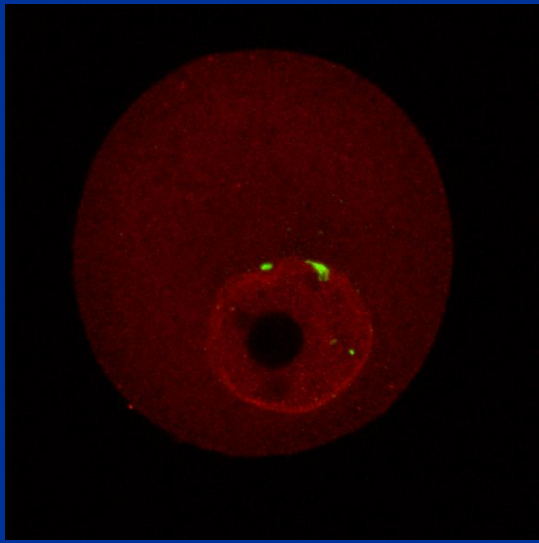
(fázový kontrast)



Human oocytes

(fázový kontrast)

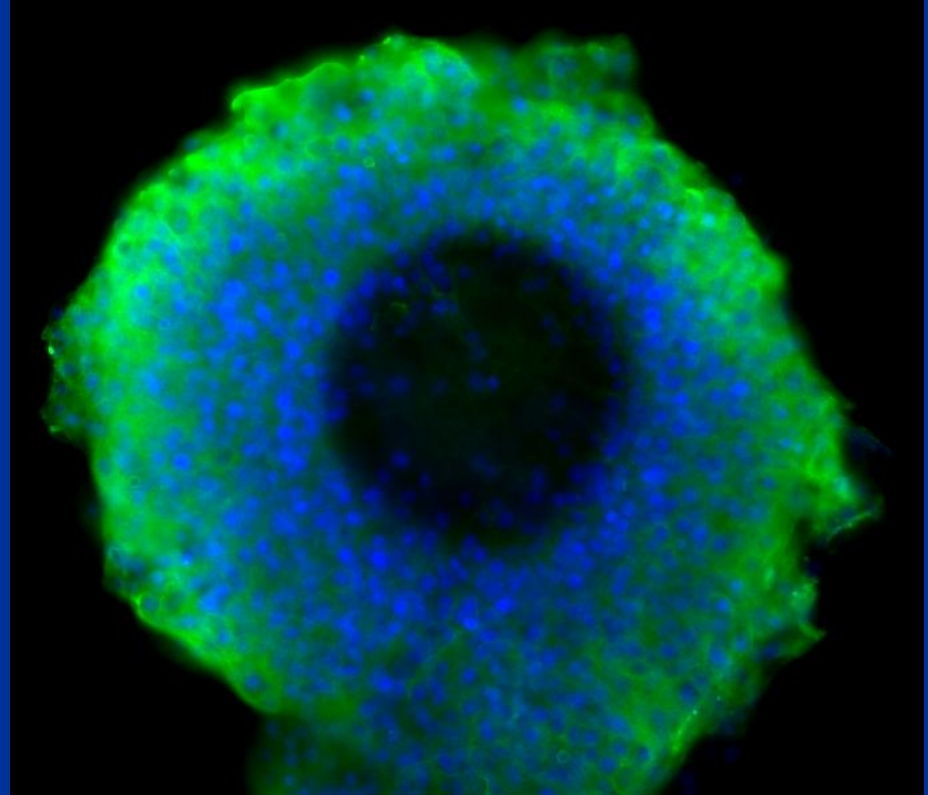
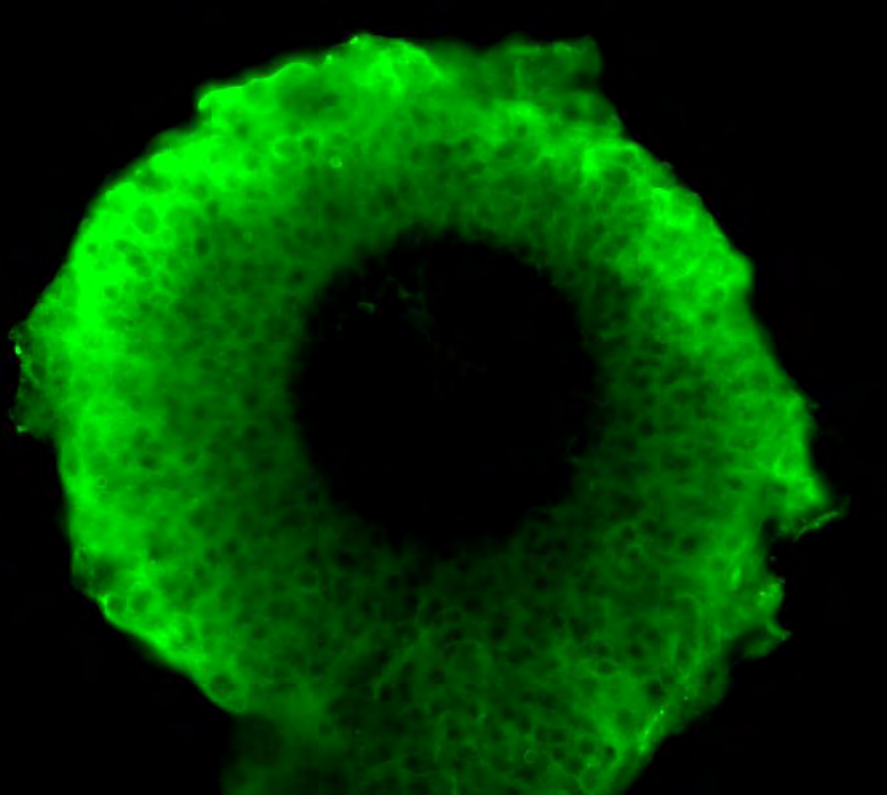




