

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

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



Johana Straková

Role mikrovezikulů a exozomů v reprodukci savců
Role of microvesicles and exosomes in reproduction of mammals

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha, 2022

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.

V..... dne

.....

podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce RNDr. Michaele Frolíkové, Ph.D za její cenné rady a především za čas a trpělivost, které mi během psaní věnovala. Zároveň bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Mikrovezikuly a exozomy jsou extracelulární váčky o velikostech v řádu nanometrů odvozené od buněčných membrán. Díky schopnosti přenosu proteinů, lipidů a RNA jsou v současné době mikrovezikuly a exozomy považovány za obvyklý způsob komunikace somatických buněk. Mikrovezikuly a exozomy byly detekovány v reprodukčních orgánech samců a samic savců, kde zprostředkovávají transport molekul mezi buňkami a podporují tak jejich komunikaci v rámci fyziologických i patologických procesů. Signalizace prostřednictvím mikrovezikulů a exozomů se uplatňuje při procesech maturace spermií, které tyto váčky obohacují o molekuly potřebné pro dosažení motility a schopnosti oplození. Stejně tak při dozrávání oocyty mikrovezikuly podporují komunikaci mezi buňkami folikulu a jeho růst. Při oplození molekuly transportované mikrovezikuly napomáhají kapacitaci a akrozomální reakci a po splynutí gamet podporují vyvíjející se embryo a následně jeho implantaci do dělohy. Hlavní náplní této bakalářské práce je diskuse role mikrovezikulů a exozomů v jednotlivých procesech v savčí reprodukci od maturace spermií a vajíček po úspěšné oplození a implantaci embrya. Podstatná část práce je věnována představení molekul transportovaných mikrovezikuly a exozomy mezi buňkami a diskusi jejich funkce v rámci reprodukčních procesů.

Klíčová slova: mikrovezikuly, exozomy, buněčná komunikace, maturace gamet, reprodukce

Abstract

Microvesicles and exosomes are extracellular vesicles of nanometer size derived from cell membranes. Due to their ability to transfer proteins, lipids and RNA, microvesicles and exosomes are now considered to be a common form of communication between somatic cells. Microvesicles and exosomes have been detected in the reproductive organs of male and female mammals, where they mediate the transport of molecules between cells and thus promote their communication during physiological and pathological processes. Signalling through microvesicles and exosomes is involved in sperm maturation processes, which enrich these vesicles for molecules required for motility and fertilization capacity. Similarly, during oocyte maturation, microvesicles promote communication between follicle cells and its growth. During fertilization, the molecules transported by microvesicles promote capacitation and acrosomal reaction and, after gamete fusion, support the developing embryo and its subsequent implantation in the uterus. The main focus of this bachelor thesis is to discuss the role of microvesicles and exosomes in various processes in mammalian reproduction from sperm and egg maturation to successful fertilization and embryo implantation. A significant part of the thesis is devoted to the presentation of molecules transported by microvesicles and exosomes between cells and a discussion of their function in reproductive processes.

Keywords: microvesicles, exosomes, cell communication, gamete maturation, reproduction

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Seznam obrázků	3
Úvod	4
1. Mikrovezikuly a exozomy	5
1.1 Mikrovezikuly	5
1.1.1 Tvorba mikrovezikulů a příjem cílovou buňkou	5
1.2 Exozomy	7
2. Epididymozomy	9
.....	10
2.1 Ochrana spermií před oxidativním poškozením	10
2.2 Regulace genové exprese.....	11
2.3 Motilita spermií a získávání schopnosti fertilizace	12
3. EVs ve folikulu	14
3.1 Vývoj folikulu a růst oocytu	15
3.2 Růst a expanze <i>cummulus oophorus</i>	16
4. Prostatozomy	17
4.1 Zvýšení pohyblivosti spermií a ochrana před oxidativním stresem	17
4.2 Ochrana před vlivy samičího reprodukčního traktu	18
4.3 Kapacitace a akrozomální reakce	19
5. Oviduktozomy	21
5.1 Podpora spermií při skladování ve vejcovodu.....	21
5.2 Podpora hypermotility, kapacitace a akrozomální reakce	22
5.3 Regulace genové exprese.....	23
5.4 Časný vývoj embrya	23
6. EVs v děloze	24
6.1 Implantace embrya a vývoj placenty	25
7. 1 Endometrióza.....	29
7.2 Syndrom polycystických vaječníků.....	30
Závěr	31
Zdroje použité literatury	32
Zdroje obrázků	44

Seznam použitých zkratek

Alix - ALG-2-interacting protein X

TSG101 - Tumor susceptibility gene 101

Hsc70 – Heat shock cognate protein 70

Hsp90 – Heat shock protein 90

ESCRT – Endosomal complexes required for transport

ROS – Reactive oxygen species

ELSPBP1 - Epididymal sperm binding protein 1

BLVRA – Biliverdin reduktáza

GPX5 – Glutathion peroxidáza 5

miRNA - microRNA

pri-miRNA – primary microRNA

pre-miRNA – precursor miRNA

Dicer-TRBP2 - Transactivation responsive RNA-binding protein

RISC – RNA-induced silencing complex

Let7 – Lethal7, rodina microRNA

PMCA4 – Plasma membrane calcium ATPase 4

CASK - Ca²⁺/CaM-dependent serine kinase

JAM-A - Junctional adhesion molecule-A

SPAM1 - Sperm-adhesion molecule 1

PH-20 - hyaluronidázy

P25b - fibrohexamerin

AGO2 - Argonaute-2

MAPK - Mitogen activated protein kinase

FSH - folikulostimulační hormon

LH - luteinizační hormon

TGF-β/BMP - Transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein

AVCR1 - Activin receptor type-1

ID2 - Inhibitor of DNA binding 2

VEGF - Vascular endothelial growth factor

Has2 - Hyaluronan synthase 2

Ptgs2 - Prostaglandin endoperoxide synthase 2

eNOS - endothelial nitric oxid synthase

nNOS - neuronal nitric oxid synthase
cADPR - cyclic ADP-ribose
NAADP - Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
CD46, CD49, CD55 - Cluster of differentiation 46, 49, 55
hCAP-18 - human cathelicidin
LL37 - Human cathelicidin antimicrobial peptide
cAMP - cyclic adenosine monophosphate
Ap4A - Diadenosine tetraphosphate
Ap3A - Diadenosine triphosphate
E2 - estradiol
P4 - progesteron
ANXA1,2,4,5 - Annexin A1, A2, A4, A5
BSP - Bovine seminal plasma protein
HSPA8/HSP70 - Heat-shock protein A8
OGVP1 - Oviduct-specific glycoprotein 1
MYH9 - Myosin heavy-chain 9
IL-1 β - Interleukin 1 beta
TNF- α - Tumor necrosis factor alpha
IL-6 - Interleukin 6
IL-10 - Interleukin 10
TGF- β - Transforming growth factor β
ITGB3 - Integrin subunit beta 3
ITGA7 - Integrin subunit alpha 7
CDH5 - Cadherin 5
PHT - Primary human trophoblast
FBLN1 - Fibulin-1
HSPG2 - Heparan sulphate proteoglycan 2
CYR61 - Cysteine-rich 61 protein
MMP-14 – Matrix metalloproteinase 14
ADAM10 – A Disintegrin and metalloproteinase 10
ICM - Inner cell mass
FAK - Focal adhesion kinase
JNK - c-Jun N-terminal kinase
MMP - Matrix metalloproteinase

EMMPRIN - Extracellular matrix metalloproteinase inducer

PCOS - Polycystic ovary syndrome

PCOM - Polycystic ovarian morphology

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma rozdílu tvorby mikrovezikulů a exozomů

Obrázek 2 – Apokrinní sekrece epididymozomů z epiteliálních buněk nadvarlete

Obrázek 3 – Schéma komunikace buněk pomocí Evs v rámci vývoje folikulu

Obrázek 4 – Schéma komunikace pomocí EVs mezi epitelem děložní sliznice a embryem

Obrázek 5 – Příklad transportu molekul pomocí exozomů v mikroprostředí dělohy

Úvod

Reprodukce savců je komplexní proces vyžadující dokonalou souhru mnoha buněk a tkání v samčím i samičím organismu. Prvním důležitým krokem tohoto procesu je tvorba a následná maturace gamet, díky kterým se tvoří spermie a vajíčka schopna oplození. Poté, co spermie doputuje do ampuly vejcovodu samice, dochází ke vzájemnému kontaktu gamet a vniknutí spermie do oocytu, tím dochází k jeho oplození a vzniku zygoty. Ta se dále rýhuje. Vznikající embryo dále putuje do dělohy, kde ve stadiu blastocysty probíhá jeho implantace do děložní sliznice. Všechny tyto procesy vyžadují intenzivní mezibuněčnou komunikaci, která zajišťuje jejich správný průběh a načasování na molekulární úrovni (Jones, Lopez 2013). Kromě komunikace přímým kontaktem buněk nebo transportem pomocí secernovaných molekul jsou mezibuněčné interakce zprostředkovány také extracelulárními vezikuly (EVs) (Ratajczak et al. 2006). EVs jsou váčky o velikosti desítek až stovek nanometrů obalené fosfolipidovou membránou schopné mezi buňkami přenášet nejrůznější proteiny, lipidy, mRNA a miRNA. EVs dělíme na základě způsobu jejich tvorby v buňce do dvou hlavních skupin na mikrovezikuly a exozomy (Raposo, Stoorvogel 2013). Tyto váčky zprostředkovávají v těle savců komunikaci mezi mnoha buněčnými typy a zásadní roli hrají i v reprodukci. (Simon et al. 2018)

Cílem této bakalářské práce je shrnutí a diskuse doposud publikovaných poznatků o funkci EVs v oblasti reprodukce savců. Práce se zaměřuje zejména na popis transportu konkrétních molekul pomocí těchto váček a zabývá se rolí těchto molekul v souvislosti jednotlivých reprodukčních procesů. Práce detailně popisuje roli EVs při maturaci samčích a samičích gamet, oplození a časném embryonálním vývoji. Kromě toho jsou v práci zahrnuty poznatky o roli EVs v průběhu vybraných onemocnění reprodukčního traktu člověka.

1. Mikrovezikuly a exozomy

Mikrovezikuly a exozomy, které patří společně s apoptotickými tělísky do skupiny EVs, představují skupinu membránou obalených váčků uvolňovaných z buněk mnoha tkání v těle savců, ale i nižších eukaryot a prokaryot (Raposo, Stoorvogel 2013, Yáñez-Mó et al. 2015). Tyto váčky slouží jako transportéry velké škály proteinů, mRNA a miRNA, které díky své membráně chrání před degradací a dopravují je k cílovým buňkám, čímž ovlivňují jejich složení a chování (Ratajczak et al. 2006). EVs tak představují klíčový nástroj mezibuněčné komunikace (Raposo, Stoorvogel 2013). Ukazuje se, že tyto extracelulární váčky mají podíl na mezibuněčné komunikaci v rámci reprodukční soustavy samců v nadvarletí a prostatě, kde se podílejí na dozrávání a podpoře samčích gamet (Saez, Frenette, Sullivan 2003). U samic najdeme EVs ve vaječnicích, kde podporují komunikaci buněk folikulu v rámci vývoje vajíčka (da Silveira et al. 2012). Také ve vejcovodech EVs napomáhají interakci samčích a samičích gamet a oplození, stejně jako v děloze, kde zprostředkovávají komunikaci buněk k implantaci embrya (Al-Dossary, Martin-DeLeon 2016, Ng et al. 2013).

