

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Kolesnik

Role extracelulárních vezikulů v komunikaci mezi embryem a matkou
v průběhu časného vývoje
The role of extracellular vesicles in communication between the embryo and the mother
during early development

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. MVDr. Martin Anger, Csc.

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Také prohlašuji, že jsem využila nástroje umělé inteligence ChatGPT 4.0 (AI) v souladu s opatřením děkana č. 13/2023, článkem 4.3. Konkrétně byly tyto nástroje použity jako podpůrný nástroj při překladu zahraniční literatury, ke zlepšení čitelnosti textu a kontrole správnosti pravopisu. Prohlašuji, že nástroje AI nebyly použity k vyhodnocení a interpretaci získaných dat a ani k vytvoření výstupů této bakalářské práce.

V..... dne

.....

podpis autora

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce doc. MVDr. Martinu Angerovi, Csc. za cenné rady a za čas, který mi během psaní věnoval. Ráda bych také poděkovala Mgr. Tereze Havránkové za korekci mého textu. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině, svému příteli a blízkým za podporu během studia.

Abstrakt

Buňky uvolňují do extracelulárního prostředí různé typy membránových váčků, nazývaných exozomy a mikrovezikuly. Tyto extracelulární váčky (EVs) hrají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci. EVs se účastní také komunikace mezi matkou a embryem prostřednictvím přenášených proteinů, lipidů a microRNA. Konkrétně hrají EVs roli během akrozomální reakce a kapacitace spermií, při transportu oocyty vejcovodem a podílejí se také na implantaci a dalších procesech časného vývoje. Porozumění fyziologické roli EVs v komunikaci mezi embryem a matkou může vést například k vývoji nových diagnostických nástrojů, sloužících k evaluaci kvality embryí a k odhadu úspěšnosti jeho vývoje po přenosu. První část této bakalářské práce bude věnována přirozené komunikaci mezi embryem a matkou se zaměřením na roli EVs. Druhá část je zaměřena na využití EVs při léčbě poruch plodnosti, diagnostice a terapii.

Klíčová slova: exozomy, mikrovezikuly, časný vývoj, mezibuněčná komunikace, biomarkery

Abstract

Cells release various types of membrane-bound vesicles into the extracellular environment, referred to as exosomes and microvesicles. These extracellular vesicles (EVs) play an important role in intercellular communication. EVs are also involved in communication between the mother and the embryo through the transfer of proteins, lipids, and microRNAs. Specifically, EVs play a role during the acrosome reaction and sperm capacitation, in the transport of the oocyte through the oviduct, and they also participate in implantation and other processes of early development. Understanding the physiological role of EVs in communication between the embryo and the mother may, for example, lead to the development of new diagnostic tools for evaluating embryo quality and predicting its developmental success after transfer. The first part of this bachelor's thesis will focus on natural communication between the embryo and the mother, with an emphasis on the role of EVs. The second part will be dedicated to the use of EVs in the treatment of fertility disorders, as well as in diagnostics and therapy.

Keywords: exosomes, microvesicles, early development, intercellular communication, biomarkers

Seznam zkratk

3' UTR	three prime untranslated region, 3' nepřekládaná oblast
AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, RAC-alfa serin/threonin-proteinkináza
ALIX	programmed cell death 6-interacting protein
ARF6	ADP-ribosylation factor 6, ADP-ribosylační faktor 6
ART	assisted reproductive technology, asistované reprodukční technologie
BAX	bcl-2-like protein 4, bcl-2 podobný protein 4
BCL2	B-cell lymphoma 2, B-lymfomový protein 2
BMP	bone morphogenetic protein, kostní morfogenetický protein
BOEC	bovine oviductal epithelial cells, epiteliální buňky bovinního vejcovodu
C4BP	C4b-binding protein, C4b vazebný protein
<i>Casp3</i>	caspase-3, kaspáza 3
CD81, 9, 63, 55	cluster of differentiation, molekuly označují 81, 9, 63, 55
CDX2	homeobox protein CDX2
COL1A1	alpha-1 type I collagen, alfa-1 podjednotka kolagenu typu I
COL5A2	alpha-5 type V collagen, alfa-2 podjednotka kolagenu typu V
CYR61	cysteine-rich angiogenic inducer 61
ECM	extracellular matrix, extracelulární matrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
ESE	early-sorting endosome, časný endozom
EV	extracellular vesicle,

	extracelulární váček
FAK	focal adhesion kinase, fokální adhezivní kináza
FOXO1	forkhead box protein O1
GPI	glycophosphatidylinositol, glykofosfatidylinositol
hCG	human chorionic gonadotropin, lidský choriový gonadotropin
HLA-G5	human leukocyte antigen G5, lidský leukocytový antigen G5
HSP70, HSP90	heat shock protein 70,90, protein teplotního šoku 70,90
ICM	inner cell mass, vnitřní buněčná masa
IFN- τ	interferon tau
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein 1, vazebný protein pro růstový faktor podobný inzulínu 1
ILV	intraluminal vesicle, intraluminální váček
IL-1 β	interleukin 1 beta
IL-10	interleukin 10
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles, Mezinárodní společnosti pro extracelulární vezikuly
IVF	<i>in vitro</i> fertilisation, <i>in vitro</i> fertilizace
IZUMO1	izumo sperm-oocyte fusion 1, fúzní protein spermie a vajíčka IZUMO1
LIF	leukemia inhibitory faktor, leukemii inhibující faktor
LSE	late-sorting endosome, pozdní endozom
miRNA	microRNA
MISEV2023	Minimal information for studies of extracellular vesicles 2023
mRNA	messenger ribonucleic acid, mediátorová ribonukleová kyselina
MTOCs	microtubule organizing centers, mikrotubuly organizující centra

MV	microvesicle, mikrovezikul
MVB	multivesicular body, multivezikulární tělísko
NPM2	nucleoplasmin 2, nukleoplazmin 2
OCT4	octamer-binding transcription factor 4, oktamerový vazebný transkripční faktor 4
oEV	oviductal extracellular vesicle, extracelulární váček vejcovodu
OVGP1	oviduct-specific glycoprotein, ovidukt-specifický glykoprotein
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases, p38 proteinkináza aktivovaná mitogeny
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, 3-fosfatidylinositol-dependentní proteinkináza 1
PE	pre-eclampsia, preeklampsie
PI+ EVs	PI (nucleic acid) positive EVs, EVs obsahující nukleové kyseliny
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
<i>Plin2</i>	perilipin 2
PM	plasma membrane, plazmatická membrána
PMCA1	plasma membrane Ca ²⁺ ATPase 1, plazmatická membránová Ca ²⁺ ATPáza 1
PMCA4	plasma membrane Ca ²⁺ ATPase 4, plazmatická membránová Ca ²⁺ ATPáza 4
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
pre-miRNA	precursor microRNA, prekurzor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA, primární microRNA
RISC	RNA-induced silencing complex, komplex umlčování RNA
ROS	reactive oxygen species,

	reaktivní formy kyslíku
siRNA	small interfering RNA, malá interferující RNA
SMAD1	SMAD family member 1, člen rodiny SMAD 1
SOX2	sex-determining region Y-box 2
SPAM1	hyaluronidase PH-20, hyaluronidáza PH-20
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1, sekretovaný fosfoprotein 1
TGF- β	transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta
TE	trophectoderm, trofektoderm
TfR2	transferrin receptor 2, receptor transferinu 2
TNF- α	tumor necrosis factor alfa, faktor nádorové nekrózy alfa
TRBP	trans-activation response element RNA-binding protein
<i>TSAP6</i>	tumor suppressor activated pathway-6
TSG101	tumor susceptibility gene protein 101
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor
VG	vaginosome, vaginozoma
WOI	window of implantation, implantační okno
ZP	zona pellucida

Obsah

Úvod.....	1
1. Časný embryonální vývoj a implantace.....	2
1.1 Obecný přehled časného embryonálního vývoje	2
1.2 Implantace obecně.....	3
2. Extracelulární váčky.....	5
2.1 Exozomy	6
2.2 Mikrovezikuly	6
2.3 Exozomy a mikrovezikuly jako mechanismus komunikace mezi buňkami	7
2.4 Apoptická tělíska	8
2.5 Obsah extracelulárních váček	8
2.5.1 MicroRNA	8
2.5.2 Proteiny podílející se na biogenezi exozomů	10
2.5.3 Proteiny podílející se na biogenezi mikrovezikulů.....	10
2.5.4 Lipidy extracelulárních váček	11
3. Extracelulární váčky v reprodukci	12
3.1 Význam extracelulárních váček pro fertilizaci	13
3.1.1 Vliv na spermie.....	13
3.1.2 Vliv na oocyt	14
3.2 Extracelulární váčky vejcovodu.....	14
3.3 Endometriální extracelulární váčky	15
3.3.1 MicroRNA v komunikaci mezi endometriem a embryem.....	15
3.4 Imunomodulace prostřednictvím extracelulárních váček	16
3.5 Extracelulární váčky embrya	17
3.5.1 Společná kultivace embryí.....	17
3.5.2 Změny exprese genů	18
4. Využití extracelulárních váček v diagnostice a léčbě poruch plodnosti	19
4.1. Biomarkery	19
4.1.1 Biomarkery kvality embrya	20
4.2 Extracelulární váčky jako terapeutický nástroj v reprodukční medicíně	21
4.2.1 Přirozené extracelulární váčky	21
4.2.2 Syntetické extracelulární váčky	22
Závěr.....	23
Seznam literatury.....	24

Úvod

Embryogeneze člověka představuje složitý proces, který trvá kolem 8 týdnů a zahrnuje fáze vývoje lidského embrya od oplození do fetálního vývoje. Mnohé procesy během tohoto období jsou mimo jiné řízeny mezibuněčnou komunikací pomocí extracelulárních váčků (EVs), jejichž role v časném embryonálním vývoji bude diskutována v této bakalářské práci.

Studium role EVs v reprodukci je důležité nejenom pro rozšíření znalostí o mezibuněčné komunikaci, ale i pro potenciální diagnostiku patologických stavů u těhotných žen, například preeklampsie (PE) (Gebara et al. 2022) a předčasného porodu (Zhao et al. 2020). Kromě toho se výzkum EVs může uplatnit v rozvoji a podpoře diagnostických metod při umělém oplodnění (IVF) (Fang et al. 2023).

V současné době přibližně 17,5 % párů nemůže mít děti přirozeným způsobem (World Health Organization. 2023). IVF u lidí existuje více než 46 let, a od doby narození prvního dítěte Louise Brownové v roce 1978 se stalo preferovanou léčbou mnoha příčin neplodnosti. Asistovaná reprodukce (ART) však stále čelí doposud nevyřešeným problémům, spojeným zejména s kultivací a přenosem embryí, a proto se neustále hledají nové způsoby, jak tyto problémy vyřešit.

Podle dat Evropské společnosti pro lidskou reprodukci a embryologii Česká republika vykazuje vzrůstající tendenci použití ART (v roce 2019 tvořily děti narozené za pomoci ART 6,2 %). Úspěšné těhotenství na jednu aspiraci folikulů nastoupí s přibližně 27,5 % šancí, procento porodu je ale nižší – 23,2 % (The European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) et al. 2023). Tyto hodnoty se liší výrazně v závislosti na několika důležitých faktorech: věku, počtu cyklů a metodě ART. Počet center ART v České republice také roste, údaje z roku 2019 uvádějí 48 center (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2020). S ohledem na tyto údaje a statistiku úspěšnosti nelze podceňovat roli výzkumu v této oblasti, protože rychlý rozvoj ART vyžaduje i nové vědecké postupy.

Cílem této bakalářské práce bude prozkoumat význam extracelulárních váčků v kontextu časného embryonálního vývoje, a to včetně molekulárních mechanismů, kterými EVs zprostředkovávají komunikaci mezi matkou a embryem. Tomuto tématu budou věnovány první dvě kapitoly, které nejprve představí přehled časného embryonálního vývoje člověka a obecnou charakteristiku EVs. Ve třetí kapitole budou tato dvě témata propojena. V poslední kapitole bude zkoumán způsob, jakým může výzkum zaměřený na EVs přispět k řešení reprodukčních problémů, s ukázkami potenciálních aplikací a možností zlepšení úspěšnosti IVF a hledání nových metod podporujících zdravý průběh těhotenství.

1. Časný embryonální vývoj a implantace

Pro hlubší porozumění mechanismům komunikace za pomoci extracelulárních váčků mezi embryem a matkou je nezbytné představit základní procesy, kterými embrya procházejí během časného vývoje.

1.1 Obecný přehled časného embryonálního vývoje

Časný vývoj embrya začíná fertilizací, což je fúze dvou haploidních pohlavních buněk (gamet) s následným vytvořením diploidní zygoty. Spermie vstupují do pohlavního traktu ženy bez schopnosti oplození, a proto musí projít kapacitací (zajišťuje schopnost proniknout mezi buňky corona radiata a skrz zona pellucida (ZP)). V těsné blízkosti vajíčka poté dochází k akrozomální reakci (uvolnění obsahu akrozomálního váčku s lytickými enzymy, které naruší ZP). Po průniku skrz zona pellucida začíná splynutí povrchových membrán oocytu a spermie, následuje změna v polarizaci cytoplazmatické membrány vajíčka a exocytóze obsahu kortikálních granulí. Tyto procesy zabrání vniknutí další spermie do vajíčka (Georgadaki et al. 2016).

Následně dojde k dokončení druhého meiotického dělení vajíčka. Vznikají samčí a samičí prvojádra, která se přibližují k sobě a do středu buňky. Tento proces je zprostředkován motorovými proteiny, mikrotubuly a aktinem (Scheffler et al. 2021). Následuje S fáze buněčného cyklu, během níž dochází k replikaci DNA. Tradičně se předpokládalo, že dělicí vřeténko v mitóze unifikuje a poté rozdělí rodičovské chromozomy za vzniku dvou ekvivalentních blastomer (Coticchio et al. 2023). Nicméně bylo prokázáno, že u myši (Reichmann et al. 2018) a skotu (Schneider et al. 2021) se během prometafáze vytvoří dvě nezávislá dělicí vřeténka – jedno pro samčí chromozomy a druhé pro samičí chromozomy. Obě dělicí vřeténka následně fúzují před rozdělením sesterských chromatid. Dvoubuněčné embryo má již pouze jedno mitotické vřeténko (Reichmann et al. 2018). Pokud se dvě oddělená dělicí vřeténka zachovávají po celou dobu mitózy, může dojít ke vzniku dvoujaderných nebo vícejaderných blastomer (Coticchio et al. 2023). Bylo však popsáno, že dvoujaderná embrya ve dvoubuněčném stadiu později vykazovala vyšší míru tvorby blastocyst a těhotenství (naopak vícejaderná embrya měla nejnižší výsledky ve srovnání s jednojadernými) (Talbot et al. 2022). Selhání fúze dvou rodičovských dělicích vřetének před anafází u myši se podobá klinickým fenotypům lidských embryí při IVF, u nichž se objevují dvě jádra v blastomerách, což může naznačovat existenci podobného mechanismu u člověka (Meriano et al. 2004; Reichmann et al. 2018). Byla již popsána přítomnost dvou vřetének u člověka během anafáze, ale jsou zapotřebí další studie tohoto mechanismu, včetně vztahu mezi dvěma dělicími vřeténky a dvoujaderností (Xu et al. 2019; Coticchio et al. 2023).