Fluorescenční mikroskopie

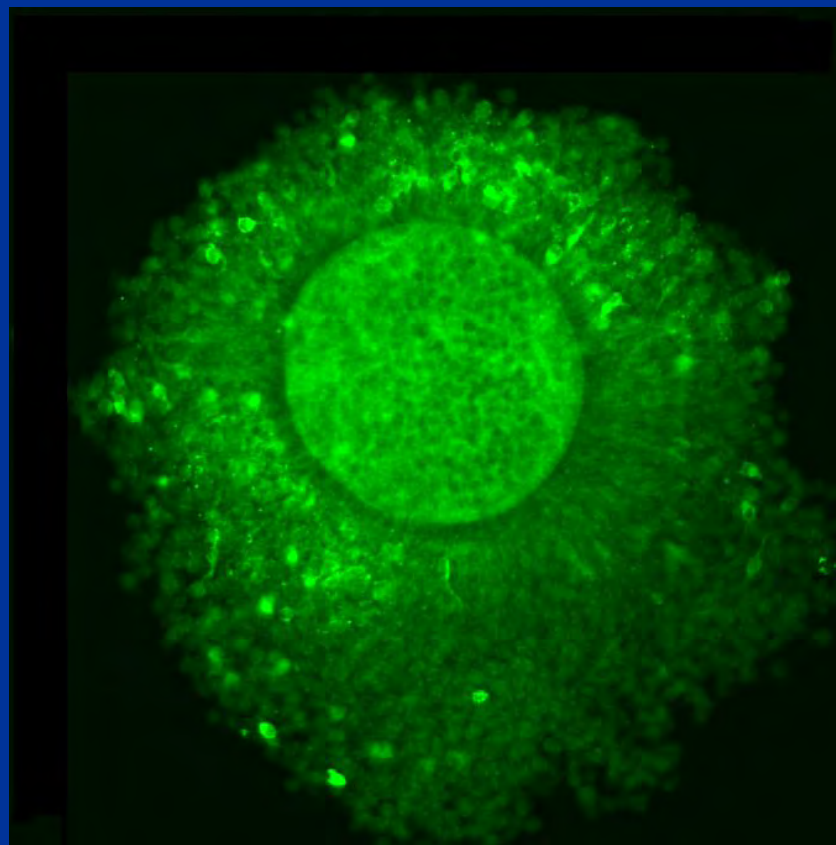
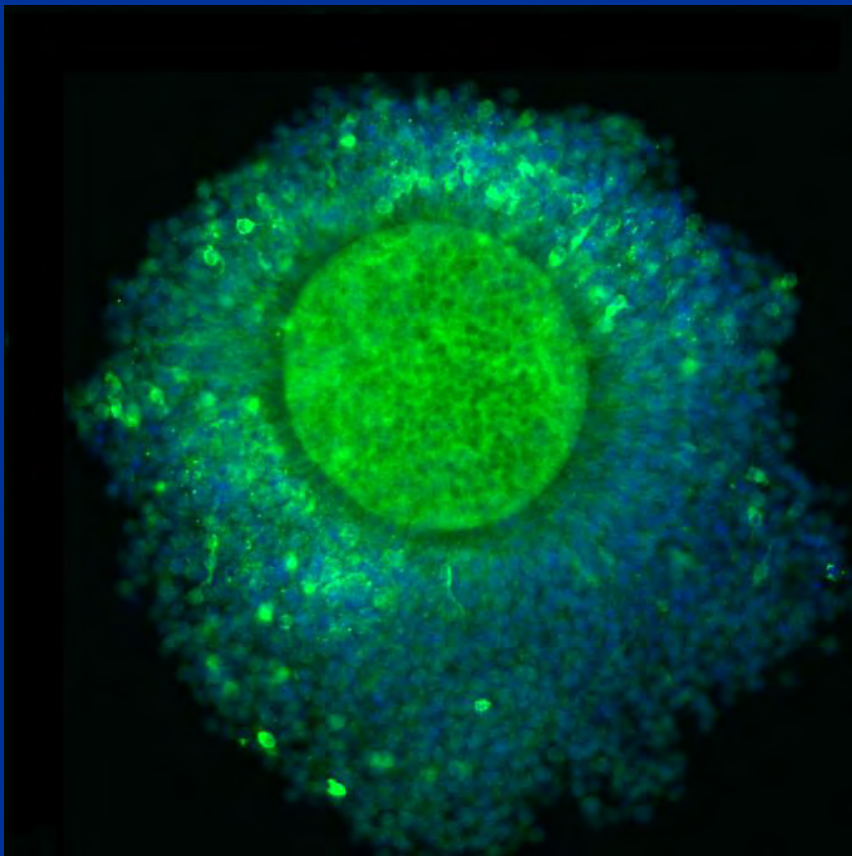
fosforylovaná PKB kináza (zelená b.)
pericentrin (oranžová b.)
chromatin (modrá b.)

Exprese hyaluronan binding proteinu (HABP) v expandované
kumulární vrstvě oocyty myši



HABP (zelená b.)
chromatin (modrá b.)