1.1 Mikrovezikuly

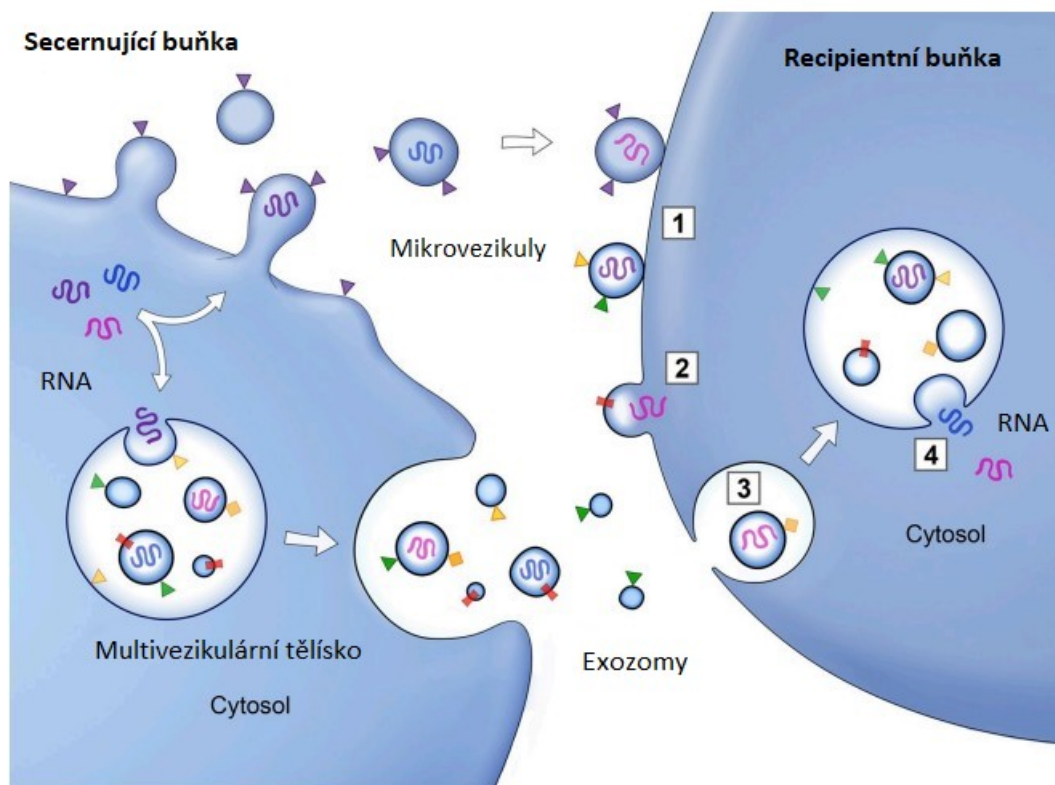
Označení mikrovezikul odkazuje ke dvěma typům váčků. Samotné mikrovezikuly jsou cirkulární fragmenty membrány vznikající pučením buněčné plazmatické membrány a jejím následným odštěpením. Mikrovezikuly jsou velikostně velice heterogenní a jejich rozměry se pohybují v rozmezí 100 – 1000nm (Raposo, Stoorvogel 2013). Podtypem mikrovezikulů jsou také exozomy, které jsou menšími váčky obalenými dvouvrstvou fosfolipidovou membránou. Jejich průměrná velikost se pohybuje v rozsahu 30-100 nm (Théry, Zitvogel, Amigorena 2002). Od mikrovezikulů je však odlišuje především způsob tvorby a uvolňování z buňky. Exozomy na rozdíl od mikrovezikulů vznikají jako intraluminální vezikuly během zrání endozomu (Ratajczak et al. 2006, Obrázek 1).

1.1.1 Tvorba mikrovezikulů a příjem cílovou buňkou

Vznik mikrovezikulů probíhá pučením plazmatické membrány buňky a následným odloučením vezikulu z povrchu (Cocucci, Racchetti, Meldolesi 2009). K tomuto ději dochází na specifických místech membrány, obohacených o specifické lipidy a proteiny, zejména pak cholesterol. Do vznikajícího váčku se selektivně začleňují molekuly připravené k transportu a následně se mikrovezikul uvolňuje do extracelulárního prostoru (Muralidharan-Chari et al.

2010). Proces pučení mikrovezikulů je závislý na zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , cytoskeletu, a enzymech jako jsou scrambláza, calpain a gelsolin (Pap et al. 2009). Za fyziologických podmínek jsou v lipidové dvojvrstvě plazmatické membrány jednotlivé fosfolipidy rozloženy asymetricky tzn. složení fosfolipidů ve vnitřním a vnějším listu membrány se liší. Zvýšení koncentrace iontů Ca^{2+} inhibuje proteinový přenašeč molekul membrány – translokázu a naopak aktivuje enzym scramblázu. Scrambláza přesune fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin, které se běžně vyskytují ve vnitřním listu membrány (Hugel et al. 2005). Ca^{2+} ionty poté iniciují reorganizaci cytoskeletu, díky které je umožněno pučení membrány. Ca^{2+} dále aktivují cytosolické proteázy calpain a gelsolin. Calpain štěpí talin a alfa activin, gelsolin štěpí anti capping proteiny. Štěpení proteinů rozvolňuje kortikální cytoskelet a membrána může pučet a utvořit mikrovezikul. Po oddělení se mikrovezikuly pohybují v extracelulárním prostoru v blízkosti původní buňky, kde mohou být přijaty cílovou buňkou nebo jsou znehodnoceny (Pap et al. 2009).

Mikrovezikuly interagují pouze s buňkami, které rozeznají pomocí svých receptorů. Jedním ze způsobů interakce mikrovezikulu s cílovou buňkou je aktivace vnitrobuněčné signalizace na základě vzájemného kontaktu. V takovém případě mikrovezikul nefúzuje s plazmatickou membránou cílové buňky, ale specificky se naváže pomocí receptorových proteinů na její povrch. Navázaný mikrovezikul může mít na svém povrchu molekuly, které stimulují imunitní reakci v cílové buňce nebo interagují s dalšími proteiny zapojenými v signalizaci. Dalším způsobem vzájemné interakce mikrovezikulu s cílovou buňkou je jejich přímá fúze. Při fúzi se náklad vezikulu transportuje do cytosolu anebo může být mikrovezikul endocytován, což umožní jeho další zpracování v cílové buňce. Pokud proběhne endocytóza a endozom následně splyne s plazmatickou membránou, je mikrovezikul transportován zpět do extracelulárního prostředí a může být přijat jinou cílovou buňkou. Tento proces se nazývá transcytóza (Camussi et al. 2010).



Obrázek 1 – Schéma rozdílu tvorby mikrovezikulů a exozomů

Extracelulární vezikuly mohou pučet z povrchu buňky jako fragmenty membrány, v takovém případě se označují jako mikrovezikuly. Druhým typem extracelulárních vezikulů jsou exozomy, které mají původ v multivezikulárních tělískách. Mikrovezikuly i exozomy transportují mezi buňkami proteiny (znázorněno trojúhelníky a obdélníky) a RNA (znázorněno vlnovkami). Převzato a upraveno: (Raposo, Stoorvogel 2013)

1.2 Exozomy

Specifikem exozomů oproti mikrovezikulům je způsob jejich tvorby v buňce. Exozomy odpovídají intraluminálním vezikulům, které se odštěpují během zrání endozomu z multivezikulárních tělísek (Raposo, Stoorvogel 2013). Multivezikulární tělíska, která nejsou v buňce určena k degradaci, splývají s plazmatickou membránou a tím dojde k uvolnění exozomů. Na vzniku exozomů se specifickým obsahem se podílí endozomální třídící komplex ESCRT, který je v buňkách esenciální pro odštěpování váčků od membrány. (Colombo et al. 2013).

Exozomy jsou také charakteristické svým proteinovým složením, které je specifické pro způsob jejich vzniku a odlišuje je od ostatních mikrovezikulů. Díky svému endozomálnímu původu obsahují exozomy proteiny specifické pro membránový transport a fúzi jako Annexiny, Flotilliny a Rab GTPázy, také tetraspaniny CD9, CD63, CD81, CD82 a Heat-shock proteiny Hsc70 a Hsp90 (Vlassov et al. 2012). Annexiny jsou na vápníku závislé fosfolipidy vázající proteiny, které v exozomech zřejmě slouží pro fúzi s membránou cílové buňky (Théry et al.

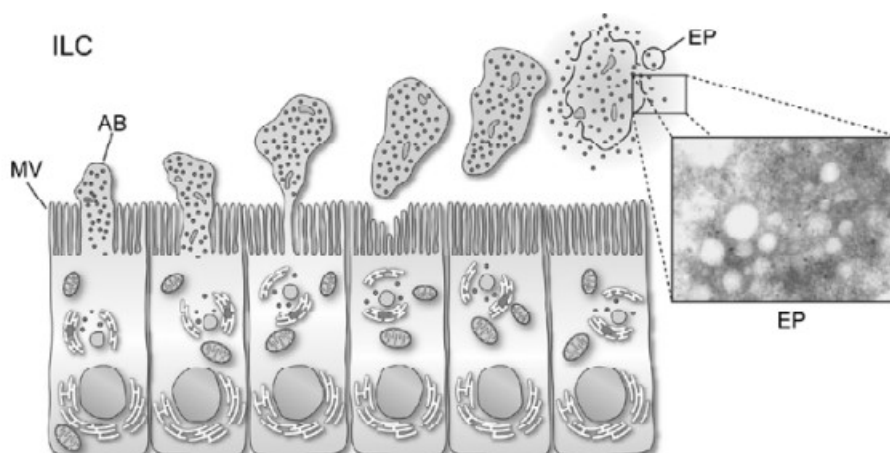
2001). Flotillin je protein asociovaný s kaveolami, což jsou membránové mikrodomény zapojené do tvorby váčků (Bickel et al. 1997). Rab GTPázy jsou zapojeny do transportu multivezikulárních tělísek k plazmatické membráně a uvolnění exozomu. Tetraspaniny se používají jako hlavní markery exozomů při jejich izolaci. Tyto membránové proteiny zřejmě mohou ovlivňovat složení molekul v exozomu a slouží pro selekci jeho nákladu (Kowal, Tkach, Théry 2014). Heat-shock proteiny jsou zapojeny do mechanismu vypořádání se s tepelným stresem (Clayton et al. 2005). Kromě těchto najdeme v exozomech také proteiny zapojené do tvorby multivezikulárních tělísek jako Alix nebo TSG101, které patří ke komplexu proteinů ESCRT (Kowal, Tkach, Théry 2014).

2. Epididymozomy

Mnoho maturačních procesů spermií savců probíhá v nadvarleti. (*epididymis*). Nadvarle je podlouhlý orgán anatomicky se členící na čtyři hlavní části, kterými jsou iniciální segment, *caput*, *corpus*, a *cauda* (Robaire, Hinton, Orgebin-Crist 2006, poprvé popsal Benoit 1926). Nezralé spermie uvolněné z varlete procházejí trubicí nadvarlete, kde spermie získávají vlastnosti potřebné k jejich cestě samičím reprodukčním traktem a oplození vajíčka. Každý epididymální segment je charakteristický odlišným složením proteinů a dalších makromolekul a při postupu podél lumen nadvarlete jsou tak spermie vystavovány množství řízených biochemických modifikací (Dacheux, Chevrier, Lanson 1987). Vzhledem k tomu, že jsou spermie buňky s vysoce kompaktním jádrem limitujícím transkripci a translaci vlastních proteinů a malým množstvím cytoplazmy, jsou závislé na složení okolního mikroprostředí a příjmu látek z něj (Alberts et al. 2002). Jedním ze způsobů transportu proteinů z epiteliálních buněk do intraluminálního kompartmentu nadvarlete je řízená sekrece pomocí mikrovezikulů zvaných epididymozomy, která je závislá na pohlavních hormonech (Yanagimachi et al. 1985). Apokrinní sekrece probíhá jako tvorba výběžku s obsahem mikrovezikulů na apikálním pólu buňky. Výběžek se po oddělení od membrány rozpadá a epididymozomy jsou uvolněny do extracelulárního prostoru do lumen nadvarlete (Obrázek 2). Epididymozomy jsou charakteristické vysokým podílem cholesterolu vůči fosfolipidům, z nichž je v membráně nejvíce procentuálně zastoupený sfingomyelin (Rejraji et al. 2006).

Epididymozomy jsou hojně studovány u skotu (např. Girouard, Frenette, Sullivan 2009, Schwarz et al. 2013) a myši (např. Nixon et al. 2019), ale byly popsány i u dalších savců, jako je kuň (Twenter et al. 2020), potkan (Fornes, Barbieri, Cavicchia 1995) a člověk (Thimon et al. 2008). Charakteristika býčích a myších epididymozomů se zdá být velmi podobná. Sférické vezikuly nepravidelného tvaru se u těchto druhů nepatrně odlišují svojí velikostí. U býka jsou menších rozměrů (25-300 nm) než u myši (50-800 nm). Složení membránových lipidů se ale liší, a to v podílu cholesterolu vůči fosfolipidům. Býčí epididymozomy obsahují v membráně více cholesterolu (Girouard, Frenette, Sullivan 2011, Rejraji et al. 2006). Také obsah proteinů se různí v závislosti na druhu. Existují však některé, pro funkci spermií podstatné proteiny, které jsou mezi druhy konzervované. Jedná se o různé enzymy ochraňující spermie před oxidativním poškozením nebo membránovou ATPázu podporující motilitu spermií (Patel et al. 2013, Taylor et al. 2013). Také transport miRNA pomocí epididymozomů byl potvrzen u několika druhů savců, a to zejména u myši a býka (Reilly et al. 2016, Belleannée et al. 2013). Zkoumány jsou ale také druhově specifické proteiny transportované do spermií. Příkladem mohou být molekuly

potřebné pro vazbu spermie na vajíčko. (např. Martin-DeLeon 2006)



Obrázek 2 – Apokrinní sekrece epididymozomů z epiteliálních buněk nadvarlete

Po oddělení od apikálního pólu buňky se výběžek rozpadá a epididymozomy jsou uvolněny do lumen nadvarlete.