Dělením zygoty se zahajuje takzvané rýhování, tedy série rychlých mitotických dělení, probíhajících v době putování embrya vejcovodem. Vejcovod se skládá ze tří oblastí: *infundibulum*, *ampulla* a *isthmus*. *Infundibulum* neboli nálevka je odpovědná za zachycení oocytu po ovulaci, a je připojena pomocí třásní (*fimbriae*) na okraji k ovariu. Oplození nejčastěji probíhá v ampulárním oddílu

vejcovodu. Vejcovod je pokryt epitelálními buňkami, z nichž některé jsou vybaveny řasinkami nebo mikrokly, a jiné mají sekreční aktivitu. Řasinky slouží k posunu embrya směrem k děloze, sekreční buňky poskytují embryu výživu a ochranu (Li et al. 2017). Pokračuje rýhování, přičemž dělicí se buňky se nazývají blastomery. Od stadia osmi blastomer u myši buňky vytvářejí kompaktní útvar a těsná buněčná spojení mezi sebou. Tento proces se nazývá kompaktace (Ducibella et al. 1977). U člověka tento proces začíná později, od stadia dvanácti buněk, a probíhá asynchronně (Domingo-Muelas et al. 2023). Bylo prokázáno, že u embryí člověka se již ve stadiu dvou buněk blastomery liší, přičemž ta, která vstupuje do dělení dříve, přispívá více k tvorbě samotného embrya i placenty (Junyent et al. 2024). Buňky uvnitř moruly začínají diferenciaci na vnitřní buněčnou masu expresí transkripčního faktoru Nanog (Mitsui et al. 2003), zatímco buňky na povrchu se diferencují na trofektoderm (TE) a exprimují transkripční faktor CDX2 (homeobox protein CDX2) (Niakan et al. 2013). Kromě toho jsou zapotřebí další transkripční faktory jako OCT4 (oktamer vazebný transkripční faktor 4) a SOX2 (sex-determining region Y-box 2), které hrají důležitou roli v udržení pluripotence (Avilion et al. 2003).

Postupným dělením blastomer a tvorbou dutiny mezi nimi vzniká blastocysta. Ta v děloze přichází do kontaktu s endometriem. Vnitřní buněčná masa (ICM) se pod vlivem dalších transkripčních faktorů diferencuje do dvou vrstev, hypoblastu a epiblastu, přičemž z epiblastu vzniknou v procesu gastrulace všechny budoucí embryonální buněčné linie. Tyto dvě vrstvy s charakterem epitelu vznikají po osmi dnech od oplození a nazývají se embryonálním diskem (Knöfler et al. 2019; Zhai et al. 2022).

Všechny linie buněk trofoblastu se diferencují z TE. Kmenové buňky trofoblastů dávají vzniknout dvěma primárním vrstvám: časnému cytotrofoblastu a primitivnímu syncytiu. Proliferací časného cytotrofoblastu vznikají nejprve primární, poté sekundární a následně terciální choriové klky, které postupně pronikají do děložní sliznice (decidua). Pokračuje proliferace a fúze buněk klkového cytotrofoblastu, stejně jako tvorba vnější vrstvy mnohojaderného syncytiotrofoblastu nezbytného pro kontakt matky a plodu. Zároveň se proliferující cytotrofoblasty diferencují na invazivní extravillózní trofoblasty, které se dále diferencují do dvou dalších linií: intersticiálních extravillózních trofoblastů a endovaskulárních extravillózních trofoblastů. Tyto buňky společně migrují do spirálních arterií a zajišťují správný průtok krve v placentě (Okao et al. 2018; Knöfler et al. 2019).

Přibližně 15. den po oplodnění začíná fáze gastrulace – vznik tří zárodečných vrstev (ektodermu, mezodermu a endodermu). Gastrulace začíná vytvořením primitivního proužku s primitivním uzlem. Buňky v oblasti primitivního proužku migrují dovnitř, nahrazují buňky hypoblastu a vytvářejí endoderm, a také pronikají mezi ektoderm a endoderm a vytvářejí mezoderm. Postupnou diferenciací buněk epiblastu tak vzniká třívrstevný disk tvořený ektodermem, mezodermem a endodermem, a v budoucnu i všechny orgány a tkáně (Zhai et al. 2022).

1.2 Implantace obecně

Implantace se dělí na několik fází: apozice, adheze a invaze. Implantace začíná migrací buněk embrya ze ZP, tento proces se nazývá *hatching* a je zahájen u embrya člověka mezi 6. a 7. dnem po

oplození. Pro uchycení blastocysty k děložní sliznici je nezbytná receptivita endometria, tzv. implantační okno, které nastává mezi 20. – 24. dnem sekreční fáze menstruačního cyklu. Tento proces probíhá za účasti hormonů estrogenu a progesteronu (Kim et al. 2017). V důsledku zvýšené hladiny progesteronu získává endometrium na povrchu epitelových buněk dělohy mikroklky, které stimulují přichycení blastocysty (Stavreus-Evers et al. 2001).

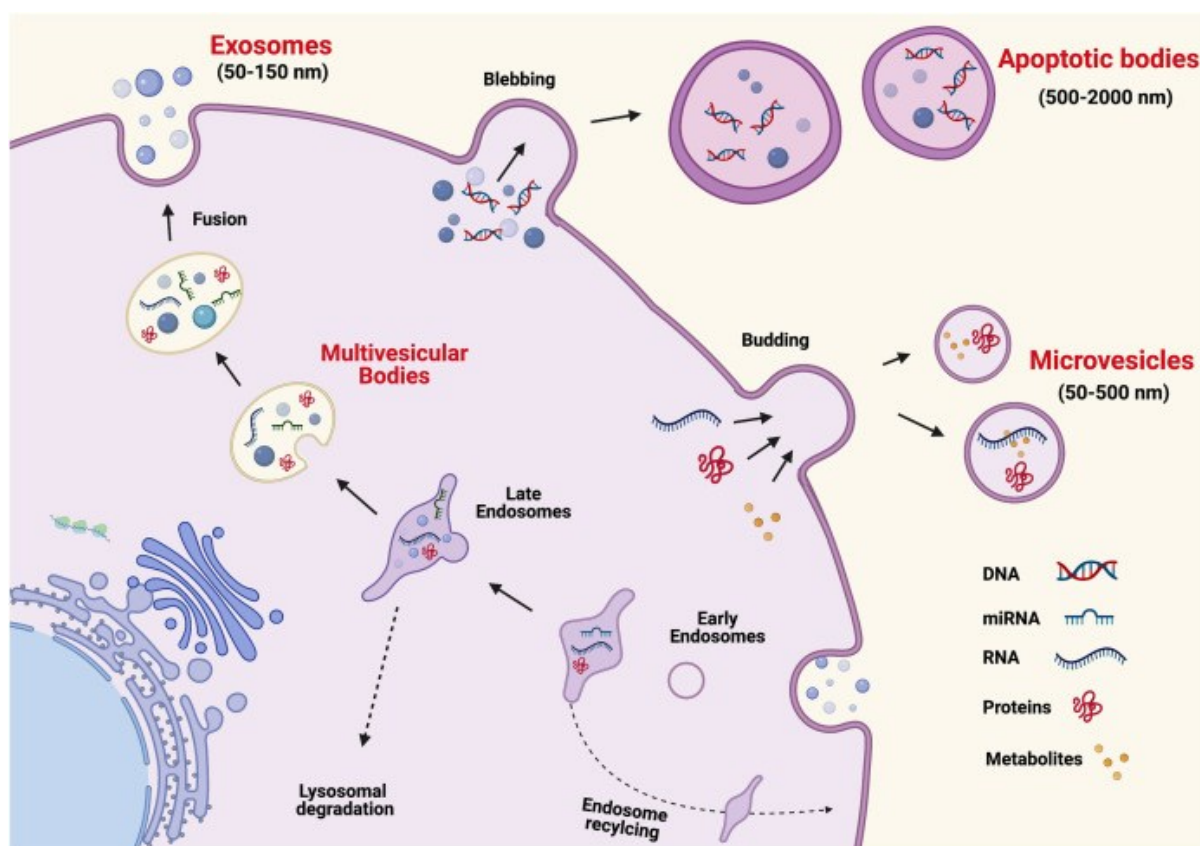
Apozice je počáteční kontakt blastocysty s místem uchycení v endometriu. Blastocysta exprimuje L-selektiny, zatímco mikroklky exprimují ligandy L-selektinů, což vede k jejich vzájemné interakci (Genbacev et al. 2003). Regulace tohoto procesu probíhá mimo jiné za účasti antiadhezivní molekuly mucin-1, která zabraňuje uchycení blastocysty na nevhodném místě nebo mimo období implantačního okna. Nicméně dále při adhezi je nutné mucin-1 rozštěpit (Meseguer et al. 2001; Ochoa-Bernal et al. 2020). Dalšími molekulami nezbytnými pro adhezi jsou integriny, cytokiny, kadheriny a imunoglobuliny (Ochoa-Bernal et al. 2020).

Invaze nastává, když buňky trofoblastu pronikají a migrují do epitelu endometria, aby změnily mateřské cévní zásobení a zajistily embryo dostatečným přívodem krve. Invaze trofoblastu je řízena růstovými faktory, cytokiny a dalšími molekulami (Kim et al. 2017).

2. Extracelulární váčky

Komunikace mezi buňkami je kromě klasických signálních molekul zprostředkována také malými vakuolami obalenými lipidovou membránou, které se nazývají extracelulární váčky a které přenášejí bioaktivní molekuly (proteiny, mRNA, miRNA, DNA, lipidy atd.) do cílových buněk. EVs se nacházejí jak v buňkách eukaryot, tak i prokaryot, kde hrají důležitou roli ve fyziologických a patologických stavech.

EVs můžeme tradičně rozdělit na exozomy, mikrovezikuly a apoptotická tělíska. Pro představu různých typů EVs viz obr. 1. Nicméně je nutné zmínit, že nejnovější výzkumy rozšiřují tuto základní klasifikaci o další typy EVs, v literatuře se objevují názvy, které se vztahují k jejich funkcím, rozměrům nebo původu (Gould et al. 2013). Pojem extracelulární váčky budeme tedy dále používat pro mikrovezikuly a exozomy. Navíc byl před několika měsíci popsán potenciálně nový typ EVs, tzv. *blebbisomes* (je použit anglický název, protože se jedná o nový termín, který dosud nemá ustálený český ekvivalent). Jde o velké vezikuly o velikosti do 20 μm , které se tvoří za účasti nemuskulárního myosinu IIB jak v normálních, tak i v nádorových buňkách, a které mohou vylučovat jiné typy EVs (zejména mikrovezikuly a exozomy). Byly v nich identifikovány typické molekuly EVs, například Rab GTPázy, CD63 (cluster of differentiation 63), ALIX (programmed cell death 6-interacting protein) – viz kapitola 2.5.2; stejně jako organely, včetně funkčních mitochondrií. Předpokládá se jejich role v imunosupresi (Jeppesen et al. 2025).



Obr. 1: Typy a biogeneze extracelulárních váček. Vznik exozomů endocytózou z časného endozomu (může být recyklován), který poté formuje pozdní endozom (může být degradován v lysozomu) a

multivezikulární tělísko. Uvolnění obsahu multivezikulárního tělíska ven z buňky. Vznik apoptotických tělísek během apoptózy, která mají zbytky obsahu buňky obalené PM. Vznik mikrovezikulů pučením z PM. Obsahují proteiny, RNA a metabolity. Převzato z Aguirre et al. 2022.

Izolace EVs vyžaduje komplexní postupy, a proto se i přes velký pokrok v této oblasti výsledky často liší. Mezi nejčastější metody detekce váčků patří western blot, elektronová mikroskopie, průtoková cytometrie a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Tannetta et al. 2014). K izolaci EVs se používá ultracentrifugace (nejčastější), filtrace s tangenciálním tokem, srážení, vylučovací chromatografie a další. Každá metoda izolace má svá specifika, liší se zejména citlivostí a přesností (Veerman et al. 2021), což může vést k rozdílům ve výsledcích analýzy. Využití metod, které se liší schopností oddělit rozpustné fragmenty od EVs a velikostí izolovaných EVs, vedlo k rozdílům v rozměrech a složení váčků publikovaných v literatuře. Mezi další faktory, které ovlivňují výsledky izolací, patří způsob odběru, skladování a viskozita materiálu (Machtinger et al. 2021).

Z hlediska standardizace izolace a detekce EVs je důležité řídit se technologickými postupy při práci s váčky z roku 2023 (MISEV2023) od Mezinárodní společnosti pro extracelulární vezikuly (ISEV) (Welsh et al. 2024). Tento návod standardizuje metody izolace a postupy při následné charakterizaci váčků. Standardizace metod je klíčová pro porovnávání výsledků mezi laboratořemi.

2.1 Exozomy

Exozomy mají velikost od 40 do 160 nm v průměru, vytvářejí se v buňce endocytózou a jsou inkorporovány do struktury známé jako multivezikulární tělísko (MVB) (viz obr. 1). Poté se MVB splývá s plazmatickou membránou (PM) a uvolňuje svůj obsah exozomů do extracelulárního prostoru. Tento proces zahrnuje dvojitou invaginaci PM, přičemž nejprve vzniká struktura s bílkovinami z povrchu a vnitřní části buňky, což vede k *de novo* vzniku časných endozomů (ESEs), které mohou dále formovat pozdní endozomy (LSEs) a v konečném důsledku i MVBs. Uvnitř MVBs se nachází intraluminární váčky (ILVs) – budoucí exozomy, které se mohou lišit velikostí a obsahem, protože každá invaginace membrány zahrnuje mimo jiné i její modifikaci. Dále existuje několik možností pro biogenezi MVBs. MVBs mohou přímo vstupovat do lyzozomu, nebo nejprve fúzovat s autofagosomem, ale ve výsledku jejich obsah bude degradován lyzozomem. Třetí variantou je transport MVBs do PM přes mikrotubulární síť s následující exocytózou a uvolňováním exozomů (Kalluri et al. 2020).

Exozomy byly detekovány například v krevní plazmě (Caby et al. 2005), mozkomíšním moku (Akers et al. 2016), mateřském mléce (Hata et al. 2010), plodové vodě a moči (Keller et al. 2007).

2.2 Mikrovezikuly

Mikrovezikuly (MVs) (také nazývané mikročástice nebo ektozomy) vznikají pučením plazmatické membrány a mají membránu a obsah podobný PM a cytosolu původní buňky (viz obr. 1). Ačkoli se o MVs mluví jako o strukturách o průměru 100–1000 nm, nemusí mít omezenou velikost,

protože jsou uvolňovány přímo z PM a mohou dosahovat i velikosti exozomů (Cruz et al. 2018). MVs byly detekovány v placentě (Tong et al. 2017), trombocytech, trofoblastu (Pap et al. 2008), nádorových a kmenových buňkách (Haraszi et al. 2016).