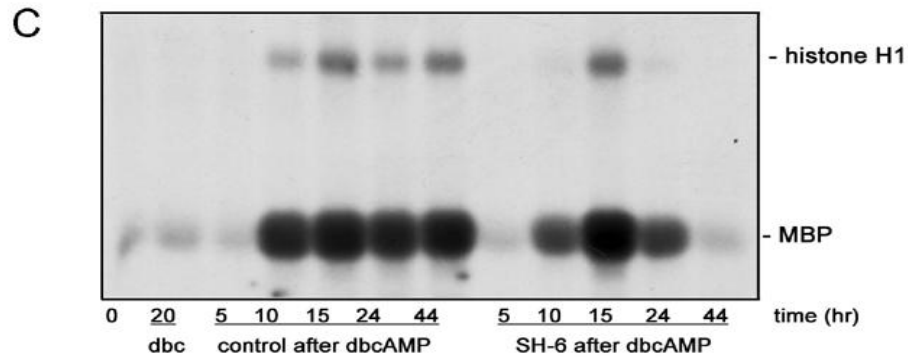
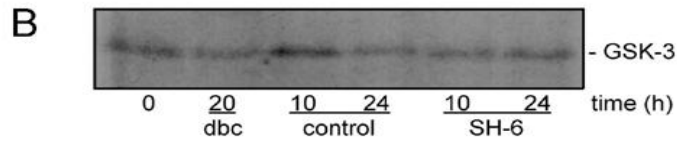
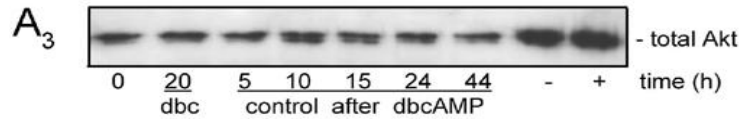
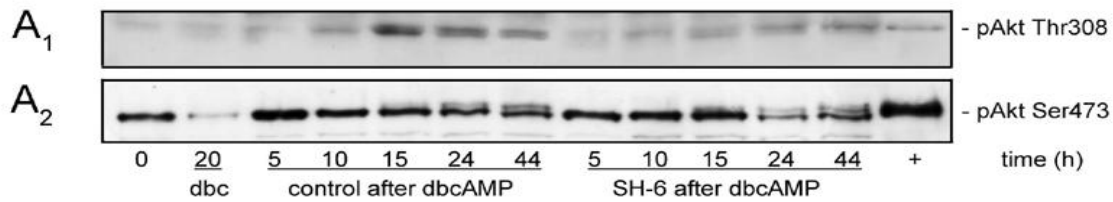
Exprese TNFAIP6 (tumor necrosis factor alpha induced protein 6)
v expandované kumulární vrstvě oocytu prasete



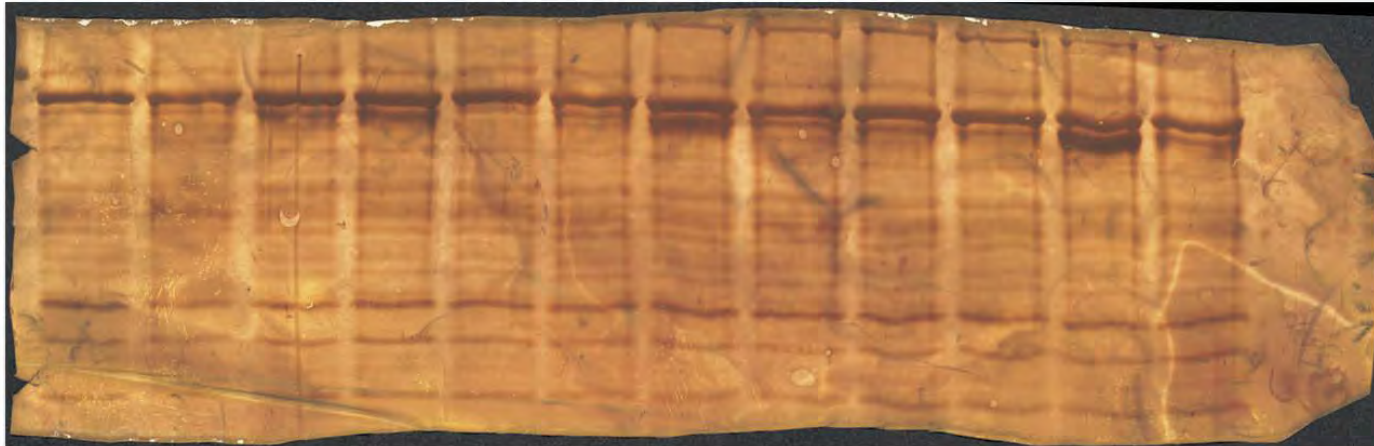
TNFAIP6 (zelená b.)
chromatin (modrá b.)

Biochemické metody:

- Immunoblotting (A, B)
- Kinase assay (C)



Silver staining of blotted membrane



fresh
DOs

0 5 10 15 24 44
control after dbcAMP (DOs)

5 10 15 24 44
SH-6 after dbcAMP (DOs)

+ time (hr)