AB – apikální výběžek, EP – epididymozomy, ILC – intraluminální kompartment, MV – mikrovilli

Převzato a upraveno: (Sullivan, Frenette, Girouard 2007)

2.1 Ochrana spermií před oxidativním poškozením

V lumen nadvarlete jsou kromě živých maturujících spermií také spermie mrtvé nebo umírající a defektní, které obohacují okolní prostředí o reaktivní formy kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species). ROS jsou vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku jako peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$) nebo hydroxylový radikál ($\cdot OH$), které poškozují buňky a jejich DNA a způsobují tzv. oxidativní stres (Sies, Jones 2020). ROS při poškození spermie unikají z elektrontransportního řetězce defektních mitochondrií (Chen et al. 2013). Kromě toho se v lumen nadvarlete vyskytují ROS částečně díky činnosti živých spermií, jejichž cytoplazma je bohatá na mitochondrie, které ROS produkují v malém množství i fyziologicky (Vernet, Aitken, Drevet 2004). Při vystavení dozrávajících spermií vysoké hladině ROS může dojít k poškození jejich membrány, snížení jejich schopnosti oplodnit vajíčko, či dokonce až k apoptóze (Aitken, Clarkson 1987). Jedním ze způsobů ochrany spermií před působením ROS je transport látek z epiteliálních epididymálních buněk do membrány spermií pomocí epididymozomů. Jedná se například o Epididymal sperm binding protein (ELSPBP1), který se zdá být specificky vázán pouze na mrtvé spermie v oblastech *caput* a *corpus*. Přesná funkce tohoto proteinu zatím nebyla objasněna, ale zdá se, že by jeho přítomnost mohla sloužit jako značka pro defektní spermie (D'Amours et al. 2012, Caroppo, Dattilo 2021). Jako kofaktor pro ELSPBP1 slouží ionty Zn^{2+} . S proteinem ELSPBP1 jsou specificky asociované další na epididymozomy vázané proteiny,

kteře vykazují antioxidační aktivitu. Jedná se například o Biliverdin reduktázu 1 (BLVRA), což je enzym, který stejně jako ELSPBP1 potřebuje ke své funkci ionty Zn^{2+} . Ukazuje se, že koncentrace Zn^{2+} je v lumen jednotlivých oddílů nadvarlete různě modulována, a takto je zřejmě ovlivněna aktivita na zinku závislých enzymů (D'Amours et al. 2012). BLVRA zajišťuje konverzi krevního barviva biliverdinu na bilirubin, který vykazuje vysoké cytoprotektivní účinky proti peroxidu vodíku. Ten je jednou z reaktivních forem kyslíku potenciálně ohrožující spermie (D'Amours et al. 2016). S ELSPBP1 a mrtvými spermii jsou asociovány také obě podjednotky proteinu clusterinu, který funguje jako chaperon. Vzhledem k tomu, že se clusterin podílí na odstraňování agregovaných proteinů a zbytků buněk z extracelulárního prostředí (Klock, Baiersdörfer, Koch-Brandt 2009), v asociaci s ELSPBP1 by mohl zajišťovat odstraňování zbytků poškozených spermii z lumen nadvarlete (D'Amours et al. 2016).

Díky specifickým vlastnostem membrány spermii, která je bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, jsou spermie vysoce náchylné také k poškození membránových lipidů způsobené ROS, zejména peroxidem vodíku (Storey 1997). Při správné funkci epitelu nadvarlete ovšem jeho buňky dopravují do spermii specificky pomocí epididymozomů antioxidační enzym glutathion peroxidázu 5 (GPX5). GPX5 intenzivně asociuje s membránou obklopující akrozom, která je k peroxidu nejcitlivější a zabraňuje jejímu poškození. Enzym zřejmě také snižuje míru oxidace spermatické DNA díky snížení četnosti výskytu 8-oxo-2'-deoxyguanosinu (Taylor et al. 2013).

2.2 Regulace genové exprese

Spermie jsou buňky s vysoce umlčeným genomem a při maturaci v nadvarleti jsou závislé na interakcích s molekulami v lumen *epididymis*. Epididymozomy kromě proteinů a lipidů obsahují také microRNA, které mohou transportovat do spermii a regulovat tak jejich genovou expresi. (Belleannée 2015).

MicroRNA (miRNA) je druhem malé nekódující RNA, která reguluje genovou expresi u většiny eukaryotických organismů pomocí mechanismu RNA interference (Bartel et al. 2018). Tento mechanismus posttranskripční modifikace zahrnuje nejprve transkripci prekurzoru primárnímiRNA ve formě vlásenky pomocí RNA polymerázy II (Lee et al. 2004), následnou úpravu na pre-miRNA RNázou Drosha (Lee et al. 2003) a interakci s komplexem enzymů Dicer-TRBP2, který tvoří výsledné, většinou 22 nukleotidů dlouhé double-strand miRNA (Wilson et al. 2015). Jedno z vláken poté interaguje s komplexem RISC (RNA-induced silencing complex), který se společně s miRNA váže na cílovou mRNA, kterou buď přímo degraduje nebo dochází

k umlčení její translace (Hannon et al. 2002). RNA interference je významným mechanismem v reprodukci savců, a to nejen v oblasti maturace spermií. MiRNA je přítomna také v mikrovezikulech ve zrajícím folikulu, kde se podílí na regulaci genové exprese v rámci vývoje samičích gamet. Stejně tak se mechanismus RNA interference díky transportu miRNA pomocí mikrovezikulů uplatňuje při vývoji embrya ve vejcovodu a v děloze (Sohel et al. 2013, Ng et al. 2013).

V nadvarleti se populace miRNA liší v oblastech *caput*, *corpus* a *cauda*, což přispívá ke správnému postupu modifikací spermie (Belleannée et al. 2012). Při studiu miRNA velmi záleží na postupu izolace, specifických vlastnostech vzorku a způsobu následné analýzy. Studie tak přináší často velmi různorodou škálu detekovaných miRNA (Rekker et al. 2014). Za zmínku stojí rodiny miRNA *lethal-7* (*let-7*) a *miR-30*, na jejichž přítomnosti a transportu se shodují autoři studující složení miRNA epididymozomů myši a býka. Tito savci jsou nejčastějším modelem nejen pro studium obecně epididymozomů, ale i miRNA (Reilly et al. 2016, Belleannée et al. 2013). Zmíněné rodiny miRNA *let-7* a *miR-30* figurují také při komunikaci buněk děložní sliznice a embrya při implantaci do dělohy (Ng et al. 2013).

2.3 Motilita spermií a získávání schopnosti fertilizace

Pro motilitu spermií je klíčová vyvážená intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} (Hong, Chiang, Turner 1984). V membráně spermií se nachází Ca^{2+} ATPáza 4 (PMCA4 – Plasma Membrane Calcium ATPase 4), která zajišťuje pumpování Ca^{2+} ven z buňky pro nastolení vápníkové homeostázy (Wennemuth, Babcock, Hille 2003). PMCA4 funguje ve dvou sestříhových variantách, a to PMCA4a, která je efektivnější v pumpování vápníku z cytosolu a PMCA4b (Caride et al. 2007). Ukazuje se, že tyto varianty jsou také různě exprimovány v rámci nadvarlete. Konkrétně PMCA4a je v nadvarleti četnější v oblasti *cauda* oproti *caput epididymis*, zatímco PMCA4b je rovnoměrně exprimována v celém nadvarleti (Patel et al. 2013). Do membrány spermií jsou pomocí epididymozomů transportovány obě varianty této vápníkové pumpy, protože PMCA4a varianta je sice efektivnější, ale pro optimalizaci vápníkové homeostázy je zřejmě potřeba obou variant PMCA4 v určitém poměru. Společně tvoří v membráně heterodimer za pomoci scaffold proteinu CASK (Ca^{2+} /CaM-dependent serine kinase), ten dále interaguje s molekulou JAM-A (junctional adhesion molecule-A), která napomáhá interakci obou sestříhových variant PMCA4 (Patel et al. 2013). PMCA4 není do spermií transportována pouze v nadvarleti, homeostáze iontů Ca^{2+} je potřebná i nadále pro dosažení motility a schopnosti oplození. Obohacování membrány o tuto vápníkovou pumpu tak

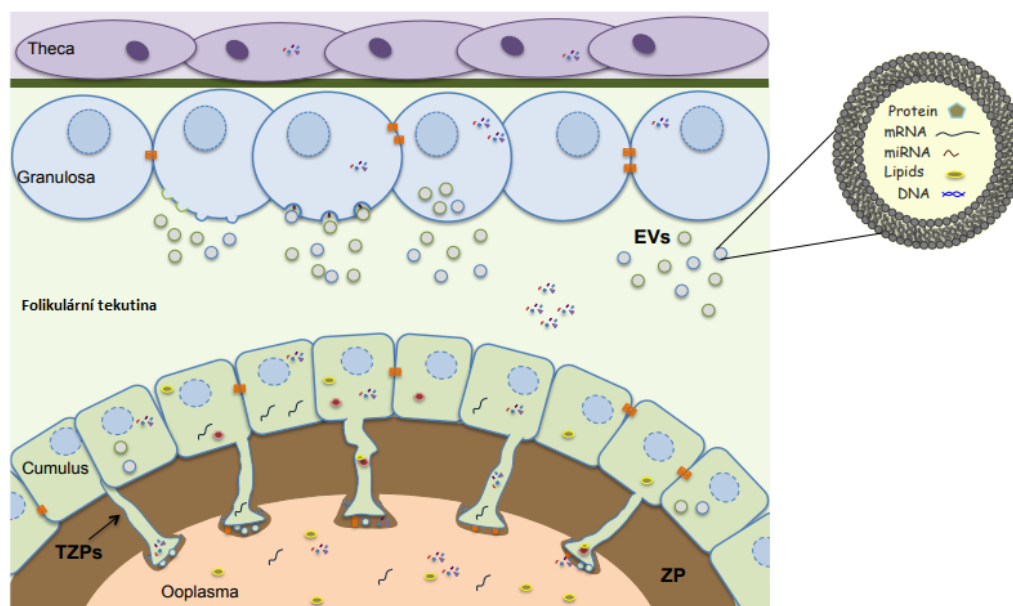
pokračuje i pomocí prostatozomů přítomných v prostatickém sekretu a oviduktozomů ve vejcovodu (Andrews, Galileo, Martin-DeLeon 2015, Al-Dossary, Strehler, Martin-DeLeon 2013).

Některé další proteiny transportované do spermií pomocí epididymozomů jsou proteiny asociované s povrchem spermie, nejčastěji ukotvené pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI kotvy). Do této skupiny proteinů spadá například protein Sperm-adhesion molecule 1 (SPAM1, synonymem je PH-20), který je přítomen v plazmatické membráně spermií i vnější membráně akrozomu (Martin-DeLeon 2006, Myles, Primakoff 1997). SPAM1 se díky své funkci hyaluronidázy podílí na důležitých procesech oplození, jako je interakce spermie s buňkami *cummulus oophorus* (Lin et al.1994), vazba na *zona pellucida* vajíčka a exocytóza akrozomálního váčku během akrozomální reakce (Myles, Primakoff 1997). GPI kotvou je u býka ke spermatické membráně připojen také P25b protein a jeho ortholog u křečka P26h. Tyto proteiny stejně jako SPAM1 podporují vazbu spermie na *zona pellucida* vajíčka při oplození (Légaré 1999, Frenette, Sullivan 2001).

3. EVs ve folikulu

Vývoj a dozrávání oocytu probíhá ve vaječnících ve folikulu, který se skládá ze samotného oocytu reprezentujícího pohlavní buňky a ze somatických buněk, které tvoří obaly vajíčka. Somatická složka folikulu je tvořena několika vrstvami granulózních buněk, které přímo obklopují oocyt a na které navazují buňky théky. Při zrání oocytu se diferencují folikulární buňky *cumulus oophorus* (Jones, Lopez 2013). Pro úspěšný vývoj není důležitá jen samotná kvalita oocytu, ale také okolních folikulárních buněk, a především jejich vzájemná intenzivní komunikace a stejně tak komunikace s oocytem. Zároveň je vývoj folikulu závislý na hormonální regulaci (Conti, Chang 2016). Prostředím, ve kterém probíhá transport signálních mediátorů mezi těmito buňkami, je folikulární tekutina, která vzniká v průběhu zrání oocytu. Folikulární tekutina je ultrafiltrátem plazmy a tvoří ji také produkty sekrece buněk folikulu z vrstev théky a granulózy. Obsahuje hormony a růstové faktory nezbytné pro vývoj folikulu (Edwards 1974). Kromě toho byly ve folikulární tekutině detekované také mikrovezikuly a exozomy, souhrnně nazývané jako EVs folikulární tekutiny, které různými způsoby zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami folikulu (Obrázek 3). Tyto vezikuly obsahují molekuly potřebné k dozrání oocytu, jako nejrůznější proteiny, mRNA a miRNA (da Silveira et al. 2012).