Formování MVs probíhá prostřednictvím reorganizací cytoskeletu a narušení buněčného kortexu buď zvýšením koncentrace Ca^{2+} , nebo inhibicí syntézy PIP2 (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát), který hraje roli v připojení PM regulací adheze mezi ní a cytoskeletem (Raucher et al. 2000). Vnitřní strana PM obsahuje fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin, jejichž určitý poměr je kontrolován enzymy skramblázou, flopázou a translokázou (Pap et al. 2009). Změna intracelulární koncentrace Ca^{2+} mění asymetrickou distribuci fosfolipidů inhibicí translokázy a aktivací skramblázy tak, že fosfatidylserin a fosfatidylethanolamin se přemístí na vnější stranu PM, což vede k reorganizaci cytoskeletu (Camussi et al. 2010). Kromě toho Ca^{2+} ionty aktivují calpain a gelsolin, což jsou cytosolové proteázy, které štěpí talin a α -actinin (calpain) a proteiny inhibující capping (gelsolin). Štěpení proteinů vede k narušení buněčného kortexu, pučení membrány a tvorbě mikrovezikulů (Pap et al. 2009).

2.3 Exozomy a mikrovezikuly jako mechanismus komunikace mezi buňkami

Exozomy a mikrovezikuly slouží k mezibuněčné komunikaci, a proto budou diskutovány společně. Nejdůležitějším faktorem EVs pro komunikaci je schopnost pronikat tkáněmi přes pericelulární a extracelulární matrix (ECM), a to jak lokálně, tak i na větší vzdálenosti. Po průchodu ECM část EVs musí projít bariérou endoteliálních buněk kožní a cévní soustavy (van Niel et al. 2022). Část EVs může být pravděpodobně odstraněna makrofágy a endoteliálními buňkami nebo skončit v detoxikačním orgánu, jako jsou játra. Tento osud vykazují například cirkulující extracelulární váčky nádorů (Hyenne et al. 2019) a EVs embryí *Danio rerio* (Verweij et al. 2019). Většina ale dorazí do cílových buněk. Proces příjmu EVs je dobře prozkoumán, zatímco mechanismy nasměrování do buněk stále nejsou plně objasněny a je zapotřebí dalšího výzkumu v této oblasti (van Niel et al. 2022).

Příjem EVs cílovou buňkou závisí jak na typu buňky, tak i na specifickém zapojení receptorů buněk a ligandů asociovaných s EVs. Po interakci váčků s cílovými buňkami se spouští buněčné signální kaskády (Sedgwick et al. 2018). Tak například interakce exozomů B-lymfocytů s fibroblastem spouští integrin-dependentní změny cytosolického Ca^{2+} (Clayton et al. 2004). Také bylo zjištěno, že TfR2 (transferinový receptor 2) aktivuje kaskádu p38 MAPK (p38 proteinkináza aktivovaná mitogeny) (Calzolari et al. 2006). Nejprve EVs interagují s buňkou prostřednictvím receptorů. Následná absorpce obsahu váčků zahrnuje několik různých mechanismů včetně endocytózy nezávislé na klathrinu, makropinocytózy (Costa Verdera et al. 2017), endocytózy lipidových raftů (Svensson et al. 2013) a fagocytózy (Feng et al. 2010). Po příjmu cílovou buňkou dojde k fúzi buněčné membrány s membránou endozomu. To zajistí přenos obsahu váčků do cytosolu, popřípadě mohou být EVs přeneseny do lysozomů nebo odstraněny transcytózou (Cocucci et al. 2009).

2.4 Apoptotická tělíska

Dalším typem extracelulárních váčků jsou apoptotická tělíska, která se formují v průběhu jednoho z hlavních typů programované buněčné smrti (apoptózy) (György et al. 2011). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 1 až 5 μm v průměru a na rozdíl od mikrovezikulů a exozomů obsahují fragmenty buněčného jádra a odpadní látky. Apoptotická tělíska nemají proteinové markery na povrchu a nehrají roli v extracelulární komunikaci (Yáñez-Mó et al. 2015). Přestože apoptotická tělíska mají velký význam, v této práci se jich dotýkám jen stručně a nebudu se k nim dále vracet, protože jejich funkce a role jsou více spojeny s tématem apoptózy než s hlavní problematikou.

2.5 Obsah extracelulárních váčků

Mikrovezikuly a exozomy obsahují proteiny (Greening et al. 2016), lipidy (Llorente et al. 2007), DNA, mRNA (mediátorová RNA) (Waldenström et al. 2012) a microRNA (miRNA) (Yuan et al. 2009) (pro představu a srovnání viz tab. 1). Obsah EVs ukazuje původ a typ buňky, ze které byl vezikul odvozen.

Charakteristika	Exozomy	Mikrovezikuly	Apoptotická tělíska
Velikost (nm)	40–160	100–1000	1000–5000
Původ	MVB	Plazmatická membrána	Plazmatická membrána
Mechanismus formování	Exocytóza MVB	Pučení z plazmatické membrány	Pučení z plazmatické membrány
Funkce	Mezibuněčná komunikace	Signalizace	Odstranění buněčných fragmentů
Charakteristické bílkoviny	Rab GTPazy, ARF6, flotilliny, ALIX, TSG101	ARF6, glykoprotein Ib, tubulin	Proteiny buňky
Charakteristické lipidy	Ceramidy, fosfatidylserin, lysobisfosfatidová kyselina	Cholesterol, fosfatidylserin	Fosfatidylserin
Charakteristické proteinové markery	Tetraspaniny (CD9, CD63, CD81)	Integriny, selektiny	Nemají
Potenciální aplikace	Biomarkery, cílená terapie	Biomarkery	Studium apoptózy, kontrola buněčné smrti

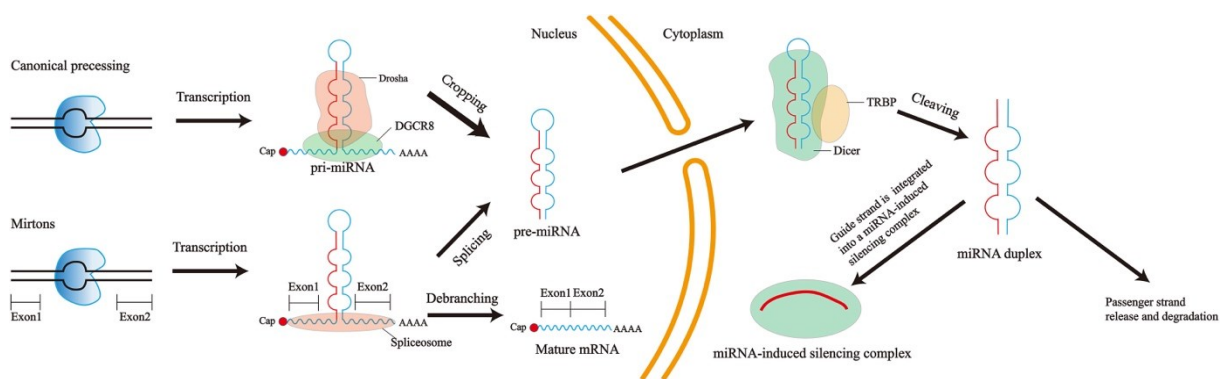
Tab. 1 Porovnání charakteristik extracelulárních váčků. Informace pro tabulku byla převzata z Bickel et al. 1997; Heijnen et al. 1999; Al-Awar et al. 2000; Caby et al. 2005; Morita et al. 2007; György et al. 2011; Di Vizio et al. 2012; Record et al. 2014; Yáñez-Mó et al. 2015; Cruz et al. 2018; Sun et al. 2019; Kalluri et al. 2020; Martinez-Arroyo et al. 2021; Matsui et al. 2021.

2.5.1 MicroRNA

EVs obsahují různé bioaktivní molekuly, včetně microRNA, které jsou schopné regulovat klíčové signální dráhy a tím řídit vývoj embrya (Gross et al. 2017). MiRNA představují nekódující

jednovláknové řetězce RNA o délce 21-23 nukleotidů, které hrají významnou roli při regulaci genové exprese buněk. MiRNA inhibují translaci mRNA a indukují její degradaci tím, že se vážou na 3' UTR (3' nepřekládaná oblast) cílové mRNA (Guo et al. 2010; Xie et al. 2023). V průběhu exprese jsou miRNA nejprve přepsány RNA-polymerázou II do dvouvláknových pri-miRNA (primární microRNA) transkriptů (Lee et al. 2004). V kanonické dráze vzniku miRNA, komplex Drosha-DGCR8 štěpí pri-miRNA na úseky o délce přibližně 70 nukleotidů, tzv. pre-miRNA (prekurzor microRNA) (Lee et al. 2003). Dochází k transportu přes jaderné póry do cytoplazmy, kde se uplatňuje endoribonukleáza DICER, která štěpí fragmenty na menší úseky o délce kolem 20 nukleotidů za pomoci TRBP (trans-activation response element RNA-binding protein). Následně je jedno vlákno integrováno do RISC (komplex umlčování RNA) a podílí se na umlčování genů, zatímco druhé vlákno je degradováno (Xie et al. 2023).

Existuje také nekanonická dráha, ve které jsou pre-miRNA syntetizovány přímo z intronů a nezahnují komplex Drosha-DGCR8 (Ruby et al. 2007). Pro představu kanonické a nekanonické dráhy microRNA viz obr. 2.



Obr. 2: Biogeneze microRNA. Horní část (kanonická dráha): přepis RNA-polymerázou II do dvouvláknových pri-miRNA transkriptů, štěpení pri-miRNA komplexem Drosha-DGCR8 na pre-miRNA, transport přes jaderné póry do cytoplazmy, DICER a TRBP štěpí pre-miRNA na menší úseky. Jedno vlákno jde do RISC a druhé vlákno je degradováno. Dolní část (mitrony): přepis RNA-polymerázou II do dvouvláknových pri-miRNA transkriptů, sestřih pri-miRNA na spliceosomu. Vznik zralé mRNA a pre-miRNA, která po výstupu z jádra podléhá stejným procesům jako v kanonické dráze. Převzato z Xie et al. 2023.

MiRNA ovlivňují expresi přibližně 60 % genů kódujících proteiny (Friedman et al. 2009), přičemž u řady organismů se miRNA podílí na vývojových procesech. Například u *Drosophila melanogaster* miRNA regulují geny *bicoid*, *hunchback*, *caudal*, *staufen*, *arrest* a *bruno-2*, a také některé geny skupiny Hox, které tvoří anterior-posteriorní osu (Enright et al. 2003). EVs a miRNA mohou sloužit jako biomarkery (případně i v klinické praxi), o čemž bude rovněž pojednáno v následujících částech této práce.

2.5.2 Proteiny podílející se na biogenezi exozomů

Proteiny, které se účastní biogeneze exozomů, zahrnují Rab GTPazy, ARF6 (ADP-ribosylační faktor 6), flotiliny a další cytoplazmatické a membránové proteiny. Rab GTPazy jsou hlavními regulátory vezikulárního transportu, zahrnujícího exocytózu, endocytózu, sekreci exozomů a intracelulární doručování EVs (Martinez-Arroyo et al. 2021). Flotiliny jsou součástí lipidových raftů a podílejí se na endocytóze a přenosu signálů (Bickel et al. 1997). ARF6 má řadu funkcí, mezi něž patří například regulace pohybu membrány, tedy transport vezikulů (Al-Awar et al. 2000) a interakce s Rab GTPázami (Fielding et al. 2005).

Proces exocytózy je zajištěn aktivací cytoskeletu a je regulován p53, který transkribuje gen *TSAP6* (tumor suppressor activated pathway-6) indukující sekreci exozomů (Yu et al. 2006). Kromě toho exozomy obsahují proteiny ALIX a TSG101 (tumor susceptibility gene protein 101), které se podílejí na tvorbě multivezikulárních tělísek prostřednictvím pučení vnitřních membrán. Tyto proteiny patří k endozomálnímu třídícímu mechanismu ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), jehož součástí jsou tři proteinové komplexy ESCRT-I, ESCRT-II a ESCRT-III (Morita et al. 2007). ALIX je spojen s komplexem ESCRT-III a účastní se mechanismu ALIX–Syntenin1–Syndecan1, který slouží k uvolňování exozomů z epiteliálních buněk (Matsui et al. 2021).

Exozomy mohou obsahovat HSP70 (protein teplotního šoku 70) (Lancaster et al. 2005) a HSP90 (protein teplotního šoku 90), které jsou uvolňovány buňkami v reakci na stres. HSP90 kromě své hlavní funkce také vykazuje schopnost ovlivňovat deformaci plazmatické membrány, což podporuje uvolňování váčků (Lauwers et al. 2018). V exozomech jsou přítomny také cytoskeletální proteiny (aktin, myosin a tubulin) a s nimi spojené proteiny (Keerthikumar et al. 2015). Exozomy mají na povrchu membrány proteinové markery, například tetraspaniny CD9 (cluster of differentiation 9), CD81 (cluster of differentiation 81), CD63 (cluster of differentiation 63). Tyto markery se běžně používají k určení buněčné linie, ze které byly odvozeny (Caby et al. 2005). Proteiny, které exozomy obsahují, mají také velký význam při charakterizaci nádorů (Li et al. 2023).

2.5.3 Proteiny podílející se na biogenezi mikrovezikulů

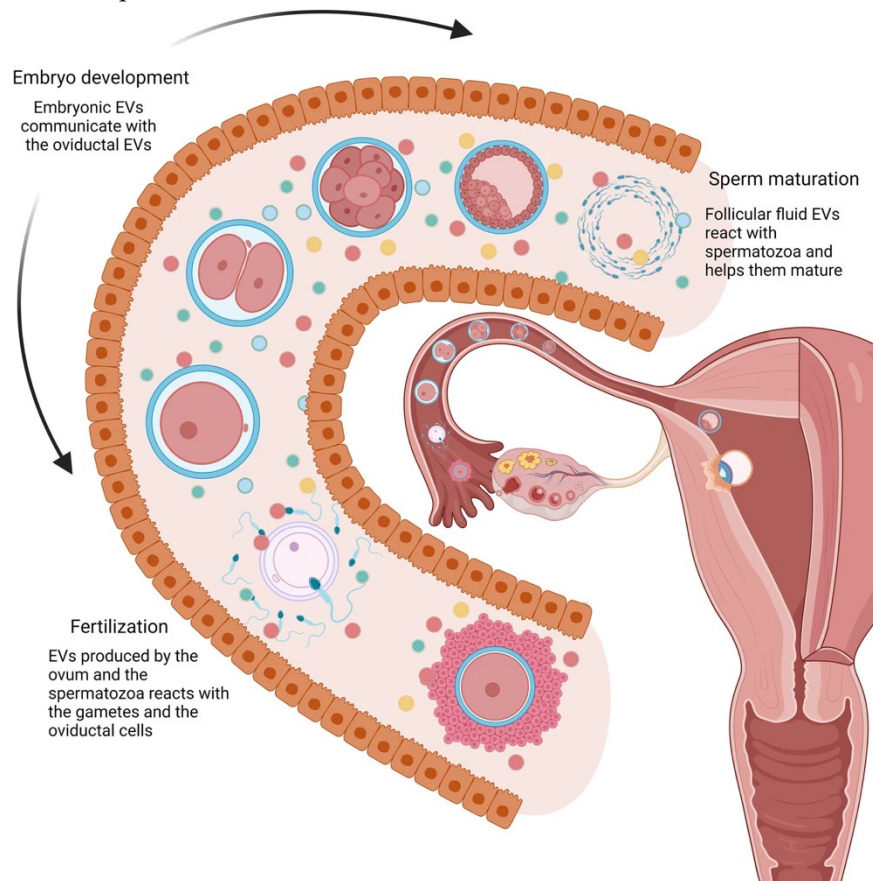
MVs obsahují bílkoviny odlišné od exozomů kvůli svému vzniku z PM. Například MVs mají větší obsah tubulinu a menší obsah tetraspaninů CD9 a CD81, které jsou typickými markery pro exozomy (Menck et al. 2017). Bylo zjištěno, že MVs v trombocytech obsahují glykoprotein Ib, integriny a P-selektin (Heijnen et al. 1999). P-selektin je adhezivní molekulou na povrchu, se kterou interaguje glykoprotein Ib. Tyto proteiny spolu se vztahují k roli trombocytů přichycovat se k poškozeným místům v cévách (Romo et al. 1999). Integriny jsou membránové receptory, přenášející různé mezibuněčné signály. Tak například spolupůsobí s bílkoviny na povrchu trofoblastů a aktivují signální kaskády, což následně vede k migraci trofoblastů při implantaci (Desrochers et al. 2016). Dále v MVs a onkosomech (kategorii nádorových mikrovezikulů) byl identifikován ARF6, což je GTP-vazebný protein společný s exozomy, který může sloužit jako biomarker nádoru (Di Vizio et al. 2012).