V porovnání s epididymozomy figurujícími v maturaci samčích gamet, které byly objeveny již v 60. letech minulého století (poprvé popsal Pikó 1967), se toho o extracelulárních vezikulech folikulární tekutiny ví velmi málo. Tyto mikrovezikuly a exozomy byly definovány před pouhými deseti lety (da Silveira et al. 2012) a množství dostupných studií a informací na toto téma je tak značně omezené. Na rozdíl od epididymozomů, u kterých byl detekován přenos mnoha proteinů, se u EVs folikulární tekutiny studuje převážně transport miRNA mezi buňkami folikulu a vliv těchto miRNA na jednotlivé kroky vývoje folikulu (např. Navakanitworakul et al. 2016, da Silveira et al. 2014). Rozdílem je také to, že u epididymozomů se předpokládá jednosměrný transport od buněk lumen nadvarlete ke spermii. Naopak ve folikulu probíhá transport vezikulů mezi několika druhy buněk a většinou secernující buňka je zároveň i buňkou recipientní (da Silveira et al. 2012). Hlavními modely pro studium mikrovezikulů a exozomů z folikulární tekutiny jsou koně (např. da Silveira et al. 2012) a skot (Sohel et al. 2013).



Obrázek 3 – Schéma komunikace buněk pomocí EVs v rámci vývoje folikulu

Transport mikrovezikulů a exozomů mezi buňkami ve folikulární tekutině je zapojen do úspěšného vývoje folikulu a oocyty. Převzato a upraveno: (Andrade et al. 2019)

3.1 Vývoj folikulu a růst oocyty

Ve folikulární tekutině probíhá stejně jako například v děloze či nadvarleti intenzivní syntéza a transport miRNA, které se dále podílejí na regulaci růstu a vývoje zrajícího folikulu. V extracelulárním prostoru folikulu se nachází jednak miRNA asociovaná s exozomy uvolněnými okolními buňkami, tak miRNA neexozomálního původu asociovaná s proteinem AGO2. AGO2 je enzym v mechanismu RNA interference, kde je součástí již dříve zmíněného komplexu RISC a zprostředkovává umlčení mRNA. MiRNA takto asociované s proteinem AGO2 jsou stejně jako uvnitř EVs chráněny před degradací v extracelulárním prostředí (Arroyo et al. 2011). Ve folikulární tekutině rostoucího oocyty skotu v porovnání s oocytem finální velikosti je pozorována up-regulace miRNA souvisejících s regulací exprese genů pro růst a transport. Tyto geny jsou zapojeny do signálních drah asociovaných s růstem a vývojem folikulu, jako jsou signální dráha závislá na ubiquitinu, neurotropinová signální dráha, MAPK signální dráha a signální dráhy závislé na inzulinu (Sohel et al. 2013). Ubiquitinová signální dráha v oocyty ovlivňuje mnoho buněčných procesů včetně průběhu buněčného cyklu a dělení buňky (Huo et al. 2004). Neurotropinová signální dráha je důležitá při časném vývoji, stejně jako MAPK signální dráha, která ovlivňuje maturaci oocyty v závislosti na folikulostimulačním a luteinizačním hormonu (Dissen, Garcia-Rudaz, Ojeda 2009, Zhang, Ouyang, Xia 2009). Inzulinové signální dráhy se podílejí na regulaci růstu oocyty (Acevedo, Ding, Smith 2007). Další signální drahou klíčovou pro vývoj folikulu, kterou modulují miRNA transportované

pomocí exozomů je TGF- β /BMP (da Silveira et al. 2014). Členové TGF- β rodiny jsou regulátory buněčné proliferace a diferenciaci v rámci raného vývoje buněk folikulu a pozdější expanze *cummulus oophorus* (Elvin, Yan, Matzuk 2000). Do granulózních buněk folikulu jsou zřejmě pomocí exozomů dopravovány druhy miRNA, které regulují hladiny receptorů pro molekuly signální dráhy TGF- β /BMP. V exozomech se také nachází vysoká hladina jednoho těchto receptorů ACVR1, což naznačuje, že je exozomy transportován i samotný receptor (da Silveira et al. 2014).

Skupinu miRNA upregulovaných během vývoje folikulu u skotu reprezentuje miR-204, která je zapojena do inhibice buněčné proliferace, což naznačuje souvislost s poklesem buněčné proliferace v průběhu vývoje folikulu. Naopak s růstem folikulu se zvyšuje angiogeneze a vaskularizace, které jsou ovlivňovány růstovým faktorem VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), jehož syntézu moduluje miR-150, další miRNA, jejíž koncentrace roste s velikostí folikulu (Navakanitworakul et al. 2016).

3.2 Růst a expanze *cummulus oophorus*

Buňky *cummulus oophorus* vznikají během vývoje folikulu ze zvětšujících se granulózových buněk v okolí oocyty. Během růstu folikulu se počet jejich vrstev zvyšuje a následně dochází k jejich expanzi, což má za následek úspěšný průběh ovulace (Conti, Chang 2016). I v této fázi vývoje folikulu se uplatňuje MAPK signalizace, která je regulována miRNA a ovlivňuje transkripci genů pro enzymy Has2 (Hyaluronan synthase 2) a Ptgs2 (Prostaglandin endoperoxide synthase 2). Ty jsou stejně jako miRNA transportovány mikrovezikuly a exozomy folikulární tekutiny k buňkám *cummulus oophorus*. Has2 je, jak už z názvu vyplývá, odpovědný za produkci kyseliny hyaluronové v extracelulární matrix *cummulus oophorus*, což je jedním z klíčových kroků expanze buněk *cummulus oophorus*. Na expanzi folikulárních buněk, která vede k uvolnění oocyty má podíl i druhý zmíněný Ptgs2, který tvorbou prostaglandinu podporuje rozvolnění a prasknutí folikulu (Javadi et al. 2022).

4. Prostatozomy

Prostata je žlázovým orgánem s exokrinní funkcí produkující prostatický sekret. Prostatický sekret se během ejakulace dostává do extracelulárního prostředí spermií, kde molekuly v něm obsažené zajišťují jejich ochranu a další modifikace potřebné k oplození. Součástí prostatického sekretu jsou EVs zvané prostatozomy, které jsou produktem epiteliálních buněk prostaty (Ronquist, Brody 1985). Prostatozomy bývají charakterizovány jako exozomy nebo příbuzné exozomům, protože proces jejich uvolňování spočívá ve fúzi vezikulárních tělísek z pozdního endozomu. Tvorba a uvolňování prostatozomů probíhá v epiteliálních buňkách prostaty, odkud jsou uvolněny do prostatického sekretu. Prostatozomy jsou EVs obklopené multilamelární lipoproteinovou dvojrůstvou a jejich charakteristickým znakem je také zastoupení lipidů v jejich membráně (Saez, Sullivan 2016, Arienti et al. 1998). Ta je velmi bohatá na cholesterol, přesněji řečeno má vysoký podíl cholesterolu vůči fosfolipidům a vykazuje tak nízkou fluiditu. Z fosfolipidů bylo zjištěno vysoké zastoupení sfingomyelinu, až 50 %. Složení mastných kyselin je také neobvyklé díky vysokému obsahu nasycených mastných kyselin, jako jsou například kyselina stearová a palmitová (Arienti et al. 1998). Vysoký podíl cholesterolu a nasycených mastných kyselin zaručuje vysokou rigiditu membrány, která zřejmě souvisí s fúzí prostatozomů se spermiemi (Carlini et al. 1997).

Při ejakulaci se prostatozomy dostávají do blízkosti spermií a díky transportu nejrůznějších proteinů a lipidů zajišťují jejich ochranu v samičím reprodukčním traktu a podporují jejich motilitu, kapacitaci a akrozomální reakci. Fúze prostatozomů se spermiemi probíhá v reprodukčním traktu samice na základě kyselého pH a přítomnosti progesteronu, který je vylučován folikulem (Saez, Sullivan 2016).

4.1 Zvýšení pohyblivosti spermií a ochrana před oxidativním stresem

Prostatozomy, stejně jako epididymozomy v nadvarleti (Patel et al. 2013) a oviduktozomy ve vejcovodu (Al-Dossary, Strehler, Martin-DeLeon 2013) dopravují do membrány spermií vysoce účinnou vápníkovou ATPázu PMCA4. Tato vápníková pumpa je vkládána do spermatické membrány specificky v místech lipidových raftů v oblasti krčku a střední části bičíku (Andrews, Galileo, Martin-DeLeon 2015). Tato specifická lokalizace zřejmě souvisí s pozdějším procesem kapacitace, během něž se množství molekul fungujících jako mediátory signalizace soustředí do lipidových raftů (Cross 2004). PMCA4 stejně jako v nadvarleti funguje jako iontová pumpa, která odstraňuje Ca^{2+} z cytosolu a zajišťuje tak vápníkovou homeostázu pro pohyb spermie (Andrews, Galileo, Martin-DeLeon 2015). S ATPázou PMCA4 interagují

v membráně další proteiny transportované prostatozomy. Příkladem mohou být endotheliální nitric oxid syntáza eNOS (endothelial nitric oxid synthase) a neuronální nitric oxid syntáza nNOS (neuronal nitric oxid synthase) (Andrews, Galileo, Martin-DeLeon 2015). Tyto proteiny v určité fázi maturace produkují oxid dusnatý, který je zapojen do procesů předcházejících oplození včetně kapacity a akrozomální reakce (Herrero, Gagnon 2001).

Dalším enzymem, který ovlivňuje hladinu iontů Ca^{2+} a tím i pohyblivost spermií, je adenosin difosfát ribosyl cykláza (ADPR-cykláza), u savců konkrétně ADPR-cykláza CD38. Produktem CD38 jsou cADPR a NAADP, které fungují jako aktivátory signalizace pomocí Ca^{2+} iontů. Park et al. (2011) ukázali, že v samotných spermiích izolovaných od seminální tekutiny se CD38 nenachází. Naopak ve spermiích obklopených seminální tekutinou, kde byly přítomny i prostatozomy, které jsou na CD38 velmi bohaté, byly detekovány spermie obsahující CD38. Bylo také zjištěno, že aktivita CD38 je zesílena progesteronem a díky tomu dochází k dlouhotrvající signalizaci, uvolňování iontů Ca^{2+} a hypermotilitě spermií potřebné k pohybu k vajíčku a oplození (Park et al. 2011).

Důležitou skupinou enzymů přítomných v seminální tekutině v asociaci s prostatozomy i volně jsou také enkefalin degradující enzymy. Konkrétně aminopeptidáza N, která je přítomna ve všech frakcích seminální tekutiny včetně prostatozomů, a neutrální endopeptidáza, která je asociována pouze s prostatozomy. Funkce těchto enzymů spočívá v degradaci endogenních opioidů, například enkefalinů, které jsou v lidském ejakulátu přítomny ve velkém množství, stejně jako opioidy degradující enzymy. Předpokládá se, že vysoké hladiny endogenních opioidů poškozují funkce spermií, zejména motilitu a vedou k neplodnosti (Irazusta et al 2004).

4.2 Ochrana před vlivy samičího reprodukčního traktu

Pro zajištění životaschopnosti v prostředí samičího reprodukčního traktu potřebuje savčí spermie mechanismy pro obranu proti samičímu imunitnímu systému. Prostatozomy zřejmě transportují některé molekuly zapojené do procesů potlačení samičí imunity a doplňují tak funkci ostatních imunomodulačních složek seminální tekutiny (Burden et al. 2006). Jedním ze způsobů ochrany spermií pomocí prostatozomů je pravděpodobně transport prostaglandinů E, které mohou inhibovat proliferaci lymfocytů (Kelly et al. 1991). Spermie jsou mimo jiné ohroženy také složkou nespecifické imunity, komplementovou kaskádou, která slouží převážně jako ochrana před patogeny, ale může ovlivňovat i spermie (Frolíková et al. 2012). Tento imunitní mechanismus ovšem umí spermie modulovat pomocí tří regulačních proteinů CD46, CD55 a CD59, které získávají po kontaktu s prostatozomy (Burden et al. 2006). CD46 se

nachází v oblasti akrozomu, kde by mohl ochraňovat spermie před komplementární kaskádou po akrozomální reakci. Ukazuje se ovšem, že CD46 je přítomen i u spermií, které se nedostanou do blízkosti vajíčka, proto CD46 zřejmě má u spermií jinou roli. Naopak zmíněné CD55 a CD59, které se nacházejí v membráně spermie, by se zřejmě mohly podílet na ochraně spermií před komplementární kaskádou (Frolíková et al. 2012). Prostatozomy slouží také pro přenos antimikrobiálních látek na ochranu spermií v ženském reprodukčním ústrojí, jehož součástí je také specifická mikroflóra. U člověka byl v seminální tekutině v asociaci s prostatozomy objeven antibiotický protein hCAP-18, který patří do skupiny katelicidinů a uvolňuje aktivní peptid LL-37. hCAP-18 je složkou vrozené imunity a ochraňuje před grampozitivními i gramnegativními bakteriemi a některými druhy kvasinek (Andersson et al. 2002).

4.3 Kapacitace a akrozomální reakce

Kapacitace je komplexní sled biochemických dějů zahrnující vzrůst hladiny iontů Ca^{2+} , cAMP a ROS a také změny ve složení proteinů a lipidů v membráně (Aalberts et al. 2013). Počátek kapacitace probíhá aktivací enzymu adenylátcykláza, který díky tvorbě cAMP aktivuje proteinkinázu A a ta indukuje fosforylaci proteinů (Harrison, Miller 2000). Díky tomu dochází ke změnám v organizaci membrány, asymetrii lipidů a extrakci cholesterolu z membrány (Harrison, Ashworth, Miller 1996, Flesch et al. 2001). Tyto změny vyústí v odstranění glykoproteinového obalu spermie a proteinů semenné plazmy z oblasti akrozomu a následně může dojít k akrozomální reakci, která umožní spermii splynout s vajíčkem (Burden et al. 2006). Výsledky studií se v oblasti funkce prostatozomů v kapacitaci a akrozomální reakci liší. Některé výzkumy potvrzují přítomnost enzymů specifických pro kapacitaci v prostatozomech a jejich transport do spermií (Palmerini et al. 2003, Aalberts et al. 2013), jiné naopak definují prostatozomy jako vezikuly zabraňující kapacitaci a akrozomální reakci (Cross, Mahasreshti 1997, Pons-Rejraji 2011). Prostatozomy tedy zřejmě nejdříve způsobují zpomalení kapacitace a navazující akrozomální reakce a poté, když se spermie dostane do blízkosti vajíčka, ji naopak podporují (Burden et al. 2006).

Procesem, který má za následek zabránění předčasné kapacitaci a akrozomální reakci, je transport cholesterolu z prostatozomální do spermatické membrány (Cross, Mahasreshti 1997). Prostatozomy mají ve své membráně vysoké zastoupení cholesterolu a díky fúzi s PM spermie ji o cholesterol obohacují, stejně jako o sfingomyelin a další nasycené glykofosfolipidy. Přítomnost cholesterolu a nasycených glykofosfolipidů způsobuje snížení fluidity membrány, a tím zpoždění akrozomální reakce (Arienti et al. 1998, Cross, Mahasreshti 1997). Naopak enzym arachidonát 15-lipoxygenáza, který má také vliv na složení a fluiditu membrány, patří mezi

faktory podporující kapacitaci a akrozomální reakci. Vliv arachidonát 15-lipoxygenázy na průběh akrozomální reakce byl potvrzen u několika druhů savců mezi které patří skot, křeček a člověk (Lax et al. 1990, Meizel, Turner 1984). Působení lipoxygenázy na kyselinu arachidonovou a jiné polynenasycené mastné kyseliny v membráně spermií může vyvolat peroxidaci lipidů a zvýšení fluidity membrány, což iniciuje akrozomální reakci. Stejným mechanismem působí i fosfolipáza A2, která byla také detekována v prostatozomech (Oliw et al. 1993). Dalším proteinem přítomným v prostatozomech a usnadňujícím akrozomální reakci je diadenosin polyfosfát hydroláza, enzym degradující diadenosin polyfosfáty, v reprodukčním traktu konkrétně diadenosin tetrafosfát Ap4A, který je zodpovědný za proliferaci buněk, a antiproliferační diadenosin trifosfát Ap3A. Diadenosin tetrafosfát může být tímto enzymem degradován až na adenosin, který se váže na adenosinové receptory na spermatické membráně. Stimulace adenosinových receptorů podporuje kapacitaci a následnou akrozomální reakci (Minelli et al. 2002).

Z výše uvedených studií vyplývá, že prostatozomy jsou schopny transportovat z prostatického sekretu do spermií savců molekuly nejrůznější povahy. Obohacení spermií o tyto molekuly podporuje přežití spermií v samičím reprodukčním ústrojí, motilitu a stejně tak procesy předcházející úspěšné oplození jako kapacitace a akrozomální reakce (Simon et al. 2018).

5. Oviduktozomy

Vejcovod je orgánem propojujícím vaječníky a dělohu. Probíhá zde transport zralého vajíčka z vaječníků a skladování a transport spermií. Ve střední části zvané *ampulla*, která se nachází mezi nálevkovitým ústím (*infundibulum*) a zúženým zakončením (*isthmus*), dochází ke kontaktu vajíčka a spermie a následnému oplození (Jones, Lopez 2013). Vejcovod obsahuje v lumen oviduktální tekutinu, jejíž součástí jsou EVs zvané oviduktozomy. Tyto vezikuly jsou secernované epitelem vejcovodu do jeho lumen, kde interagují s přítomnými gametami a podporují jejich schopnost oplození (Al-Dossary et al. 2013). Termín oviduktozomy souhrnně označuje exozomy o velikostech 25-100 nm a mikrovezikuly o průměru 100-1000 nm (Bathala et al. 2018). Ty byly identifikovány v oviduktální tekutině člověka (Bathala et al. 2018), myši (Al-Dossary et al. 2013) a skotu (Lopera-Vasquez et al. 2016). Biogeneze oviduktozomů, zřejmě jak mikrovezikulů, tak exozomů, probíhá apokrinně odštěpením vezikulu z plazmatické membrány buňky a jeho uvolněním do luminální tekutiny (Bathala et al. 2018). Sekrece je regulována samičími pohlavními hormony estradiolem a progesteronem a díky tomu se mění hladiny látek obsažených ve vezikulech v jednotlivých částech estrálního či ovulačního cyklu (Alminana et al. 2018). Extracelulární vezikuly vejcovodu jsou zodpovědné za transport několika proteinů potřebných ke kapacitaci a akrozomální reakci do membrány spermií a zajišťují tak jejich schopnost splynout s vajíčkem (Bathala et al. 2018, Al-Dossary et al. 2015).

5.1 Podpora spermií při skladování ve vejcovodu

U většiny placentálních savců není ovulace synchronizována s oplozením. Spermie jsou v samičím těle uchovávány ve vejcovodu v oblasti *isthmus*, kde jsou navázány na epitel do doby uvolnění oocyty z folikulu (Pollard et al. 1991). U býka k vazbě zřejmě přispívají Annexiny, konkrétně ANXA1, 2, 4 a 5, které jsou obsaženy v oviduktozomech a také na povrchu epitelálních buněk vejcovodu, kde slouží jako receptory pro BSP proteiny (bovine seminal plasma) lokalizované na hlavičce spermií (Ignatz et al. 2007). Studie ukazují, že na vazbu spermií na vejcovod má vliv také protein HSPA8, který je dopravován do spermií pomocí exozomů izolovaných z oviduktální tekutiny (Alminana-Brines 2015). HSPA8/HSP70 (Heat-shock protein A8) je členem rodiny Heat shock proteinů HSP70 (Stricher et al., 2013) a má pozitivní vliv na udržení životaschopnosti spermií a jejich schopnosti vazby na buňky vejcovodu před kapacitací (Alminana-Brines 2015, Moein-Vaziri et al., 2014). Ochrana před poškozením pomocí HSPA8 zřejmě spočívá v rychlé opravě a modifikaci fluidity narušené membrány spermií, a tím jejich únik před buněčnou smrtí. Bylo také potvrzeno, že spermie jsou

citlivé na interakci s HSPA8 před tím, než projdou kapacitací. Pro vazbu tohoto Heat-shock proteinu je totiž nutný vysoký obsah cholesterolu v membráně, který se ve spermii nachází právě před procesem kapacitace při vazbě na stěnu vejcovodu (Moein-Vaziri et al., 2014).

5.2 Podpora hypermotility, kapacitace a akrozomální reakce

Jak bylo již zmíněno v minulých kapitolách, pro hypermotilitu spermií a dosažení kapacitace a akrozomální reakce je klíčové udržení vápníkové homeostázy v cytosolu spermií (Al-Dossary et al. 2015). Stejně jako pomocí epididymozomů a prostatozomů majících původ v samčím reprodukčním ústrojí, probíhá také pomocí oviduktozomů ve vejcovodu transport vápníkové ATPázy PMCA4. Ten je klíčový zejména proto, že spermie mají v prostředí vaječníku vysokou intracelulární hladinu vápníku a potřebují proto efektivní způsob ustavení homeostázy Ca^{2+} iontů (Al-Dossary et al. 2013). Transport je hormonálně regulován a jeho účinnost se zvyšuje v období ovulace u člověka a estru u jiných savců díky zvýšené hladině pohlavních hormonů (Al-Dossary et al. 2016). Delece genu pro PMCA4 vede u myši k neplodnosti samců kvůli nemožnosti dosáhnout hypermotility spermií potřebné k překonání samičího reprodukčního traktu k místu setkání s oocytem. Zajímavé je, že samice jsou na rozdíl od samců i po deleci genu pro PMCA4 plodné, přestože koncentrace vápníku v epitelu vejcovodu ovlivňuje funkci řasinek transportujících oocyt (Shuh et al. 2004, Ghersevich, Massa, Zumoffen 2015). Bylo zjištěno, že při nedostatečné funkci PMCA4 může v samičím reprodukčním traktu funkci hlavní vápníkové pumpy převzít PMCA1 přítomná v oviduktozomech, ovšem u samců tomu tak není (Bathala et al. 2018).

Podpory motility spermií se účastní také jeden z nejvíce abundantních proteinů oviduktální tekutiny OVGP1 (oviduct-specific glycoprotein 1) (Kouba et al. 2000). Tento protein byl detekován v oviduktozomech několika druhů savců včetně ovcí, skotu a prasat (Sutton et al. 1984, Satoh et al. 1995, Buhi et al. 1990) a kromě podpory motility je po transportu do spermií zapojen také do řízení průběhu kapacitace, akrozomální reakce, oplození a rýhování zygoty (King, Anderson, Killian 1994, Kouba et al. 2000). Díky vazbě na *zona pellucida* je také u prasat účinným nástrojem pro předcházení polyspermie (McCauley et al. 2003). OVGP1 je doručován do spermií pomocí oviduktozomů společně s myosinem MYH9 (Myosin heavy-chain 9), který napomáhá interakci OVGP1 se spermii v prostředí vejcovodu (Kadam et al. 2006, Almiñana et al. 2017).

5.3 Regulace genové exprese

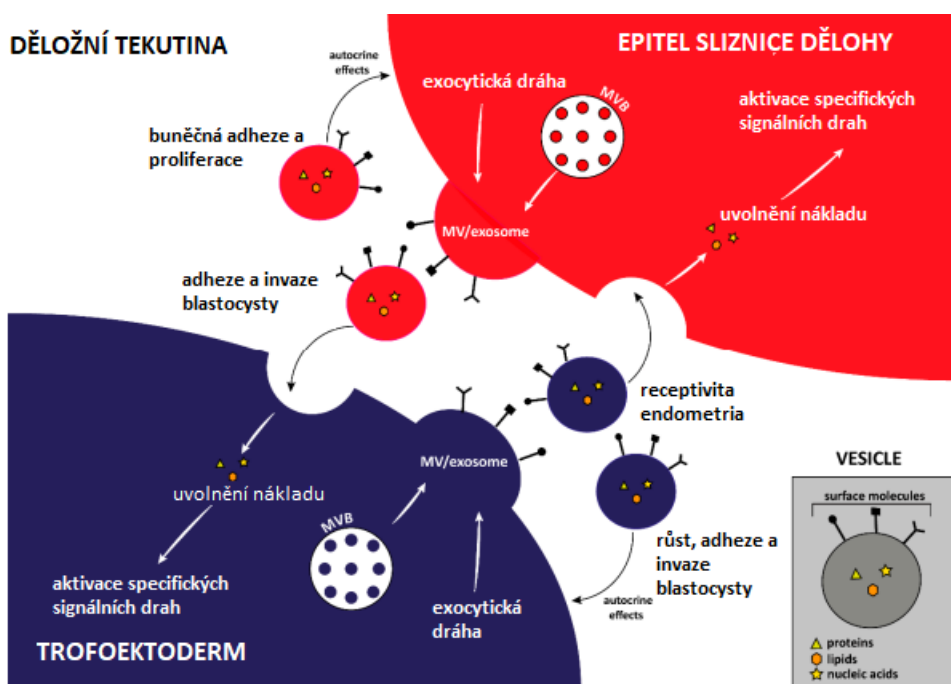
Kromě proteinů oviduktozomy jako nástroj mezibuněčné komunikace mezi buňkami transportují i miRNA. Regulace genové exprese prostřednictvím miRNA transportovaných EVs probíhá u samic savců, jak již bylo dříve zmíněno také ve vaječnicích, kde je miRNA pravděpodobně hlavním nákladem EVs. I tady jsou stejně jako ve vejcovodu a později i v děloze konkrétní druhy miRNA zapojeny do drah buněčného růstu a dělení (Sohel et al. 2013, Tang et al. 2007). Přítomnost konkrétních druhů miRNA a hladina jejich exprese je v oviduktozomech modulována oscilujícími hladinami hormonů v jednotlivých fázích estrálního cyklu. Zároveň miRNA obohacující spermie ve vejcovodu cílí na geny kódující proteiny zapojené do procesů buněčného růstu a dělení v rámci vývoje embrya. Na vývoj embrya má vliv výrazně upregulovaná miR-34c-5p, která moduluje genovou expresi při prvním dělení zygoty. Tuto miRNA zygota získává ze spermie, kam je dopravována již v nadvarleti, ale pro dostatečnou hladinu je nutný další transport z epitelu vejcovodu pomocí oviduktozomů. Oviduktozomy ovšem kromě přímého transportu konkrétní miRNA, který její hladinu zvyšuje, mohou naopak ovlivňovat buňky spermii k poklesu exprese miRNA. Tento způsob mezibuněčné komunikace má zřejmě vliv na hladiny let-7a-5p, která je součástí již dříve zmiňované miRNA rodiny let-7 (Ferestesh et al. 2018).