2.5.4 Lipidy extracelulárních váčků

Extracelulární vezikuly jsou obaleny dvouvrstevnou membránou obsahující různé lipidy v závislosti na původu váčků. EVs jsou obvykle obohaceny o fosfatidylserin, glykosfingolipidy, cholesterol a sfingomyelin, které poskytují tuhost, stabilitu a zvýšenou odolnost vůči fyzikálně-chemickým změnám (Sun et al. 2019; Yáñez-Mó et al. 2015). Některé lipidy se podílejí na formování a regulaci EVs. Cholesterol například hraje roli při uvolňování vezikulů (Llorente et al. 2007). Lysobisfosfatidová kyselina je důležitá pro tvorbu MVBs a biogenezi ILVs (Record et al. 2014). Ceramid se podílí na tvorbě ILVs a uvolňování váčků indukci negativního zakřivení membrány. Zároveň umožňuje třídění obsahu v lipidových raftových doménách (Trajkovic et al. 2008). Kromě strukturální a regulační funkce lipidy jsou přenášeny mezi buňkami jako bioaktivní molekuly a řídí další procesy. EVs nesou především cholesterol, nasycené a nenasycené mastné kyseliny, nejčastěji kyselinu arachidonovou (Record et al. 2014).

3. Extracelulární váčky v reprodukci

V procesech reprodukce člověka, těhotenství a ontogeneze hrají klíčovou roli mechanismy mezibuněčné komunikace, které mimo jiné zahrnují i komunikaci prostřednictvím extracelulárních váčků. EVs se uplatňují při folikulogenezi (EVs folikulární tekutiny) (Navakanitworakul et al. 2016), oogenezi (EVs kumulárních buněk) (Fiorentino et al. 2024), fertilizaci (epididymozomy, uterozomy) (Griffiths et al. 2008a), implantaci (endometriální EVs) (Greening et al. 2016) a podílejí se na kvalitě embrya (embryonální EVs) (Dissanayake et al. 2020). Obr. 3 ukazuje vliv některých EVs, které se účastní reprodukčních procesů.



Obr. 3: Vliv extracelulárních vezikulů na reprodukční procesy. Obrázek znázorňuje hlavní fáze časného vývoje do implantace a ukazuje vliv EVs na procesy fertilizace, maturace spermií a vývoje embrya. Převzato z Fazeli et al. 2024.

Výzkumy na embryích skotu (Mellisho et al. 2017), prasat (Saadeldin et al. 2014), myší (Tan et al. 2020b) a člověka (Giacomini et al. 2017) prokázaly přítomnost EVs v kultivačním médiu ve stadiích moruly (Melo-Baez et al. 2020) a blastocysty (Mellisho et al. 2017).

3.1 Význam extracelulárních váčků pro fertilizaci

3.1.1 Vliv na spermie

Spermie podstupují maturaci v reprodukčním traktu za účasti extracelulárních vezikulů z folikulární tekutiny. Tyto vezikuly podporují jejich životaschopnost, indukují kapacitaci a akrozomální reakci. Tyto účinky jsou zprostředkovány povrchovými proteiny EVs, protože jejich aktivita se ztrácí po ošetření trypsinem, jak bylo naznačeno u skotu (Hasan et al. 2021). U myši bylo prokázáno, že během procesu kapacitace získává plazmatická membrána spermií různé proteiny, například PMCA4 (plazmatická membránová Ca^{2+} ATPáza 4). Přenos izoformy PMCA4a probíhá prostřednictvím CD9 exozomů z děložních tekutin (uterozomy) a tekutin vejcovodu (Al-Dossary et al. 2013). Myší PMCA4 je membránový protein zodpovědný za udržování homeostázy Ca^{2+} , který odstraňuje jeho přebytečné množství po kapacitaci a zároveň brání předčasné akrozomální reakci (Wennemuth et al. 2003; Okunade et al. 2004). Delece genu *Pmca4* způsobuje poruchy pohyblivosti spermií, což vede k neplodnosti u samců myši (Schuh et al. 2004). U samic se v extracelulárních váčcích vejcovodu nachází PMCA1 (plazmatická membránová Ca^{2+} ATPáza 1), který při absenci PMCA4 plní náhradní funkci, čímž podporuje plodnost (Bathala et al. 2018).

Dalším proteinem přenášeným pomocí EVs je SPAM1 (hyaluronidáza PH-20), což je GPI-vázaný protein, který se může vázat na povrch spermií, usnadňovat jejich průnik a zároveň modifikovat další povrchové proteiny (Zhang et al. 2003; Griffiths et al. 2008b). Průnik je usnadněn hyaluronidázovou aktivitou SPAM1, protože extracelulární matrix kumulárních buněk obklopujících oocyt obsahuje kyselinu hyaluronovou (Griffiths et al. 2008b). SPAM1 je absorbován prostřednictvím vezikulů uvolněných z epididymální tekutiny (epididymozomy) a z lumenu děložní tekutiny (uterozomy). Inkubace spermií s epididymozomy a uterozomy potvrdila absorpci SPAM1 spermiemi, a to pouze v případě, kdy nedošlo k odstranění GPI kotvy (Griffiths et al. 2008a).

Bylo prokázáno zvýšení počtu spermií s akrozomální reakcí po inkubaci s vaginozomy (VGS) získanými z vaginální tekutiny. Ve VGS byly identifikovány již známé proteiny PMCA1, PMCA4 a SPAM1 (Fereshteh et al. 2019).

Prostazomy jsou vezikuly ze semenné plazmy, také přenášejí proteiny, které mohou ovlivňovat akrozomální reakci, což bylo prokázáno na prasečích spermiích *in vitro* (Siciliano et al. 2008). U člověka jsou rovněž přítomny prostazomy, které mohou přenášet na spermie různé molekuly, včetně PMCA4 (Andrews et al. 2015). Předpokládá se, že *in vivo* bude získávání proteinů z VGS u ejakulovaných spermií menší, protože určité množství již bylo absorbováno během interakce s prostazomy (Fereshteh et al. 2019).

EVs se mohou také podílet na prevenci polyspermie. Aby mohlo dojít ke splynutí membrán, jsou zapotřebí interakce ligandu a receptoru – v tomto případě proteinu IZUMO1 (fúzní protein spermie a vajíčka IZUMO1) na spermií a JUNO na oocytu. Bylo prokázáno, že JUNO je po fertilizaci uvolněn z membrány oocytu do vezikulů, čímž vytváří tzv. falešnou zónu vajíček, která neutralizuje spermie a zvyšuje účinnost ochrany proti polyspermii (Bianchi et al. 2014).

3.1.2 Vliv na oocyt

Vezikuly byly detekovány během fertilizace. Předpokládá se, že CD9 exozomy, které jsou vylučovány z oocytu, usnadňují fúzi se spermií indukcí tvorby mikroklků na povrchu oocytu (Miyado et al. 2008). Mikroklky následně slouží k zachycení spermií (Runge et al. 2007). Kromě toho bylo prokázáno, že současná absence tetraspaninů CD9 a CD81 vede k poruchám plodnosti (více než 95 % pro CD9 a 40 % pro CD81), absence obou k neplodnosti (Rubinstein et al. 2006).

3.2 Extracelulární váčky vejcovodu

Jak napovídá jejich název, extracelulární váčky vejcovodu (oEVs), neboli oviduktozomy, jsou vylučovány epitelem vejcovodu a ovlivňují řadu procesů, včetně oplodnění a vývoje embrya. Tyto vezikuly mohou přenášet na ZP protein OVGP1 (ovidukt-specifický glykoprotein) (Alcántara-Neto et al. 2020), který se podílí na zpevnění ZP, což je klíčové pro transport oocytu ampulí vejcovodu (Coy et al. 2008). Odstranění C-koncové sekvence proteinu zvyšuje citlivost ZP na degradaci proteázami. Samotná C-koncová sekvence usnadňuje průnik spermií a zároveň hraje roli v endocytóze proteinu OVGP1 (Algarra et al. 2016). Výše popsany mechanismus nebyl u člověka prokázán, ale byl pozorován u krav, prasat, koz, ovcí a králíků (Mondéjar et al. 2013).

Oboustranná interakce mezi buňkami vejcovodu a embryem může vést ke změnám v obsahu miRNA v oviduktozomech, a tím předávat matce informaci o přítomnosti embrya. Například miR-7704, miR-2904 a miR-2861 byly rozpoznány jako markery přítomnosti embrya (Hamdi et al. 2024). Potvrzení těchto výsledků vyžaduje další experimenty. MiR-2904 byla rovněž detekována v jiné studii během kompaktace u embryí skotu (Melo-Baez et al. 2020). Dále bylo prokázáno, že microRNA-148b ovlivňuje buněčnou diferenciaci a proliferaci v 16buněčném stádiu vývoje embrya. Bylo zjištěno, že miR-148b navozuje zvýšení počtu buněk trofoblastu a vnitřní buněčné masy, což naznačuje klíčovou roli v signálních drahách odpovědných za tyto procesy (Cañón-Beltrán et al. 2024).

U skotu oEVs obsahují některé metabolity, například myo-inositol, laktát, glukóza-1-fosfát, maltózu, glycin, přičemž jejich koncentrace se mění během estrálního cyklu. Myo-inositol je hlavním metabolitem v oEVs (Gatien et al. 2019). Jeho přidání do kultury *in vitro* zvýšilo schopnost vývoje blastocyst (Lim et al. 2007). Předpokládá se, že oEVs mohou poskytovat embryu myo-inositol a další molekuly během průchodu vejcovodem, a tím podporovat jeho vývoj (Gatien et al. 2019).

Mnohé studie ukázaly zlepšení kvality embryí různých živočišných druhů při kultivaci *in vitro* s přidáním oEVs. Například váčky ovidukální tekutiny králíků vedly ke snížení hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) (Qu et al. 2020), které ve vysokých koncentracích mohou negativně ovlivnit růst embrya a zvýšit poškození DNA. U myších embryí po přenosu bylo prokázáno, že míra narozených mláďat se zvyšuje při společné předchozí kultivaci s oEVs, a to díky snížení exprese aktivátoru apoptózy BAX (bcl-2 podobný protein 4) (Qu et al. 2019). Současně byla zvýšena exprese blokátoru apoptózy BCL2 (B-lymfomový protein 2), který působí jako antagonist BAX (Zhai et al. 2008), a genu pluripotence *Oct4* (Qu et al. 2019).

3.3 Endometriální extracelulární váčky

Jak již bylo řečeno, fyziologická implantace hraje klíčovou roli při pokračování těhotenství. Během prvních kroků implantace dochází ke komunikaci mezi buňkami trofoblastu a endometriálním epitelem pomocí EVs, což zvyšuje adhezivní schopnost trofoblastu, mimo jiné prostřednictvím signální dráhy FAK (fokální adhezivní kináza) (Greening et al. 2016). FAK je známá svou účastí v buněčné adhezi a migraci, stejně jako v procesu implantace (Kaneko et al. 2012). Embrya kultivovaná s exozomy epiteliálních buněk endometria *in vivo* vykazovala zvýšení počtu blastomer, zvýšenou míru *hatchingu* a také zlepšenou implantaci (Gurung et al. 2020).

Klíčovými pro procesy během implantace jsou proteiny fibulin-1, CYR61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61), faktor urychlující rozklad komplementu (CD55, cluster of differentiation 55), perlecan a alanin aminopeptidáza (Greening et al. 2016). Fibulin-1 potlačuje adhezi buněk (Twal et al. 2001). CD55 je ve velkém množství přítomen během implantačního okna a také se uplatňuje při deciduálnízaci, snížení jeho hladiny může indukovat reprodukční poruchy (Tang et al. 2022). Perlecan hraje roli při adhezi buněk a usnadňuje připojení trofoblastu (Carson et al. 1993). Bylo prokázáno, že jeho hladina se zvyšuje během implantace, zejména při diferenciaci endometriální tkáně na deciduální tkáň (Huyen et al. 2011). CYR61 pravděpodobně podporuje růst děložních cév k embryu (Mo et al. 2002). Alanin aminopeptidáza má vliv na receptivitu endometria, přičemž jeho hladina závisí na věku matky a s tím i na její reprodukční schopnosti (Shui et al. 2019). Byly nalezeny i další proteiny EVs, které regulují adhezi, proliferaci a buněčný cyklus. Většina proteinů endometriálních váček nebyla u jiných typů EVs identifikována (Greening et al. 2016).

Altmäe et al. 2017 identifikovali až 57 genů, které jsou spojeny s exozomy, podílejí se na implantaci a receptivitě endometria a mohou sloužit jako biomarkery. Jeden z těchto genů je *SPP1* (sekretovaný fosfoprotein 1, osteopontin), který se váže na integriny a stimuluje adhezi endometriálního epitelu a TE v raných fázích implantace (Kang et al. 2014).

3.3.1 MicroRNA v komunikaci mezi endometriem a embryem

MiRNA mohou také působit jako prostředníci mezibuněčné komunikace mezi endometriem a embryem, ovlivňují implantaci, adhezi a remodelaci extracelulárního matrix.

Hsa-miR-30d, detekována v EVs endometria, zvyšovala expresi deseti genů v buňkách TE, včetně těch, které kódují adhezivní molekuly. Přítomnost této miRNA vedla u kultivovaných myších embryí ke zvýšení adheze ve srovnání s inhibitorem hsa-miR-30d. Předpokládá se, že podobný mechanismus může existovat i u embryí člověka (Vilella et al. 2015).