5.4 Časný vývoj embrya

Předtím, než dojde k implantaci embrya v děloze, začíná po oplození vajíčka v prostředí vejcovodu rýhování zygoty a časný embryonální vývoj. Ve vejcovodu také u většiny savců nastává aktivace embryonálního genomu, což je klíčovou událostí pro další vývoj embrya (Betteridge, Fléchon 1988, Memili, Dominko, First 1998). Zdá se, že EVs z ovidukální tekutiny hrají pravděpodobně důležitou roli při podpoře růstu a vývoje časného embrya (Lopera-Vasquez et al. 2016). Již ve dvoubuněčném stadiu probíhá intenzivní obousměrná komunikace pomocí EVs. Buňky epitelu vejcovodu uvolňují oviduktozomy přijímané embryem, které samo pomocí vezikulů taktéž nazývaných oviduktozomy komunikuje s vejcovodem (Fu, Liu 2020).

6. EVs v děloze

V děloze dochází k implantaci embrya a postupnému vývoji placenty, která propojuje organismus matky a plodu a zajišťuje jeho výživu. Placenta je společným orgánem složeným z mateřských buněk sliznice dělohy a embryonálních buněk trofoblastu (Jones, Lopez 2013). EVs, mikrovezikuly i exozomy, které jsou součástí mikroprostředí v děložní tekutině, některými autory nazývané uterozomy, plní důležitou úlohu v komunikaci mezi buňkami matky a embrya. Tyto EVs jsou jednak mateřského původu, secernované buňkami děložní sliznice a také embryonálního původu (Obrázek 4). Komunikace mezi embryem a sliznicí dělohy zahrnuje transport proteinů, mRNA a miRNA, které přispívají k vývoji blastocysty a trofoektodermu a podporují tak implantaci embrya do dělohy a vývoj placenty (Ng et al. 2013). Extracelulární vezikuly byly identifikovány v děložní tekutině několika druhů savců včetně myši, ovce a člověka (Griffiths et al. 2008, Burns et al. 2014, Greening et al. 2016).



Obrázek 4 – Schéma komunikace pomocí EVs mezi epitelem děložní sliznice a embryem

Mikrovezikuly a exozomy přítomné v děložní tekutině zajišťují komunikaci mezi epitelem děložní sliznice a buňkami embrya ve stadiu blastocysty. Transport EVs podporuje procesy potřebné k implantaci embrya do dělohy a k vývoji placenty jako spojení mezi matkou a plodem.

Převzato a upraveno: (Andronico et al. 2019)

6.1 Implantace embrya a vývoj placenty

U člověka implantace embrya ve stadiu blastocysty probíhá typicky mezi 22-24 dnem cyklu ženy, kdy je sliznice dělohy receptivní (Wilcox, Baird, Weinberg 1999). Pro úspěšné uhníždění v děložní sliznici je nutná komunikace a kooperace právě mezi buňkami blastocysty a endometria, která je mimo jiné zprostředkována také EVs endometriálního a embryonálního původu, jejichž produkce je závislá na hladině progesteronu (Salamonsen et al. 2016, Ng et al. 2013). Po uhníždění embrya do sliznice dělohy dochází k vývoji placenty, který provází zvýšená angiogeneze a vaskularizace. Dále dochází k vývoji placentárních cév, které podporují transport látek k vyvíjejícímu se embryu (Jones, Lopez 2013).

Vývoj placenty a cévního zásobení probíhá v děloze za nízkého obsahu kyslíku. V prvním trimestru se koncentrace O_2 pohybuje okolo 3 %, následně stoupá asi na 8 %. Také uvolňování EVs je tak závislé na hypoxickém prostředí ve tkáni, stejně jako transportovaný obsah proteinů a miRNA (Salomon et al. 2013). Nejvyšší množství uvolňovaných exozomů z buněk trofoblastu bylo zaznamenáno při inkubaci tkáně v podmínkách s upravenou atmosférou s obsahem 1 % kyslíku (Salomon et al. 2013). Tato koncentrace není fyziologická a projevuje se spíše jako ischemie u patologických těhotenství. To naznačuje možnost využití exozomů jako markerů pro těhotenské komplikace. Kromě koncentrace kyslíku je pro bioaktivitu EVs z trofoblastu důležitá také extracelulární koncentrace glukózy (Rice et al. 2015). Bylo potvrzeno, že vysoká koncentrace D-glukózy (25mM) významně zvyšuje množství uvolněných vezikulů z trofoblastu, které vykazují zvýšenou schopnost imunomodulace pomocí cytokinů (Rice et al. 2015, Salomon, Rice 2017). První trimestr těhotenství je totiž charakteristický prozánětlivým prostředím v děloze, které podporuje proces implantace embrya a invazi trofoblastu. Za imunitní reakce během implantace jsou zodpovědné zejména makrofágy, které produkují zánětlivé cytokiny. Buňky trofoblastu rekrutují makrofágy a modulují jejich vývoj a specifickou sekreci prozánětlivých látek (Fest et al. 2007). Ukazuje se, že jeden ze způsobů komunikace mezi trofoblastem a makrofágy zahrnuje transport exozomů, které zesilují migraci makrofágů a podporují jejich produkci cytokinů. Konkrétně mRNA prozánětlivých cytokinů IL-1 β , který je mediátorem lokálního zánětu, a také TNF- α a IL-6 jsou při inkubaci makrofágů s exozomy buněk trofoblastu signifikantně zvýšeny. Naopak hladiny protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β se při inkubaci s trofoektodermálními exozomy výrazně nemění (Atay et al. 2011).

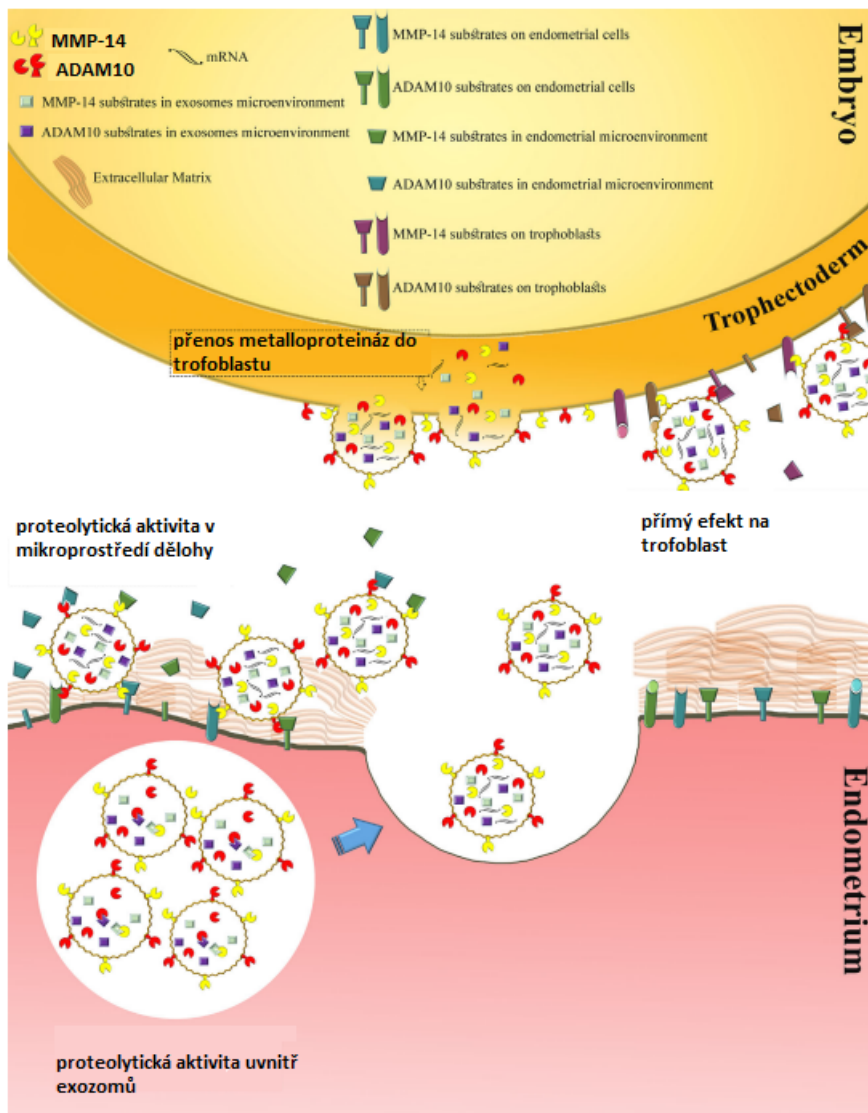
Při modulaci tkání probíhající při implantaci embrya probíhají intenzivní změny genové exprese, stejně jako v procesech tomuto předcházejících. Let-7 je rodina miRNA konzervovaná

u mnoha živočichů včetně savců a člověka, která působí jako tumor supresor (Pasquinelli et al. 2000, Barh et al. 2010). Let-7 kontroluje buněčnou proliferaci díky inhibici transkripce některých genů, které souvisí s buněčným cyklem jako cykliny a cyklin-dependentní kinázy (Barh et al. 2010). Exprese této miRNA se dynamicky mění během časného vývoje embrya (Tang et al. 2007). U myši je v blastocystě připravené k implantaci hladina let-7 miRNA významně down-regulována a podobné výsledky se očekávají i u člověka. (Liu et al. 2012) MiRNA rodina miR-30 zahrnující 5 členů (a-d) je významně nabohacena v endometriálních buňkách, kde reguluje aktivitu genů ovlivňujících proliferaci buněk (Ng et al. 2013, Li et al. 2011, Altmäe et al. 2013). Při analýze lidské miR-30d byla detekována zvýšená exprese genů, kódujících adhezivní molekuly jako integriny (ITGB3, ITGA7) a kadheriny (CDH5), které podporují adhezi embrya k děložní sliznici (Vilella et al. 2015). Kromě toho se ukazuje, že miR-30d je zapojena do modulace hormonální odpovědi tím, že ovlivňuje sekreci β -estradiolu, hormonu důležitého pro proliferaci endometria (Moreno-Moya et al. 2014). MiR-21 má důležitou úlohu v podpoře růstu embrya díky regulaci již v době před implantací. Tato miRNA slouží jako anti-apoptotický faktor díky regulaci exprese apoptotických proteinů a zajišťuje tak vývoj embrya a potlačení apoptózy buněk (Zhang et al. 2015, Lv et al. 2018).

Při vývoji a růstu placenty je mezi buňkami pomocí exozomů transportován také miRNA cluster chromozomu 19, C19MC, který je specifický primárně pro buňky placenty, ale vyskytuje se také ve varlatech, embryonálních kmenových buňkách a některých nádorech (Delorme-Axford et al. 2013a, Ouyang et al. 2014, Donker et al. 2012). Delorme-Axford et al. (2013) pozorovali přítomnost C19MC miRNA v exozomech odštěpených z buněk primárního lidského trofoblastu (primary human trophoblast – PHT) a jejich transport do placentálních fibroblastů a ostatních nonplacentálních buněk jako endoteliálních děložních buněk, děložních mikrovaskulárních endoteliálních buněk a fibroblastů předkožky (Delorme-Axford et al. 2013a). Ouyang et al. (2014) předpokládají transport i do jiných buněk v těle matky a embrya (Ouyang et al. 2014). Díky přítomnosti clusteru C19MC jsou buňky trofoblastu, který je protektivní bariérou mezi maternálním a fetálním mikroprostředím, rezistentní vůči virům, které by mohly poškodit vyvíjející se plod, konkrétně coxsackievirus B3, poliovirus, virus vezikulární stomatitidy, virus vakcinie a herpes simplex virus-1 (Delorme-Axford et al. 2013a). Stejně jako buňky trofoblastu jsou chráněny i okolní tkáň receptivní pro exozomy trofoblastových buněk. Transport miRNA clusteru specifického pro placentu indukuje v buňkách autofagii, která je hlavním obranným mechanismem před virovou infekcí (Delorme-Axford et al. 2013b). Stejně jako po transportu celého clusteru miRNA C19MC do cílových buněk byla autofágie indukována i v případě jednotlivých nejvíce zastoupených mi-RNA

obsažených v clusteru, a to konkrétně miR-517-3p, miR-516b-5p a miR-512-3p. Je možné, že s miRNA jsou pomocí exozomů do buněk transportovány i další látky, které podporují protivirovou obranu (Delorme-Axford et al. 2013a).

Kromě miRNA bylo v endometriálních exozomech v receptivní fázi děložní sliznice detekováno ve vysokých koncentracích také několik proteinů, jejichž funkce zřejmě souvisí s podporou interakcí embrya a endometria. Jedná se o Fibulin-1 (FBLN1), Heparan sulfát proteoglykan (HSPG2) nebo Cysteine-rich 61 protein (CYR61) (Greening et al. 2016). Fibulin-1 je secernovaný glykoprotein extracelulární matrix. Stejně jako ostatní fibuliny je důležitý pro remodelaci tkání, ovlivňuje adhezi buněk, proliferaci buněk a interakci membrán (Timpl et al. 2003). Remodelace extracelulární matrix je jedním z důležitých procesů pro receptivitu endometria. FBLN1, jehož hladina je ovlivněna estrogenem a progesteronem v rámci endometriální cykličnosti a je nejvyšší v receptivní fázi, podporuje interakci embrya a endometria (Nakamoto et al. 2005). HSPG2 je dalším proteinem extracelulární matrix. Stejně jako dříve zmiňovaný FBLN1 má pozitivní vliv na kontakt a adhezi buněk (Slater, Murphy 1999, Greening et al. 2016). Cysteine-rich 61 protein (CYR61) byl detekován v buňkách trofoblastu v průběhu vývoje placenty, kde podporuje vývoj cév a vývoj extracelulární matrix (Chen et al. 2007). CYR61 mRNA byla navíc specificky exprimována pouze v době receptivního endometria a byla specificky lokalizována v epitelu obklopujícím implantující se blastocystu (Chen et al. 2006). Exozomy v děložním prostředí se dále podílí na remodelaci extracelulární matrix prostřednictvím transportu některých metalloproteináz (Obrázek 5). Jedná se například o Matrix metalloproteinázu-14 (MMP-14), která je membránovým proteinem degradujícím kolageny, fibronectin, laminin a další složky extracelulární matrix (Latifi et al. 2018). MMP-14 je vysoce exprimována v buňkách cytotrofoblastu a podporuje tak invazi trofoblastu a úspěšnou implantaci embrya, navíc se podílí na aktivaci další metalloproteinázy MMP-2 v endometriu (Bjørn et al. 2000, Wang et al. 2014). Na implantaci embrya má vliv také ADAM10 (A Disintegrin and metalloproteinase 10), který je proteinem zapojeným do procesů buněčné proliferace a migrace (Latifi et al. 2018). ADAM10 zajišťuje štěpení a procesování prozánětlivého cytokinu TNF- α , který podporuje implantaci embrya (Lunn et al. 1997, Seals, Courtneidge 2003). Stejně tak je ADAM10 zapojen do aktivace Notch signalizace související s vaskularizací a pozdějším vývojem srdce plodu (Zhang et al. 2010).



Obrázek 5 – Příklad transportu molekul pomocí exozomů v mikroprostředí dělohy

Metalloproteinázy MMP-14 a ADAM10 modulují implantaci embrya pomocí štěpení extracelulární matrix a aktivace drah zapojených do remodelací tkáně. Převzato a upraveno: (Latifi et al. 2018)

Během implantace probíhá intenzivní mezibuněčná komunikace také v rámci buněk embrya. Blastocysta se skládá ze dvou buněčných typů, a to z vnitřní buněčné masy (ICM) a vnějšího trofoektodermu, který je zodpovědný za interakci embrya se sliznicí dělohy (Red-Horse et al. 2004). Jako mediátory intenzivní komunikace mezi těmito buňkami, zejména ve směru od ICM k trofoektodermu, slouží EVs definované jako mikrovezikuly. Pro trofoblast důležitými molekulami jsou proteiny extracelulární matrix fibronectin a laminin. Tyto proteiny jsou jednak přítomny na povrchu mikrovezikulů a slouží k vazbě receptorů na trofoblasty, ale také indukují integriny zprostředkovanou aktivaci kináz FAK (focal adhesion kinase) a JNK (c-Jun N-terminal kinase). Tyto proteinkinázy jsou potřebné k migraci trofoblastu (Almeida et al. 2000, Desrochers et al. 2016).

7. Endometrióza a Syndrom polycystických vaječnicků

Mezibuněčná komunikace prostřednictvím EVs probíhá i v rámci patologických stavů v organismu. Hojně studované jsou EVs v souvislosti s nádory. Také některá onemocnění reprodukčních orgánů člověka vykazují změny v povaze mikrovezikulární komunikace. V ženské reprodukční soustavě se jedná například o endometriózu nebo syndrom polycystických vaječnicků, jejichž molekulárně-biologická podstata nebyla prozatím do detailu objasněna. Obě onemocnění se vyznačují komplikovanou diagnostikou, na kterou ženy mnohdy čekají mnoho let. Ukazuje se, že by bylo potenciálně možné použít mikrovezikuly jako biomarkery v diagnostice těchto onemocnění, tato problematika však není doposud dostatečně prostudována (Simon et al. 2018).

7.1 Endometrióza

Endometrióza je chronické, na estrogeneru závislé onemocnění charakterizované přítomností děložní sliznice mimo děložní dutinu, nejčastěji v dutině břišní a na vaječnicích, ale často i jinde v těle. Při endometrióze buňky děložní sliznice neodcházejí s menstruací a způsobují v těle komplikace (Jones, Lopez 2013). Mezi hlavní symptomy patří bolesti v oblasti břicha a pánve a také záněty v oblasti endometria ovlivňující ovulaci a implantaci embrya, které často vedou až k neplodnosti (Maybin, Critchley, Jabbour 2011).

Při každém cyklu dochází v děloze k remodelacím tkáně, která zahrnuje mezibuněčnou komunikaci mezi epiteliálními a stromatálními endometriálními buňkami pomocí mikrovezikulů. Remodelace je dále regulována expresí metalloproteináz (MMP), která se dynamicky mění během cyklu i v těhotenství (Braundmeier et al. 2012). S endometriózou je spjatý transmembránový protein EMMPRIN (Extracellular matrix metalloproteinase inducer), který je rozpustný v extracelulární tekutině dělohy. Tam je uvolňován mikrovezikuly z epiteliálních buněk dělohy. EMMPRIN stimuluje stromatální buňky dělohy k produkci MMP, což dále vede ke zvýšené remodelaci tkání podporující patologické změny ve sliznici dělohy (Braundmeier et al. 2012). Pro proliferaci a udržení tkáně endometria mimo dělohu je důležitá také tvorba nového cévního zásobení (Shifren et al. 1996). Na angiogenezi se stejně jako v děloze podílí endometriální stromatální buňky, které ovlivňují prostřednictvím produkce exozomů endoteliální buňky k tvorbě nových cév pro krevní zásobení lézí endometria mimo dělohu (Harp et al. 2016).

7.2 Syndrom polycystických vaječníků

Syndrom polycystických vaječníků (PCOS – Polycystic Ovary Syndrome) je onemocnění spojené s endokrinní funkcí, které má velmi různorodé příznaky. Mezi ty patří hormonální nerovnováha a hyperandrogenismus, se kterými souvisí polycystická ovariální morfologie (PCOM – Polycystic Ovarian Morphology), anovulace a často obezita a inzulinová rezistence (Azziz et al. 2016). Přestože PCOS postihuje světově až 20 % žen v reprodukčním věku, na molekulární úrovni onemocnění stále ještě není plně pochopeno (Deswal et al. 2020, Rooda et al. 2020). Signalizace pomocí EVs, konkrétně mikrovezikulů, se v mnoha studiích objevuje v souvislosti s PCOS a jeho asociací s nadváhou či obezitou, se kterými často souvisí i inzulinová rezistence a diabetes mellitus druhého typu. Koncentrace cirkulujících mikrovezikulů bývá u pacientek s PCOS oproti zdravým ženám zvýšena (Sang et al. 2013, Koiou et al. 2013, Willis et al. 2014).

Ukazuje se, že významnou roli v determinaci tohoto onemocnění hrají změny v expresi buněčných miRNA, které vedou k modulaci estrogenové receptorové signalizace a nerovnováze v transkripci a apoptóze. Velmi různorodé výsledky studií ovšem naznačují, že velmi záleží na zdroji miRNA a způsobu determinace jejich funkce (Rooda et al. 2020). Možnými kandidáty jsou například miRNA-132 a miRNA-320, které byly izolovány z mikrovezikulů lidské folikulární tekutiny. Exprese obou miRNA je u pacientek s PCOS výrazně snížena v porovnání se zdravými ženami. Funkce těchto miRNA byla dříve potvrzena v regulaci metabolických drah souvisejících s metabolismem sacharidů a sekrecí inzulinu, což s PCOS úzce souvisí (Sang et al. 2013). MiRNA-132 je zapojena do změn metabolismu u preadipocytů a adipocytů vedoucích k chronickému zánětu (Strum et al. 2009). Snížené hladiny miRNA-132 byly pozorovány také u pacientek s těhotenskou cukrovkou a předpokládá se, že tato miRNA je zapojena do regulace inzulinové sekrece (Zhao et al. 2011). U miRNA-320 byla pozorována snížená hladina u pacientů s cukrovkou a tato miRNA je také zapojena inzulinové rezistence v adipocytech (Ling et al. 2009). Kromě toho snížené hladiny miRNA-132 a miRNA-320 mohou ovlivňovat expresi genů HMGA2 a RAB5B, které jsou asociovány s PCOS (Sang et al. 2013).

Závěr

EVs představují extracelulární váčky vylučované a přijímané buňkami jako způsob mezibuněčné komunikace. Tyto vezikuly se účastní transportu množství, pro danou tkáň specifických, proteinů, lipidů, RNA a miRNA, které pomocí své membrány chrání před degradací v extracelulárním prostoru.

EVs byly detekovány mimo jiné také v reprodukčních tkáních savců, mezi které patří hlodavci, skot, prasata, ovce, koně a člověk. U savců hrají nepostradatelnou roli v komunikaci buněk v rámci reprodukčních procesů a bez transportu molekul pomocí EVs dochází k nesprávné fyziologické funkci reprodukčních orgánů a buněk často vedoucí k neplodnosti. V samčích reprodukční soustavě jsou EVs součástí tekutiny v lumen nadvarlete, kam jsou secernovány buňkami epitelu nadvarlete. Tyto vezikuly nazývané epididymozomy zde interagují s dozrávajícími spermii, které obohacují o specifické proteiny potřebné k maturaci a motilitě spermií. Dalším typem vezikulů, v tomto případě spíše exozomální povahy, jsou prostatozomy, které jsou součástí sekretu prostaty. S těmito charakteristicky o cholesterol obohacenými vezikuly se spermie setkávají v samičím reprodukčním traktu po ejakulaci. Ve vejcovodu, kde u některých druhů savců dochází ke skladování spermií, obohacují prostatozomy membránu spermiie o molekuly potřebné k vazbě na jeho stěnu a pomáhají jim přežít ve specifickém prostředí samičího organismu. Ve vejcovodu zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci oviduktozomy, které mají původ v epitelálních buňkách vejcovodu. Tyto vezikuly, které jsou součástí ovidukální tekutiny, podporují jednak funkce spermií a jejich schopnost oplození, ale po oplození také vyvíjející se embryo. V samičím organismu se stejně jako v samčím uplatňují EVs v rámci maturace gamet. Vezikuly, které se nacházejí v buněčných vrstvách folikulu, zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami granulózy, théky a *cumulus oophorus* vzájemně a také s rostoucím oocytem, který obklopují. Mikrovezikuly a exozomy, souhrnně označované jako uterozomy, nacházející se v tekutině dělohy jsou v případě úspěšného oplození zapojeny do modifikací tkání děložní sliznice a vývoje trofoblastu potřebných k implantaci embrya a vývoji placenty. EVs se kromě fyziologických procesů účastní také některých patologických stavů zejména v ženské reprodukční soustavě.