MiR-100-5p, obsažená v endometriálních vezikulech ovlivňuje migraci a invazi trofoblastových buněk prostřednictvím aktivace signalizace FAK. Kromě toho miR-100-5p podporuje angiogenezi, která je nezbytná pro implantaci (Tan et al. 2020a).

Analýza EVs děložní dutiny ukázala přítomnost dalších microRNA, přičemž nejčastěji zastoupenými byly hsa-miR-200c, hsa-miR-17 a hsa-miR-106a. Statistická analýza identifikovala

cílové geny těchto miRNA, které aktivují signální dráhy spojené s implantací, například dráhu VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a dráhu interakce ECM ligandu a receptoru (Ng et al. 2013). VEGFA (faktor A) a jeho dva receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 se podílejí na regulaci růstu cév, včetně růstu v endometriu (Möller et al. 2001). Bylo prokázáno, že hladina VEGFA v děložní tekutině během implantačního okna byla snížena u žen s neplodností ve srovnání s fertilitními ženami, což může naznačovat jeho roli v procesech adheze (Hannan et al. 2011). Dalším příkladem signální dráhy spojené s implantací je dráha ECM ligandu fibronektinu, který je přítomen v trofoblastu a vnitřní buněčné mase blastocysty potkana. Fibronektin se váže na integriny, a tím se podílí na procesu připojení blastocysty (Kaneko et al. 2013).

Analýza obsahu miRNA v uterozomech během střední luteální fáze estrálního cyklu odhalila další signální dráhy, které mohou být regulovány EVs v průběhu těhotenství. Bylo identifikováno až 59 miRNA specificky přítomných v uterozomech, které pravděpodobně modulují až 78 signálních drah, mimo jiné darhu Hippo (viz podrobněji kapitola 4.2), WNT a dráhy související s absorpcí a transportem lipidů (Mazzarella et al. 2024). Předpokládá se například, že bta-miR-873 a bta-miR-18a regulují expresi genu *Plin2* (perilipin 2), který inhibuje degradaci lipidů, a tím podporuje jejich akumulaci ve formě cytoplazmatických lipidových kapének, což bylo prokázáno u embryí skotu. Tyto miRNA snižují expresi *Plin2*, což může být využito ke zvýšení viability embryí po rozmražení (Mazzarella et al. 2024; Sastre et al. 2014). Kanonická signální dráha WNT se podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciace a adheze. Její aktivace v pátém dni vývoje vedla ke snížení úspěšnosti formování blastocysty, což je spojeno s narušením E-kadherinem zprostředkovaných buněčných kontaktů a inhibicí diferenciace TE. Přesto inhibice této dráhy pomocí antagonisty WNT nevedla ke zlepšení vývoje (Denicol et al. 2013).

3.4 Imunomodulace prostřednictvím extracelulárních váčků

Extracelulární váčky hrají důležitou roli v regulaci imunitního systému matky, protože signalizují děloze přítomnost implantujícího se embrya.

Inhibice imunitní odpovědi probíhá i pomocí miRNA. Některé miRNA obsažené ve váčcích pocházejících z epiteliálních buněk endometria skotu, jako bta-miR-26b a bta-miR-98, mají roli v modulaci funkce imunitního systému v období implantace. Předpokládá se, že bta-miR-26b může potlačovat aktivaci neutrofilů, které představují první linii obrany během zánětlivé reakce (Nakamura et al. 2019; 2021). Dalším příkladem je izoforma HLA-G5 (lidský leukocytový antigen G5), která je produkována cytotrofoblasty a vyloučena prostřednictvím exozomů (Kshirsagar et al. 2012). Následně může interagovat s CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty a zvyšovat expresi IL-10 (interleukin 10), a tím vytvářet imunitní toleranci vůči plodu (Atay et al. 2011a).

V exozomech byly identifikovány geny hrající roli při tlumení vrozené imunity po rozpoznání embrya imunitním systémem matky. Mezi jejich produkty se nachází C4BP (C4b vazebný protein)

(Altmäe et al. 2017), protein inhibující komplement, který pravděpodobně chrání embryo před imunitním útokem mateřského komplementu (Tapia et al. 2011).

Prozánětlivé prostředí může být ovlivněno EVs, které jsou vylučovány trofoblastovými buňkami a obsahují fibronektin. Fibronektin ve vāčcích podporuje aktivaci monocytů a makrofágů, které uvolňují prozánětlivé cytokiny, zejména IL-1 β (interleukin 1 beta), a chemokiny, čímž vytvářejí zánět a zvyšují počet monocytů nezbytných pro podporu angiogeneze a růst trofoblastu. Aktivace těchto imunitních buněk probíhá mechanismem zahrnujícím absorpci EVs (Atay et al. 2011a; 2011b).

EVs se také podílejí na indukci apoptózy, kterou procházejí endometriální buňky skotu v místě implantace. EVs regulovaly expresi několika genů spojených s apoptózou, konkrétně již zmíněného *Bax*, *Casp3* (kaspáza 3), *Tnfa* (TNF- α , faktor nádorové nekrózy alfa) a dalších (Kusama et al. 2018). U myši byla například nejvyšší koncentrace kaspázy 3 pozorována 14. den březosti během regrese *decidua basalis*, která interaguje s trofoblastem, a mírně nižší během samotné implantace (Shooner et al. 2005). TNF- α je také klíčovým prozánětlivým faktorem, jehož vysoké hladiny však mohou korelovat s neúspěšnou implantací a potratem (Lv et al. 2022).

Tímto způsobem EVs vytvářejí rovnováhu mezi zánětlivým a imunosupresivním prostředím, čímž se podílejí na vytváření a udržení optimálních podmínek pro úspěšnou implantaci.

3.5 Extracelulární váčky embrya

Efekt extracelulárních váček embrya je méně objasněný než u předchozích typů. Nicméně se předpokládá jejich vliv na modifikaci prostředí během společné kultivace a na změny exprese genů.

3.5.1 Společná kultivace embryí

Výsledky výzkumů ukázaly, že embrya kultivovaná ve skupinách častěji dosáhnou stádia blastocysty a vykazují nižší úroveň apoptózy ve srovnání s embryi kultivovanými samostatně. To bylo prokázáno ve studiích provedených na myších (Lane et al. 1992), ovčích (Gardner et al. 1994), kravách (Ferry et al. 1994) a dokonce i na lidech (Sun et al. 2014).

Je pravděpodobné, že společná kultivace má pozitivní vliv mimo jiné i díky EVs, které si embrya mezi sebou vyměňují (Saadeldin et al. 2014). Předpokládá se, že embrya modifikují své mikroprostředí pomocí růstových faktorů a signálních molekul, které částečně kompenzují jejich nedostatek za *in vitro* podmínek. Například se v těchto interakcích uplatňuje signální dráha receptorů PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), která reguluje metabolismus lipidů (Wydooghe et al. 2017). PPAR jsou transkripční faktory jaderných receptorů tří typů: PPAR α , PPAR γ a PPAR δ . Jejich aktivace probíhá prostřednictvím vazby na tzv. lipofilní autokrinní embryotropiny, jako jsou prostaglandiny a mastné kyseliny, které jsou přenášeny uvnitř exozomů. PPAR β ovlivňuje AKT1 (RAC-alfa serin/threonin-proteinkináza) prostřednictvím enzymu PDK1 (3-fosfatidylinositol-dependentní proteinkináza 1).

AKT1 je jedním z enzymů rodiny proteinkináz B, který se podílí na dráze PI3K/AKT/mTOR, odpovědné za proliferaci buněk a inhibici apoptózy (Di-Poi et al. 2002; Wydooghe et al. 2017).

Kultivace skupiny tří lidských embryí indukovala ve srovnání s individuální kultivací lepší vývoj do blastocyst. Zajímavé je také, že skupina čtyř embryí vykazovala horší výsledky, což by mohlo být důsledkem nízké kvality embryí, která mohla potenciálně uvolňovat do prostředí negativní faktory (Sun et al. 2014). V jiné studii bylo také potvrzeno zvýšené formování blastocyst při skupinové kultivaci a kromě toho byla pozorována tendence k úspěšnější implantaci a vývoji po přenosu. Nicméně tyto hodnoty jsou statisticky nevýznamné (Ebner et al. 2010).

Jiná studie na prasečích embryích ukázala zvýšenou expresi mRNA genů pluripotence *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* a *Nanog* během společné kultivace embryí, což nakonec také vedlo ke zvýšení úspěšnosti vývoje *in vitro*. *Oct4*, *Sox2* a *Klf4* byly exprimovány během vývoje embrya, *c-Myc* byl exprimován přerušovaně a *Nanog* byl exprimován v pozdní fázi blastocysty (Saadeldin et al. 2014).

3.5.2 Změny exprese genů

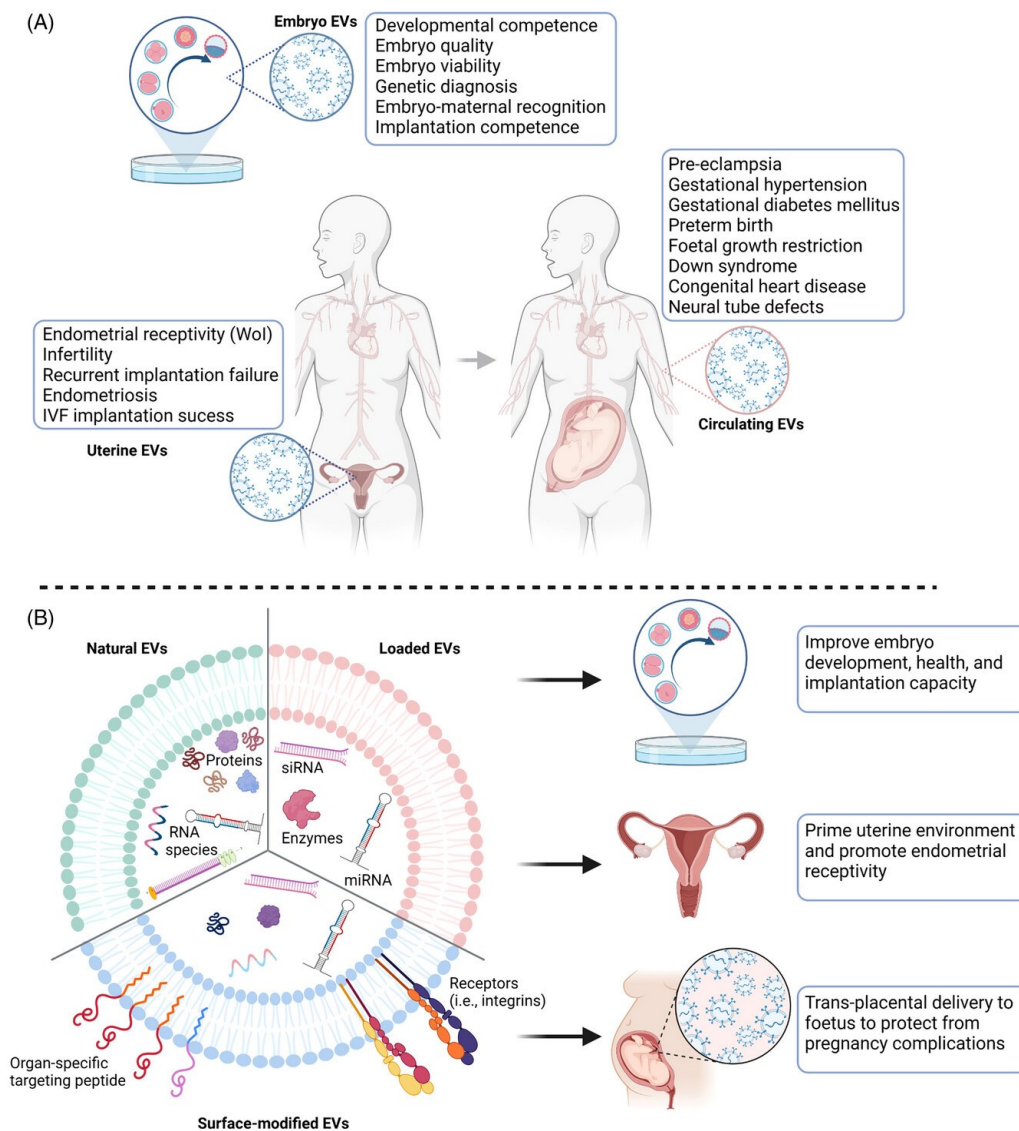
Pro důkaz komunikace mezi matkou a embryem byla použita kultura epiteliálních buněk bovinního vejcovodu (BOEC) *in vitro*, která napodobovala charakteristiky vejcovodu *in vivo*. BOEC byla kultivována s embryi. V tomto modelu byla v buňkách vejcovodu snížena exprese některých složek signální dráhy BMP (kostní morfogenetický protein), která je odpovědná za tvorbu tkání. Konkrétně byly sníženy hladiny ligandu BMP7, signálního mediátoru SMAD1 (člen rodiny SMAD 1) a některých dalších složek (García et al. 2017). BMP7 může indukovat apoptózu během remodelace tkání (Monroe et al. 2000), a proto jeho snížená exprese pravděpodobně souvisí s udržením integrity vejcovodu během průchodu embrya. Současně analýza transkriptomu raného embrya naopak ukázala zvýšené hladiny mRNA SMAD1, která aktivuje signalizaci BMP a zároveň hraje klíčovou roli při podpoře vývoje embrya v děložním prostředí (Tremblay et al. 2001). Tyto údaje naznačují, že transkripční změny navozené EVs jsou obousměrné a ovlivňují jak embryo, tak i buňky vejcovodu (García et al. 2017).

Další studie, která také využila kokultivaci embryí s BOEC, ukázala zvýšení exprese genů stimulovaných interferony typu I nebo řazených k dráze IFN- τ (interferon tau) (Schmaltz-Panneau et al. 2014). Řada genů stimulovaných IFN- τ působí na endometrium, signalizuje matce začátek těhotenství a reguluje děložní sliznici pro udržení těhotenství (Gray et al. 2006). EVs izolované z embryí vysoké kvality při jejich přidání do BOEC vyvolaly transkripční změny v genech spojených se signální dráhou IFN- τ . EVs mohou přenášet IFN- τ nebo jiné biomolekuly odpovědné za podobné signální dráhy, což může vysvětlit mechanismy popsané ve výše uvedených studiích (Dissanayake et al. 2021).

MiR-378a-3p z EVs blastocyst skotu prokázala svou roli při urychlení *hatchingu* a ke zvýšení počtu buněk TE a ICM. Analýza cílových genů ukázala zapojení této miRNA do buněčného dělení, diferenciace, vývoje a kvality embryí, a do již zmíněného *hatchingu*. Další vývoj embryí však nebyl jejím působením výrazně ovlivněn, což může naznačovat, že účinky miR-378a-3p se projevují v stadiu blastocysty (Pavani et al. 2022).

4. Využití extracelulárních váčků v diagnostice a léčbě poruch plodnosti

Klinické využití extracelulárních váčků jako diagnostických a terapeutických nástrojů si stále vyžaduje další výzkum, nicméně jejich potenciální aplikace pokrývá řadu zajímavých oblastí, které budou rozebrány v této kapitole. Pro přehled možných způsobů využití EVs viz obr. 5A.



Obr. 5: Klinické využití extracelulárních váčků. A – analýza EVs z plazmy, uteromů a embryonálních EVs může poskytnout informace o zdravotním stavu ženy, předpokládaných onemocněních a komplikacích, kvalitě embrya a receptivitě děložního prostředí. B – různé způsoby využití modifikovaných i přirozených mateřských a embryonálních EVs ke zlepšení vývoje embrya, ochraně před komplikacemi a přípravě děložního prostředí. Převzato z Poh et al. 2023.

4.1. Biomarkery

Extracelulární váčky mohou sloužit jako biomarkery z více hledisek. Většina studií se zaměřuje především na jejich proteinové složení a na změny v expresi miRNA. Obsah váčků s miRNA odráží

stav donorové buňky, včetně různých patologií (Xie et al. 2023). V prvním trimestru zdravého těhotenství (údaje mezi 6. a 12. týdnem) se množství exozomů pocházejících z placenty postupně zvyšuje, jak ukazuje jejich výskyt v mateřské plazmě. Navrhuje se využití placentárních exozomů z plazmy k včasné detekci těhotenských komplikací (Sarker et al. 2014). EVs byly již využity při diagnostice těhotenské hypertenze (Hromadnikova et al. 2014), preeklampsie (Salomon et al. 2017), předčasného porodu (Menon et al. 2019) a endometriózy (Harp et al. 2016). Přestože existuje řada potenciálních biomarkerů, je třeba dalších výzkumů k určení těch nejspolehlivějších. Hypotetické využití EVs v terapii by potenciálně mohlo chránit plod před komplikacemi, včetně výše uvedených stavů, ale také před omezením růstu plodu, gestačním diabetem mellitus, srdečními vadami a poruchami vývoje neurální trubice (Poh et al. 2023) (viz obr. 5A).

Pro úspěšnou implantaci je zásadní správné zhodnocení receptivity endometria. EVs z endometria myši byly analyzovány v různých fázích implantace a byla zjištěna exprese miR-34c-5p, miR-210, miR-369-5p, miR-30b a miR-582-5p během implantačního okna (WOI). Navrhuje se použití miR-34c-5p, která reguluje faktor potlačující růst buněk, jako biomarker stavu dělohy. Zároveň by mohla být využita v terapii při opakovaném selhání implantace, které je častou příčinou neplodnosti. Další miRNA mohou být rovněž využity k určení optimálního období pro implantaci (Tan et al. 2020b), protože přesné stanovení WOI má pozitivní vliv na výsledky asistované reprodukce (Enciso et al. 2021).

4.1.1 Biomarkery kvality embrya

Některé miRNA (miR-181a2, miR-196a2, miR-302c, miR-25) byly detekovány v degenerujících embryích, což naznačuje jejich souvislost s kvalitou a zároveň poukazuje na jejich potenciální využití jako biomarkerů (Kropp et al. 2014). MiR-181a2 potlačuje translaci specifického jaderného proteinu oocytů NPM2 (nukleoplazmin 2), který je zodpovědný za remodelaci chromatinu a koreluje také s kvalitou oocytů (Lingenfelter et al. 2011). MiR-196a2 byla detekována pouze po přidání hovězího sérového albuminu, běžně používaného jako součást různých médií, což naznačuje možnost původu miR-196a2 z kultivačního média. MiR-302c byla zjištěna pouze v embryích skotu, zatímco miR-25 byla nalezena i u člověka (Kropp et al. 2014) a je například zodpovědná za reprogramování kmenových buněk a pluripotenci (Lu et al. 2012).

Další studie identifikovala přítomnost 89 různých miRNA pocházejících z exozomů blastocysty. Analýza signálních drah těchto miRNA ukázala, že se podílejí na epigenetické regulaci, pluripotenci, buněčném cyklu, apoptóze, signalizaci přes ECM receptory a Hippo dráze. Poslední dvě dráhy hrají zásadní roli při formování trofektodermu a vnitřní buněčné masy, při tvorbě mezibuněčných spojů a kompaktaci embrya, například prostřednictvím regulace exprese CDX2 přes Hippo dráhu (Nishioka et al. 2009; Battaglia et al. 2019). Předpokládá se využití embryonálních miRNA k hodnocení kvality blastocysty v cyklech asistované reprodukce (Battaglia et al. 2019).

Pallinger et al. 2017 navrhuje analýzu PI+ EVs (vezikulů obsahujících nukleové kyseliny) pomocí průtokové cytometrie jako neinvazivní metodu pro výběr kompetentního embrya k transferu,

jelikož zvýšený počet PI+ EVs může signalizovat snížený implantační potenciál. Navržený test je rychlý a cenově dostupný, nicméně selhání implantace nemusí být způsobeno pouze kvalitou embrya, ale také nedostatečnou receptivitou endometria. Z tohoto důvodu jsou zapotřebí standardizované protokoly pro zpracování a analýzu dat. Možným vysvětlením zvýšeného počtu PI+ EVs může být uvolnění nukleových kyselin v důsledku poškození buněk, i když jejich přesný původ nebyl objasněn v této studii. Ve druhé studii byl však v buňkách TE rovněž pozorován proces, při kterém se část jaderného materiálu uvolňovala do cytoplazmy ve formě cytoplazmatických struktur (cytDNA) během expanze blastocoelu. Zvýšené uvolňování bylo pozorováno po mechanickém zásahu (biopsii) během odběru vzorků pro preimplantační genetickou diagnostiku. Tento jev není přímo spojen s apoptózou ani s chybami při segregaci chromozomů během mitózy, nicméně může být signálem buněčného stresu, který potenciálně snižuje kvalitu embrya (Domingo-Muelas et al. 2023). Na druhou stranu v novější studii nebyla pozorována korelace mezi koncentrací a kvalitou jako u Pallinger et al. 2017, právě velikost uvolňovaných vezikulů odrážela zvýšenou vývojovou kompetenci embryí ve třetím dni vývoje. Kromě toho analýza EVs prokázala přítomnost genomové DNA s vysokou mírou chromozomálních abnormalit, zatímco biopsie tyto abnormality neodhalila, což ukazuje na nedostatečnou spolehlivost takové diagnostiky v raných stádiích vývoje (Veraguas et al. 2021).

4.2 Extracelulární váčky jako terapeutický nástroj v reprodukční medicíně

Extracelulární vezikuly lze zhruba rozdělit na přirozené (produkované matkou a embryem/trofoblastem) a syntetické (Poh et al. 2023) (viz obr. 5B).

4.2.1 Přirozené extracelulární váčky

Jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách, jak mateřské, tak embryonální vezikuly jsou přirozeně obohaceny o miRNA a proteiny regulující adhezi, proliferaci, diferenciaci, migraci buněk a další procesy (Poh et al. 2023). Například lidské EVs mezenchymálních kmenových buněk endometria obsahují antioxidanty, které již prokázaly svůj přínos u starších myší při zlepšení kvality jejich embryí. Analýza genové exprese blastocyst odhalila změny v genech souvisejících s odpovědí na oxidační stres, metabolismem a tvorbou TE/ICM, včetně zvýšené exprese SOX2 a VEGF (Marinaro et al. 2019). Přidání vezikulů získaných od fertálních žen do kultivačního média může zlepšit receptivitu endometria a kvalitu embryí *in vitro*, což může být využito při ART (Poh et al. 2023).

Exozomy izolované z mezenchymálních kmenových buněk a zabudované do hydrogelu prokázaly svou účinnost v terapii Ashermanova syndromu způsobeného fibrózou endometria, což podporuje další výzkum směřující k vývoji personalizované terapie. Léčba exozomy vedla ke snížení exprese fibrózních markerů (vimentin, COL1A1 (alfa-1 podjednotka kolagenu typu I) a COL5A2 (alfa-2 podjednotka kolagenu typu V)), jejichž hladiny byly zvýšeny v důsledku aktivity TGF- β (transformující růstový faktor beta), který představuje klíčový prvek fibrotické kaskády (Lin et al. 2023).

4.2.2 Syntetické extracelulární váčky

Pro formování exozomů synteticky existují různé metody. Jednou z nich je koinkubace se zvolenou molekulou, která může difundovat do vezikulů (například enkapsulace kurkuminu do exozomů pomocí koinkubace zvýšila jeho stabilitu a biologickou dostupnost *in vivo*) (Sun et al. 2010). Další metodou je elektroporace (elektrický impuls dočasně zvýší propustnost membrány váček a molekuly, např. siRNA (malá interferující RNA) mohou proniknout dovnitř), nebo transfekce (modifikace buněk produkujících exozomy za účelem syntézy specifických proteinů na povrchu vezikulů nebo vložení potřebných molekul) (Zhang et al. 2022). Kromě toho mohou být EVs modifikovány na povrchu pomocí peptidů nebo receptorů (integriny), aby specificky cílily na určité tkáně nebo orgány. Tento přístup se nazývá povrchová funkcionalizace (Poh et al. 2023). Například syntetické extracelulární vezikuly byly u myši použity jako systém pro transport siRNA inhibující replikaci viru Zika, který představuje vážné riziko pro novorozence. Aby bylo možné tyto vezikuly cílit přímo na neurony (včetně neuronů plodu), vědci modifikovali povrchový protein Lamp2b vložím glykoproteinu viru vztekliny, který se váže na acetylcholinové receptory přítomné na neuronech (Zhang et al. 2022). Předpokládá se, že podobné modifikace by mohly být využity i k ochraně před dalšími komplikacemi v těhotenství (Poh et al. 2023).

Exozomy pocházející z mezenchymálních kmenových buněk mohou být považovány za potenciální terapeutický nástroj při preeklampsii pro přenos užitečných molekul, například dlouhé nekódující RNA H19, která se váže na mikroRNA let-7b a snižuje její aktivitu. U pacientek s preeklampií je let-7b zvýšená, což ovlivňuje expresi FOXO1 (forkhead box protein O1). Zvýšení FOXO1 spolu s aktivací signální dráhy proteinkinázy B podporuje migraci a invazi trofoblastů, snižuje apoptózu a potenciálně brání rozvoji PE. Exozomy nesoucí H19 tak mohou být využity v terapii PE k regulaci funkce buněk trofoblastu (Chen et al. 2020).

V jiné studii modifikované uterozomy s lidským choriovým gonadotropinem (hCG) zvýšily expresi LIF (leukemii inhibující faktor) a trofininu a snížily hladiny IGFBP-1 (vazebný protein pro IGF-1) a mucin-16, což naznačuje zvýšenou receptivitu endometria pro implantaci (Hajipour et al. 2021). Aplikace hCG do děložní dutiny po odběru oocytů byla efektivní při zlepšení receptivity endometria a zvýšilo pravděpodobnost těhotenství (Navali et al. 2016). LIF působí na děložní epitel aktivací exprese mnoha transkripčních faktorů, které spouštějí dráhy připravující dělohu na implantaci (Cheng et al. 2017). Trofinin podporuje počáteční přichycení trofoblastů k epitelu endometria v rané fázi implantace (Dolanbay et al. 2016). Na druhou stranu IGFBP-1 a mucin-16 mohou implantaci bránit. Bylo prokázáno, že IGFBP-1 inhibuje invazi cytotrofoblastů do stromálních buněk endometria během decidualizace (Irwin et al. 1998), zatímco mucin-16 vytváří povrch se sníženou adhezivní schopností, čímž fyzicky brání interakci mezi trofoblastem a epitelem endometria (Liu et al. 2020). Přestože výsledky podání modifikovaných vezikulů jsou perspektivní, byly získány z epiteliálních rakovinných buněk endometria *in vitro*, což nemusí plně odrážet podmínky *in vivo* a potvrzení jejich funkce vyžaduje další výzkum (Hajipour et al. 2021).

Závěr

V této práci byla zkoumána role extracelulárních váčků v časném embryonálním vývoji, konkrétně různých typů exozomů a mikrovezikulů. Klíčovou vlastností EVs je obousměrná komunikace mezi matkou a plodem. Díky této komunikaci mohou EVs modulovat endometrium a imunitní systém pro úspěšnou implantaci, předcházet odmítnutí embrya, ovlivňovat procesy fertilizace a adheze buněk. Ve své práci jsem se snažila pokrýt co nejvíce různých molekulárních mechanismů a interakcí, avšak pochopitelně zde nemohly být zahrnuty všechny funkce a typy uvolňovaných molekul.

Jedním z problémů v této oblasti je jak náročnost izolace, tak samotná analýza EVs z biologických tekutin. Kromě toho některé typy EVs, například oviduktozomy, není možné izolovat u člověka. Z tohoto důvodu se většina výzkumů provádí na modelových zvířatech a bude nutné tyto poznatky dále ověřovat. Současné poznatky o EVs v kontextu implantace jsou navíc převážně získávány *in vitro*. Přestože některé *in vivo* studie potvrzují významnou roli váčků, stále není jasné, do jaké míry lze tyto výsledky vztáhnout na člověka.

Navzdory možným obtížím představuje využití EVs v klinické praxi perspektivní směr. Počet klinických studií zabývajících se vezikuly neustále roste, avšak většina z nich je zaměřena mimo reprodukci, a to na imunoterapii rakoviny, léčbu COVID-19 nebo jeho komplikací a na kožní onemocnění (Fusco et al. 2024). Aplikace EVs jako biomarkerů fertility, kvality embryí nebo jako terapeutický nástroj v ART má již solidní experimentální základ, ale vyžaduje další výzkum a zejména klinické studie.

Celkově jsou EVs důležité v regulaci časného embryonálního vývoje. Budoucí výzkum by se měl zaměřit na pochopení mechanismů komunikace s cílovými buňkami, studium signálních drah, identifikaci biomolekul podílejících se na mezibuněčné komunikaci prostřednictvím EVs, analýzu vlivu jejich miRNA a také roli proteinů, DNA a lipidů.

Seznam literatury

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou.

AGUIRRE, R. S., et al. 2022. Extracellular vesicles in β cell biology: role of lipids in vesicle biogenesis, cargo, and intercellular signaling. *Molecular Metabolism* [online]. **63**, 101545. ISSN 2212-8778. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmet.2022.101545

AKERS, J. C., et al. 2016. Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). *PLOS ONE* [online]. **11**(2), e0149866. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0149866

AL-AWAR, O., et al. 2000. Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **20**(16), 5998–6007. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.20.16.5998-6007.2000

ALCÂNTARA-NETO, A. S., et al. 2020. Porcine oviductal extracellular vesicles interact with gametes and regulate sperm motility and survival. *Theriogenology* [online]. **155**, 240–255. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2020.05.043

AL-DOSSARY, A. A., et al. 2013. Expression and secretion of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLOS ONE* [online]. **8**(11), e80181. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0080181

ALGARRA, B., et al. 2016. The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies fertility parameters. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 32556. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep32556

ALTMÄE, S., et al. 2017. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 10077. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-10098-3

ANDREWS, R. E., et al. 2015. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4: interaction with constitutive nitric oxide synthases in human sperm and prostasomes which carry Ca^{2+} /CaM-dependent serine kinase. *Molecular Human Reproduction* [online]. **21**(11), 832–843. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gav049

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2020. *Asistovaná reprodukce v ČR 2018–2019* [online]. Praha: ÚZIS ČR.

World Health Organization. 2023. *Infertility prevalence estimates, 1990–2021* [online]. Geneva: World Health Organization. ISBN 978-92-4-006831-5.

ATAY, S., et al. 2011a. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. **65**(1), 65–77. ISSN 1600-0897. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00880.x

ATAY, S., et al. 2011b. Human trophoblast-derived exosomal fibronectin induces pro-inflammatory $\text{IL-1}\beta$ production by macrophages. *American Journal of Reproductive Immunology* [online]. **66**(4), 259–269. ISSN 1600-0897. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0897.2011.00995.x

AVILION, A. A., et al. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development* [online]. **17**(1), 126–140. ISSN 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.224503

- BATHALA, P., et al. 2018. Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are conserved in humans: murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility. *Molecular Human Reproduction* [online]. **24**(3), 143–157. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gay003
- BATTAGLIA, R., et al. 2019. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 84. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-36452-7
- BIANCHI, E., et al. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature* [online]. **508**(7497), 483–487. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature13203
- BICKEL, P. E., et al. 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **272**(21), 13793–13802. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.21.13793
- CABY, M., et al. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology* [online]. **17**(7), 879–887. ISSN 1460-2377. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxh267
- CALZOLARI, A., et al. 2006. Tfr2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *Journal of Cell Science* [online]. **119**(21), 4486–4498. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03228
- *CAMUSSI, G., et al. 2010. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International* [online]. **78**(9), 838–848. ISSN 1523-1755. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2010.278
- CAÑÓN-BELTRÁN, K., et al. 2024. MicroRNA-148b secreted by bovine oviductal extracellular vesicles enhance embryo quality through BPM/TGF-beta pathway. *Biological Research* [online]. **57**(1), 11. ISSN 0717-6287. Dostupné z: doi:10.1186/s40659-024-00488-z
- CARSON, D. D., et al. 1993. Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Developmental Biology* [online]. **155**(1), 97–106. ISSN 1095-564X. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.1993.1010
- CLAYTON, A., et al. 2004. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *The FASEB Journal* [online]. **18**(9), 977–979. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.03-1094fje
- *COCUCCI, E., et al. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology* [online]. **19**(2), 43–51. ISSN 1879-3088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003
- COSTA VERDERA, H., et al. 2017. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release* [online]. **266**, 100–108. ISSN 1873-4995. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.019
- *COTICCHIO, G., et al. 2023. The first mitotic division: a perilous bridge connecting the zygote and the early embryo. *Human Reproduction* [online]. **38**(6), 1019–1027. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dead067
- COY, P., et al. 2008. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(41), 15809–15814. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0804422105
- *CRUZ, L., et al. 2018. Extracellular vesicles: decoding a new language for cellular communication in early embryonic development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **6**, 94. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2018.00094

- DENICOL, A. C., et al. 2013. Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. *Scientific Reports* [online]. **3**(1), 1266. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep01266
- DESROCHERS, L. M., et al. 2016. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nature Communications* [online]. **7**(1), 11958. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms11958
- DI VIZIO, D., et al. 2012. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *The American Journal of Pathology* [online]. **181**(5), 1573–1584. ISSN 1525-2191. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajpath.2012.07.030
- DI-POJ, N., et al. 2002. Antiapoptotic role of PPAR β in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Molecular Cell* [online]. **10**(4), 721–733. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(02)00646-9
- DISSANAYAKE, K., et al. 2021. Oviduct as a sensor of embryo quality: deciphering the extracellular vesicle (EV)-mediated embryo-maternal dialogue. *Journal of Molecular Medicine* [online]. **99**(5), 685–697. ISSN 1432-1440. Dostupné z: doi:10.1007/s00109-021-02042-w
- DISSANAYAKE, K., et al. 2020. Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers. *Theriogenology* [online]. **149**, 104–116. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2020.03.008
- DOLANBAY, E. G., et al. 2016. Expression of trophinin and dipeptidyl peptidase IV in endometrial co-culture in the presence of an embryo: a comparative immunocytochemical study. *Molecular Medicine Reports* [online]. **13**(5), 3961–3968. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2016.5020
- DOMINGO-MUELAS, A., et al. 2023. Human embryo live-imaging reveals nuclear DNA shedding during blastocyst expansion and biopsy. *Cell* [online]. **186**(15), 3166-3181.e18. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2023.06.003
- DUCIBELLA, T., et al. 1977. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *The Journal of Cell Biology* [online]. **74**(1), 153–167. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.74.1.153
- EBNER, T., et al. 2010. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. **21**(6), 762–768. ISSN 1472-6491. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2010.06.038
- ENCISO, M., et al. 2021. The precise determination of the window of implantation significantly improves ART outcomes. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 13420. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-92955-w
- ENRIGHT, A. J., et al. 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology* [online]. **5**(1), R1. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2003-5-1-r1
- FANG, X., et al. 2023. Oviduct epithelial cell-derived extracellular vesicles promote the developmental competence of IVF porcine embryos. *Molecular Medicine Reports* [online]. **27**(6), 1–9. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2023.13009
- FAZELI, A., et al. 2024. The evolving roles of extracellular vesicles in embryo-maternal communication. *Communications Biology* [online]. **7**(1), 1–7. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-024-06442-9

- FENG, D., et al. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* [online]. **11**(5), 675–687. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x
- FERESHTEH, Z., et al. 2019. Detection of extracellular vesicles in the mouse vaginal fluid: their delivery of sperm proteins that stimulate capacitation and modulate fertility. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **234**(8), 12745–12756. ISSN 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.27894
- FERRY, L., et al. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* [online]. **42**(3), 445–453. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/0093-691X(94)90682-9
- FIELDING, A. B., et al. 2005. Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *The EMBO Journal* [online]. **24**(19), 3389–3399. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600803
- FIORENTINO, G., et al. 2024. Extracellular vesicles secreted by cumulus cells contain microRNAs that are potential regulatory factors of mouse oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction* [online]. **30**(6), gaae019. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gaae019
- FRIEDMAN, R. C., et al. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* [online]. **19**(1), 92–105. ISSN 1549-5469. Dostupné z: doi:10.1101/gr.082701.108
- FUSCO, C., et al. 2024. Extracellular vesicles as human therapeutics: a scoping review of the literature. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **13**(5), e12433. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.1002/jev2.12433
- GARCÍA, E. V., et al. 2017. Bovine embryo-oviduct interaction *in vitro* reveals an early cross talk mediated by BMP signaling. *Reproduction* [online]. **153**(5), 631–643. ISSN 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-16-0654
- GARDNER, D. K., et al. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction* [online]. **50**(2), 390–400. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod50.2.390
- GATIEN, J., et al. 2019. Metabolomic profile of oviductal extracellular vesicles across the estrous cycle in cattle. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(24), 6339. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20246339
- GEBARA, N., et al. 2022. Single extracellular vesicle analysis in human amniotic fluid shows evidence of phenotype alterations in preeclampsia. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **11**(5), e12217. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.1002/jev2.12217
- GENBACEV, O. D., et al. 2003. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* [online]. **299**(5605), 405–408. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1079546
- *GEORGADAKI, K., et al. 2016. The molecular basis of fertilization (review). *International Journal of Molecular Medicine* [online]. **38**(4), 979–986. ISSN 1791-244X. Dostupné z: doi:10.3892/ijmm.2016.2723
- GIACOMINI, E., et al. 2017. Secretome of *in vitro* cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 5210. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-05549-w

- GOULD, S. J., et al. 2013. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **2**(1), 20389. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v2i0.20389
- GRAY, C. A., et al. 2006. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biology of Reproduction* [online]. **74**(2), 383–394. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.105.046656
- GREENING, D. W., et al. 2016. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. *Biology of Reproduction* [online]. **94**(2), 38, 1–15. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.115.134890
- GRIFFITHS, G. S., et al. 2008a. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **75**(11), 1627–1636. ISSN 1098-2795. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.20907
- GRIFFITHS, G. S., et al. 2008b. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction* [online]. **135**(3), 293–301. ISSN 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-07-0340
- *GROSS, N., et al. 2017. MicroRNA signaling in embryo development. *Biology* [online]. **6**(3), 34. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology6030034
- *GUO, H., et al. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* [online]. **466**(7308), 835–840. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09267
- GURUNG, S., et al. 2020. Exosomes and soluble secretome from hormone-treated endometrial epithelial cells direct embryo implantation. *Molecular Human Reproduction* [online]. **26**(7), 510–520. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gaaa034
- *GYÖRGY, B., et al. 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **68**(16), 2667–2688. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- HAIPOUR, H., et al. 2021. A human chorionic gonadotropin (hCG) delivery platform using engineered uterine exosomes to improve endometrial receptivity. *Life Sciences* [online]. **275**, 119351. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2021.119351
- HAMDI, M., et al. 2024. Oviductal extracellular vesicles miRNA cargo varies in response to embryos and their quality. *BMC Genomics* [online]. **25**, 520. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-024-10429-5
- HANNAN, N. J., et al. 2011. Analysis of fertility-related soluble mediators in human uterine fluid identifies VEGF as a key regulator of embryo implantation. *Endocrinology* [online]. **152**(12), 4948–4956. ISSN 0013-7227. Dostupné z: doi:10.1210/en.2011-1248
- HARASZTI, R. A., et al. 2016. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **5**(1), 32570. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v5.32570
- HARP, D., et al. 2016. Exosomes derived from endometriotic stromal cells have enhanced angiogenic effects *in vitro*. *Cell and Tissue Research* [online]. **365**, 187–196. ISSN 1432-0878. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-016-2358-1

- HASAN, M. M., et al. 2021. Bovine follicular fluid derived extracellular vesicles modulate the viability, capacitation and acrosome reaction of bull spermatozoa. *Biology* [online]. **10**(11), 1154. ISSN 2079-7737. Dostupné z: doi:10.3390/biology10111154
- HATA, T., et al. 2010. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **396**(2), 528–533. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.135
- HEIJNEN, H. F. G., et al. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and α -granules. *Blood* [online]. **94**(11), 3791–3799. ISSN 1528-0020. Dostupné z: doi:10.1182/blood.V94.11.3791
- HROMADNIKOVA, I., et al. 2014. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs can predict subsequent onset of gestational hypertension. *PLOS ONE* [online]. **9**(12), e113735. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0113735
- HUYEN, D. V., et al. 2011. Evidence for a conserved function of heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 in mouse and human decidualization. *Reproduction* [online]. **142**(2), 353–368. ISSN 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-11-0060
- HYENNE, V., et al. 2019. Studying the fate of tumor extracellular vesicles at high spatiotemporal resolution using the zebrafish embryo. *Developmental Cell* [online]. **48**(4), 554-572.e7. ISSN 1534-5807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2019.01.014
- CHEN, Y., et al. 2020. MSC-secreted exosomal H19 promotes trophoblast cell invasion and migration by downregulating let-7b and upregulating FOXO1. *Molecular Therapy Nucleic Acids* [online]. **19**, 1237–1249. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtn.2019.11.031
- CHENG, J., et al. 2017. Tissue-specific ablation of the LIF receptor in the murine uterine epithelium results in implantation failure. *Endocrinology* [online]. **158**(6), 1916–1928. ISSN 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2017-00103
- IRWIN, J. C., et al. 1998. Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast $\alpha 5\beta 1$ integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Hormone & IGF Research* [online]. **8**(1), 21–31. ISSN 1878-3820. Dostupné z: doi:10.1016/S1096-6374(98)80318-3
- JEPPESEN, D. K., et al. 2025. Blebbisomes are large, organelle-rich extracellular vesicles with cell-like properties. *Nature Cell Biology* [online]. **27**(3), 438–448. ISSN 1476-4679. Dostupné z: doi:10.1038/s41556-025-01621-0
- JUNYENT, S., et al. 2024. The first two blastomeres contribute unequally to the human embryo. *Cell* [online]. **187**(11), 2838-2854.e17. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2024.04.029
- *KALLURI, R., et al. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* [online]. **367**(6478), eaau6977. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aau6977
- KANEKO, Y., et al. 2012. Focal adhesion kinase localizes to sites of cell-to-cell contact *in vivo* and increases apically in rat uterine luminal epithelium and the blastocyst at the time of implantation. *Journal of Morphology* [online]. **273**(6), 639–650. ISSN 1097-4687. Dostupné z: doi:10.1002/jmor.20010
- KANEKO, Y., et al. 2013. Extracellular matrix proteins secreted from both the endometrium and the embryo are required for attachment: A study using a co-culture model of rat blastocysts and Ishikawa cells. *Journal of Morphology* [online]. **274**(1), 63–72. ISSN 1097-4687. Dostupné z: doi:10.1002/jmor.20010

z: doi:10.1002/jmor.20076

KANG, Y., et al. 2014. The role of the osteopontin–integrin $\alpha\beta3$ interaction at implantation: functional analysis using three different *in vitro* models. *Human Reproduction* [online]. **29**(4), 739–749. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/det433

KEERTHIKUMAR, S., et al. 2015. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. **6**(17), 15375–15396. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3801

KELLER, S., et al. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney International* [online]. **72**(9), 1095–1102. ISSN 1523-1755. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ki.5002486

*KIM, S., et al. 2017. A review of mechanisms of implantation. *Development & Reproduction* [online]. **21**(4), 351–359. ISSN 2465-9525. Dostupné z: doi:10.12717/DR.2017.21.4.351

*KNÖFLER, M., et al. 2019. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. **76**(18), 3479–3496. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-019-03104-6

KROPP, J., et al. 2014. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Frontiers in Genetics* [online]. **5**, 91. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2014.00091

KSHIRSAGAR, S. K., et al. 2012. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta* [online]. **33**(12), 982–990. ISSN 1532-3102. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2012.10.005

KUSAMA, K., et al. 2018. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **495**(1), 1370–1375. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.176

LANCASTER, G. I., et al. 2005. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(24), 23349–23355. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M502017200

LANE, M., et al. 1992. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Human Reproduction* [online]. **7**(4), 558–562. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137690

LAUWERS, E., et al. 2018. Hsp90 mediates membrane deformation and exosome release. *Molecular Cell* [online]. **71**(5), 689-702.e9. ISSN 1097-4164. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2018.07.016

LEE, Y., et al. 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* [online]. **425**(6956), 415–419. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature01957

LEE, Y., et al. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* [online]. **23**(20), 4051–4060. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600385

*LI, S., et al. 2017. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology* [online]. **232**(1), R1–R26. ISSN1479-6805. Dostupné z: doi:10.1530/JOE-16-0302

*LI, X., et al. 2023. The roles of exosomal proteins: classification, function, and applications. *International journal of molecular sciences* [online]. **24**(4), 3061. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24043061>

- LIM, K. T., et al. 2007. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* [online]. **67**(2), 293–302. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.011
- LIN, Y., et al. 2023. Exosome-based regimen rescues endometrial fibrosis in intrauterine adhesions via targeting clinical fibrosis biomarkers. *Stem Cells Translational Medicine* [online]. **12**(3), 154–168. ISSN 2157- 6580. Dostupné z: doi:10.1093/stcltm/szad007
- LINGENFELTER, B. M., et al. 2011. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **9**(1), 40. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-9-40
- LIU, L., et al. 2020. Evidence from three cohort studies on the expression of MUC16 around the time of implantation suggests it is an inhibitor of implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. **37**(5), 1105–1115. ISSN 1573-7330. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-020-01764-z
- LLORENTE, A., et al. 2007. Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *European Journal of Cell Biology* [online]. **86**(7), 405–415. ISSN 1618-1298. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcb.2007.05.001
- LU, D., et al. 2012. MiR-25 regulates *wpp2* and *fbxw7* and promotes reprogramming of mouse fibroblast cells to iPSCs. *PLOS ONE* [online]. **7**(8), e40938. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0040938
- LV, J., et al. 2022. Single cell proteomics profiling reveals that embryo-secreted TNF- α plays a critical role during embryo implantation to the endometrium. *Reproductive Sciences* [online]. **29**(5), 1608–1617. ISSN 1933-7205. Dostupné z: doi:10.1007/s43032-021-00833-7
- *MACHTINGER, R., et al. 2021. Extracellular vesicles and female reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. **38**(3), 549–557. ISSN 1573-7330. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-020-02048-2
- MARINARO, F., et al. 2019. Extracellular vesicles derived from endometrial human mesenchymal stem cells enhance embryo yield and quality in an aged murine model. *Biology of Reproduction* [online]. **100**(5), 1180–1192. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/iory263
- MARTINEZ-ARROYO, O., et al. 2021. Small Rab GTPases in intracellular vesicle trafficking: the case of Rab3A/Raphillin-3A complex in the kidney. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(14), 7679. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22147679
- MATSUI, T., et al. 2021. ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells. *EMBO Reports* [online]. **22**(5), e51475. ISSN 1469-3178. Dostupné z: doi:10.15252/embr.202051475
- MAZZARELLA, R., et al. 2024. Extracellular vesicles-coupled miRNAs from oviduct and uterus modulate signaling pathways related to lipid metabolism and bovine early embryo development. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. **15**(1), 51. ISSN 2049-1891. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-024-01008-5
- MELLISHO, E. A., et al. 2017. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced *in vitro*. *PLOS ONE* [online]. **12**(5), e0178306. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0178306
- MELO-BAEZ, B., et al. 2020. MicroRNAs from extracellular vesicles secreted by bovine embryos as early biomarkers of developmental competence. *International Journal of Molecular Sciences* [online].

21(23), 8888. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21238888

MENCK, K., et al. 2017. Isolation and characterization of microvesicles from peripheral blood. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (119), e55057. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/55057

MENON, R., et al. 2019. Circulating exosomal miRNA profile during term and preterm birth pregnancies: a longitudinal study. *Endocrinology* [online]. **160**(2), 249–275. ISSN 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2018-00836

MERIANO, J., et al. 2004. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. **9**(5), 511–520. ISSN 1472-6483. Dostupné z: doi:10.1016/S1472-6483(10)61635-5

MESEGUER, M., et al. 2001. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated *in vitro* by the human blastocyst. *Biology of Reproduction* [online]. **64**(2), 590–601. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod64.2.590

MITSUI, K., et al. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* [online]. **113**(5), 631–642. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(03)00393-3

MIYADO, K., et al. 2008. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **105**(35), 12921–12926. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0710608105

MO, F., et al. 2002. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **22**(24), 8709–8720. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.24.8709-8720.2002

MÖLLER, B., et al. 2001. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction* [online]. **7**(1), 65–72. ISSN 1460-2407. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/7.1.65

MONDÉJAR, I., et al. 2013. The human is an exception to the evolutionarily-conserved phenomenon of pre-fertilization zona pellucida resistance to proteolysis induced by oviductal fluid. *Human Reproduction* [online]. **28**(3), 718–728. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/des423

MONROE, D. G., et al. 2000. Estrogen opposes the apoptotic effects of bone morphogenetic protein 7 on tissue remodeling. *Molecular and Cellular Biology*. **20**(13), 4626–4634. ISSN 1098-5549. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.20.13.4626-4634.2000

MORITA, E., et al. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal* [online]. **26**(19), 4215–4227. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601850

NAKAMURA, K., et al. 2021. The effect of bta-miR-26b in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune system during the implantation period. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **573**, 100–106. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2021.08.019

NAKAMURA, K., et al. 2019. Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 20330. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-56879-w

NAVAKANITWORAKUL, R., et al. 2016. Characterization and small RNA content of extracellular

vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 25486. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep25486

NAVALI, N., et al. 2016. Intrauterine administration of hCG immediately after oocyte retrieval and the outcome of ICSI: a randomized controlled trial. *Human Reproduction* [online]. **31**(11), 2520–2526. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dew236

NG, Y. H., et al. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLOS ONE* [online]. **8**(3), e58502. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0058502

NIAKAN, K. K., et al. 2013. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental Biology* [online]. **375**(1), 54–64. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2012.12.008

NISHIOKA, N., et al. 2009. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Developmental Cell* [online]. **16**(3), 398–410. ISSN 1534-5807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2009.02.003

*OCHOA-BERNAL, M. A., et al. 2020. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(6), 1973. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21061973

OKAE, H., et al. 2018. Derivation of human trophoblast stem cells. *Cell Stem Cell* [online]. **22**(1), 50–63.e6. ISSN 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2017.11.004

OKUNADE, G. W., et al. 2004. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(32), 33742–33750. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M404628200

PALLINGER, E., et al. 2017. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 39927. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep39927

PAP, E., et al. 2008. T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta* [online]. **29**(9), 826–832. ISSN 0143-4004. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2008.06.006

*PAP, E., et al. 2009. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society* [online]. **58**, 1–8. ISSN 1023-3830. Dostupné z: doi:10.1007/s00011-008-8210-7

PAVANI, K. C., et al. 2022. Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **119**(12), e2122708119. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2122708119

*POH, Q. H., et al. 2023. Omics insights into extracellular vesicles in embryo implantation and their therapeutic utility. *PROTEOMICS* [online]. **23**(6), 2200107. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.202200107

QU, P., et al. 2020. Extracellular vesicles and melatonin benefit embryonic develop by regulating reactive oxygen species and 5-methylcytosine. *Journal of Pineal Research* [online]. **68**(3), e12635. ISSN 1600-079X. Dostupné z: doi:10.1111/jpi.12635

- QU, P., et al. 2019. Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. *Reproduction, Fertility and Development* [online]. **31**(2), 324–332. ISSN 1448-5990. Dostupné z: doi:10.1071/RD18203
- RAUCHER, D., et al. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton–plasma membrane adhesion. *Cell* [online]. **100**(2), 221–228. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81560-3
- *RECORD, M., et al. 2014. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. **1841**(1), 108–120. ISSN 1388-1981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.004
- REICHMANN, J., et al. 2018. Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science* [online]. **361**(6398), 189–193. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.aar7462
- ROMO, G. M., et al. 1999. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **190**(6), 803. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.190.6.803
- RUBINSTEIN, E., et al. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* [online]. **290**(2), 351–358. ISSN 1095-564X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2005.11.031
- RUBY, J. G., et al. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* [online]. **448**(7149), 83–86. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature05983
- RUNGE, K. E., et al. 2007. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental Biology* [online]. **304**(1), 317–325. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.041
- SAADELDIN, I. M., et al. 2014. Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cellular Reprogramming* [online]. **16**(3), 223–234. ISSN 2152-4998. Dostupné z: doi:10.1089/cell.2014.0003
- SALOMON, C., et al. 2017. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. **102**(9), 3182–3194. ISSN 1945-7197. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2017-00672
- SARKER, S., et al. 2014. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *Journal of Translational Medicine* [online]. **12**(1), 204. ISSN 1479-5876. Dostupné z: doi:10.1186/1479-5876-12-204
- SASTRE, D., et al. 2014. Expression of *PLIN2* and *PLIN3* during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology* [online]. **81**(2), 326–331. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2013.10.002
- *SEDGWICK, A. E., et al. 2018. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic* [online]. **19**(5), 319–327. ISSN 1600-0854. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12558
- SHOONER, C., et al. 2005. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **3**(1), 20. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-3-20
- SHUI, L., et al. 2019. Aminopeptidase N expression in the endometrium could affect endometrial

receptivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **514**(2), 469–474. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.174

SCHEFFLER, K., et al. 2021. Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nature Communications* [online]. **12**(1), 841. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-21020-x

SCHMALTZ-PANNEAU, B., et al. 2014. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during *in vitro* co-culture. *Animal Reproduction Science* [online]. **149**(3), 103–116. ISSN 1873-2232. Dostupné z: doi:10.1016/j.anireprosci.2014.06.022

SCHNEIDER, I., et al. 2021. Dual spindles assemble in bovine zygotes despite the presence of paternal centrosomes. *The Journal of Cell Biology* [online]. **220**(11), e202010106. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.202010106

SCHUH, K., et al. 2004. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(27), 28220–28226. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M312599200

SICILIANO, L., et al. 2008. Protasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **6**(1), 5. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-6-5

STAVREUS-EVERS, A., et al. 2001. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertility and Sterility* [online]. **76**(4), 782–791. ISSN 1556-5653. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(01)01993-8

SUN, B., et al. 2014. Effects of group culture on the development of discarded human embryos and the construction of human embryonic stem cell lines. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. **31**(10), 1369–1376. ISSN 1573-7330. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-014-0308-y

SUN, D., et al. 2010. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Molecular Therapy* [online]. **18**(9), 1606–1614. ISSN 1525-0024. Dostupné z: doi:10.1038/mt.2010.105

SUN, Y., et al. 2019. Lipid profile characterization and lipoprotein comparison of extracellular vesicles from human plasma and serum. *Metabolites* [online]. **9**(11), 259. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo9110259

SVENSSON, K. J., et al. 2013. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(24), 17713–17724. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.445403

TALBOT, A. L., et al. 2022. Binucleated embryos at the two-cell stage show higher blastocyst formation rates and higher pregnancy and live birth rates compared to non-multinucleated embryos. *Human Reproduction Open* [online]. **2022**(4), hoac049. ISSN 2399-3529. Dostupné z: doi:10.1093/hropen/hoac049

TAN, Q., et al. 2020a. Endometrial cell-derived small extracellular vesicle miR-100-5p promotes functions of trophoblast during embryo implantation. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* [online]. **23**, 217–231. ISSN 2162-2531. Dostupné z: doi:10.1016/j.omtn.2020.10.043

TAN, Q., et al. 2020b. MicroRNAs in small extracellular vesicles indicate successful embryo implantation during early pregnancy. *Cells* [online]. **9**(3), 645. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9030645

TANG, Z., et al. 2022. CD55 is upregulated by cAMP/PKA/AKT and modulates human decidualization via Src and ERK pathway and decidualization-related genes. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **89**(5–6), 256–268. ISSN 1098-2795. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.23569

*TANNETTA, D., et al. 2014. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. **11**(6), 548–563. ISSN 2042-0226. Dostupné z: doi:10.1038/cmi.2014.42

TAPIA, A., et al. 2011. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **9**(1), 14. ISSN 1477-7827. Dostupné z: doi:10.1186/1477-7827-9-14

European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), J. SMEENK, et al. 2023. ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction* [online]. **38**(12), 2321–2338. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dead197

TONG, M., et al. 2017. *In vivo* targets of human placental micro-vesicles vary with exposure time and pregnancy. *Reproduction* [online]. **153**(6), 835–845. ISSN 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP-16-0615

TRAJKOVIC, K., et al. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* [online]. **319**(5867), 1244–1247. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1153124

TREMBLAY, K. D., et al. 2001. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* [online]. **128**(18), 3609–3621. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.128.18.3609

TWAL, W. O., et al. 2001. Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *Journal of Cell Science* [online]. **114**(24), 4587–4598. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.114.24.4587

*VAN NIEL, G., et al. 2022. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **23**(5), 369–382. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/s41580-022-00460-3

VEERMAN, R. E., et al. 2021. Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **10**(9), e12128. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.1002/jev2.12128

VERAGUAS, D., et al. 2021. Evaluation of extracellular vesicles and gDNA from culture medium as a possible indicator of developmental competence in human embryos. *Zygote* [online]. **29**(2), 138–149. ISSN 1469-8730. Dostupné z: doi:10.1017/S0967199420000593

VERWEIJ, F. J., et al. 2019. Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes *in vivo*. *Developmental Cell* [online]. **48**(4), 573-589.e4. ISSN 1534-5807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2019.01.004

VILELLA, F., et al. 2015. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development* [online]. **142**(18), 3210–3221. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.124289

WALDENSTRÖM, A., et al. 2012. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLOS ONE* [online]. **7**(4), e34653. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0034653

z: doi:10.1371/journal.pone.0034653

WELSH, J. A., et al. 2024. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **13**(2), e12404. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.1002/jev2.12404

WENNEMUTH, G., et al. 2003. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *Journal of General Physiology* [online]. **122**(1), 115–128. ISSN 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.200308839

*WYDOOGHE, E., et al. 2017. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other *in vitro* when cultured in groups? *Biological Reviews* [online]. **92**(1), 505–520. ISSN 1469-185X. Dostupné z: doi:10.1111/brv.12241

*XIE, Y., et al. 2023. Extracellular vesicles-encapsulated microRNA in mammalian reproduction: a review. *Theriogenology* [online]. **196**, 174–185. ISSN 1879-3231. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2022.11.022

XU, X., et al. 2019. Observation of two separate bipolar spindles in the human zygote. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. **36**(4), 601–602. ISSN 1573-7330. Dostupné z: doi:10.1007/s10815-019-01440-x

*YÁÑEZ-MÓ, M., et al. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. **4**, 10.3402/jev.v4.27066. ISSN 2001-3078. Dostupné z: doi:10.3402/jev.v4.27066

YU, X., et al. 2006. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Research* [online]. **66**(9), 4795–4801. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4579

YUAN, A., et al. 2009. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLOS ONE* [online]. **4**(3), e4722. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0004722

ZHAI, D., et al. 2008. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(15), 9580–9586. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M708426200

*ZHAI, J., et al. 2022. Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. *Trends in Cell Biology* [online]. **32**(1), 18–29. ISSN 1879-3088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2021.07.008

ZHANG, H., et al. 2003. Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* [online]. **69**(2), 446–454. ISSN 1529-7268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.102.013854

ZHANG, R., et al. 2022. sEVsRVG selectively delivers antiviral siRNA to fetus brain, inhibits ZIKV infection and mitigates ZIKV-induced microcephaly in mouse model. *Molecular Therapy* [online]. **30**(5), 2078–2091. ISSN 1525-0024. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymthe.2021.10.009

ZHAO, Q., et al. 2020. Lipidomic biomarkers of extracellular vesicles for the prediction of preterm birth in the early second trimester. *Journal of Proteome Research* [online]. **19**(10), 4104–4113. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.0c00525