EVs se v posledních letech dostávají do popředí četných výzkumů a studií a poznatky získané v následujících letech mohou být nejen dalším krokem k pochopení podstaty mnohých fyziologických procesů, ale také k řešení problémů spojených s poruchami funkce reprodukční soustavy.

Zdroje použité literatury

AALBERTS, Marian, et al. Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1834.11: 2326-2335.

ACEVEDO, Nicole; DING, Jun; SMITH, Gary D. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biology of reproduction*, 2007, 77.5: 872-879.

AITKEN, R. John; CLARKSON, Jane S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Reproduction*, 1987, 81.2: 459-469.

ALBERTS, Bruce, et al. Sperm. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*, 2002.

AL-DOSSARY, Amal A., et al. Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290.29: 17710-17723.

AL-DOSSARY, Amal A.; MARTIN-DELEON, Patricia A. Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2016, 21: 1278-1285.

AL-DOSSARY, Amal A.; STREHLER, Emanuel E.; MARTIN-DELEON, Patricia A. Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PloS one*, 2013, 8.11: e80181.

ALMEIDA, Eduardo AC, et al. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH₂-terminal kinase. *The Journal of cell biology*, 2000, 149.3: 741-754.

ALMINANA, Carmen, et al. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: Implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC genomics*, 2018, 19.1: 1-27.

ALMIÑANA, Carmen, et al. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction*, 2017, 154.3: 253-268.

ALMINANA-BRINES, Carmen. Snooping on a private conversation between the oviduct and gametes/embryos. *Animal Reproduction*, 2015, 12.3: 366-374.

ALTMÄE, Signe, et al. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive sciences*, 2013, 20.3: 308-317.

ANDERSSON, E., et al. Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Human reproduction*, 2002, 17.10: 2529-2534.

- ANDREWS, Rachel E.; GALILEO, Deni S.; MARTIN-DELEON, Patricia A. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4: interaction with constitutive nitric oxide synthases in human sperm and prostasomes which carry Ca²⁺/CaM-dependent serine kinase. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2015, 21.11: 832-843.
- ARIENTI, G., et al. Fatty acid pattern of human prostatic lipid. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1998, 358.2: 391-395.
- ARROYO, Jason D., et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.12: 5003-5008.
- ATAY, Safinur, et al. Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *American journal of reproductive immunology*, 2011, 65.1: 65-77.
- AZZIZ, Ricardo, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nature reviews Disease primers*, 2016, 2.1: 1-18.
- BARH, D., et al. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Current oncology*, 2010, 17.1: 70-80.
- BARTEL, David P. Metazoan micrnas. *Cell*, 2018, 173.1: 20-51.
- BATHALA, Pradeepthi, et al. Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are conserved in humans: Murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2018, 24.3: 143-157.
- BELLEANNÉE, Clémence, et al. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biology of reproduction*, 2013, 89.2: 30, 1-11.
- BELLEANNÉE, Clémence, et al. Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PloS one*, 2012, 7.4: e34996.
- BELLEANNÉE, Clémence. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian journal of andrology*, 2015, 17.5: 730.
- BETTERIDGE, K. J.; FLÉCHON, J.-E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 1988, 29.1: 155-187.
- BICKEL, Perry E., et al. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.21: 13793-13802.
- BJØRN, S. F., et al. Messenger RNA for membrane-type 2 matrix metalloproteinase, MT2-MMP, is expressed in human placenta of first trimester. *Placenta*, 2000, 21.2-3: 170-176.

- BRAUNDMEIER, A. G., et al. EMMPRIN is secreted by human uterine epithelial cells in microvesicles and stimulates metalloproteinase production by human uterine fibroblast cells. *Reproductive Sciences*, 2012, 19.12: 1292-1301.
- BUHI, W. C., et al. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biology of Reproduction*, 1990, 43.6: 929-938.
- BURDEN, H. P., et al. Prostatosomes—their effects on human male reproduction and fertility. *Human reproduction update*, 2006, 12.3: 283-292.
- BURNS, Gregory, et al. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PloS one*, 2014, 9.3: e90913.
- CAMUSSI, Giovanni, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international*, 2010, 78.9: 838-848.
- CARIDE, Ariel J., et al. The plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4a differs from isoform 4b in the mechanism of calmodulin binding and activation kinetics: implications for Ca²⁺ signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282.35: 25640-25648.
- CARLINI, Enrico, et al. Fusion of sperm with prostatosomes: effects on membrane fluidity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1997, 343.1: 6-12.
- CAROPPO, Ettore; DATTILO, Maurizio. Sperm redox biology challenges the role of antioxidants as a treatment for male factor infertility. *F&S Reviews*, 2021.
- CLAYTON, Aled, et al. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of cell science*, 2005, 118.16: 3631-3638.
- COCUCCI, Emanuele; RACCHETTI, Gabriella; MELDOLESI, Jacopo. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology*, 2009, 19.2: 43-51.
- COLOMBO, Marina, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*, 2013, 126.24: 5553-5565.
- CONTI, M.; CHANG, R. J. Folliculogenesis, ovulation, and luteogenesis. *Endocrinology: adult and pediatric*, 2016, 7: 2179-2191.
- CROSS, N. L.; MAHASRESHTI, P. Prostatome fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone. *Archives of andrology*, 1997, 39.1: 39-44.
- CROSS, Nicholas L. Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biology of reproduction*, 2004, 71.4: 1367-1373.

- DA SILVEIRA, Juliano C., et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of reproduction*, 2012, 86.3: 71, 1-10.
- DA SILVEIRA, Juliano C., et al. Regulation of ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12.1: 1-9.
- DACHEUX, J. L.; CHEVRIER, C.; LANSON, Y. Motility and Surface Transformations of Human Spermatozoa during Epididymal Transit a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987, 513.1: 560-563.
- D'AMOURS, Olivier, et al. Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. *Biology of reproduction*, 2012, 87.4: 94, 1-11.
- D'AMOURS, Olivier, et al. Evidences of biological functions of biliverdin reductase A in the bovine epididymis. *Journal of cellular physiology*, 2016, 231.5: 1077-1089.
- DELORME-AXFORD, Elizabeth, et al. Autophagy as a mechanism of antiviral defense at the maternal–fetal interface. *Autophagy*, 2013b, 9.12: 2173-2174.
- DELORME-AXFORD, Elizabeth, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013a, 110.29: 12048-12053.
- DESROCHERS, Laura M., et al. Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nature communications*, 2016, 7.1: 1-11.
- DESWAL, Ritu, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome: a brief systematic review. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 2020, 13.4: 261.
- DISSEN, Gregory A.; GARCIA-RUDAZ, Cecilia; OJEDA, Sergio R. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. In: *Seminars in reproductive medicine*. © Thieme Medical Publishers, 2009. p. 024-031.
- DONKER, Rogier B., et al. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular human reproduction*, 2012, 18.8: 417-424.
- EDWARDS, R. G. Follicular fluid. *Reproduction*, 1974, 37.1: 189-219.
- ELVIN, Julia A.; YAN, Changning; MATZUK, Martin M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Molecular and cellular endocrinology*, 2000, 159.1-2: 1-5.

FERESHTEH, Zeinab, et al. Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: Delivery of OVS-borne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. *Scientific reports*, 2018, 8.1: 1-18.

FEST, Stefan, et al. Trophoblast–macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *American journal of reproductive immunology*, 2007, 57.1: 55-66.

FLESCHE, Frits M., et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of cell science*, 2001, 114.19: 3543-3555.

FORNES, M. W.; BARBIERI, A.; CAVICCHIA, J. C. Morphological and enzymatic study of membrane-bound vesicles from the lumen of the rat epididymis. *Andrologia*, 1995, 27.1: 1-5.

FRENETTE, Gilles; SULLIVAN, Robert. Prostate-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2001, 59.1: 115-121.

FROLÍKOVA, Michaela, et al. Role of complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 in reproduction. *Folia Zoologica*, 2012, 61.1: 84-94.

FU, Bo; MA, Hong; LIU, Di. Extracellular vesicles function as bioactive molecular transmitters in the mammalian oviduct: An inspiration for optimizing in vitro culture systems and improving delivery of exogenous nucleic acids during preimplantation embryonic development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21.6: 2189.

GHERSEVICH, Sergio; MASSA, Estefania; ZUMOFFEN, Carlos. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction*, 2015, 149.1: R1-R14.

GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *International journal of andrology*, 2011, 34.5pt2: e475-e486.

GIROUARD, Julie; FRENETTE, Gilles; SULLIVAN, Robert. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 2009, 80.5: 965-972.

GREENING, David W., et al. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. *Biology of reproduction*, 2016, 94.2: 38, 1-15.

GRIFFITHS, Genevieve S., et al. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 2008, 75.11: 1627-1636.

HANNON, Gregory J. RNA interference. *nature*, 2002, 418.6894: 244-251.

HARP, Djana, et al. Exosomes derived from endometriotic stromal cells have enhanced angiogenic effects in vitro. *Cell and tissue research*, 2016, 365.1: 187-196.

HARRISON, R. A. P.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 1996, 45.3: 378-391.

HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G. A. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Molecular reproduction and development*, 2000, 55.2: 220-228.

HERRERO, Maria Belen; GAGNON, Claude. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology*, 2001, 22.3: 349-356.

HONG, C. Y.; CHIANG, B. N.; TURNER, P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *The Lancet*, 1984, 324.8417-8418: 1449-1451.

HUGEL, Bénédicte, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*, 2005, 20.1: 22-27.

HUO, Li-Jun, et al. Ubiquitin–proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation. *Mechanisms of development*, 2004, 121.10: 1275-1287.

CHEN, Shu-jian, et al. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2013, 288.1: 191-199.

CHEN, Ying, et al. Global analysis of differential luminal epithelial gene expression at mouse implantation sites. *Journal of molecular endocrinology*, 2006, 37.1: 147-161.

CHEN, Ying; DU, Xiao-Yan. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *Journal of cellular biochemistry*, 2007, 100.6: 1337-1345.

IGNOTZ, George G.; CHO, Margaret Y.; SUAREZ, Susan S. Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of reproduction*, 2007, 77.6: 906-913.

IRAZUSTA, Jon, et al. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *Journal of andrology*, 2004, 25.5: 733-739.

JAVADI, Maryam, et al. The effects of plasma-derived extracellular vesicles on cumulus expansion and oocyte maturation in mice. *Reproductive biology*, 2022, 22.1: 100593.

JONES, Richard E. a Kristin H. LOPEZ. *HUMAN REPRODUCTIVE BIOLOGY*. Fourth Edition. 2013. ISBN 978-0-12-382184-3.

- KADAM, K. M., et al. Identification and characterization of oviductal glycoprotein-binding protein partner on gametes: epitopic similarity to non-muscle myosin IIA, MYH 9. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2006, 12.4: 275-282.
- KELLY, R. W., et al. Extracellular organelles (prostasomes) are immunosuppressive components of human semen. *Clinical & Experimental Immunology*, 1991, 86.3: 550-556.
- KING, Robin S.; ANDERSON, Sharon H.; KILLIAN, Gary J. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *Journal of Andrology*, 1994, 15.5: 468-478.
- KLOCK, Gerd; BAIERSDÖRFER, Markus; KOCH-BRANDT, Claudia. Cell protective functions of secretory Clusterin (sCLU). *Advances in cancer research*, 2009, 104: 115-138.
- KOIOU, Ekaterini, et al. Platelet-derived microparticles in overweight/obese women with the polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 2013, 29.3: 250-253.
- KOUBA, Andrew J., et al. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biology of reproduction*, 2000, 63.1: 242-250.
- KOWAL, Joanna; TKACH, Mercedes; THÉRY, Clotilde. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*, 2014, 29: 116-125.
- LATIFI, Zeinab, et al. Potential roles of metalloproteinases of endometrium-derived exosomes in embryo-maternal crosstalk during implantation. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233.6: 4530-4545.
- LAX, Y., et al. Role of lipoxygenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1990, 1043.1: 12-18.
- LEE, Yoontae, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 2004, 23.20: 4051-4060.
- LEE, Yoontae, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425.6956: 415-419.
- LÉGARÉ, Christine, et al. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 1999, 52.2: 225-233.
- LI, Rong, et al. MicroRNA array and microarray evaluation of endometrial receptivity in patients with high serum progesterone levels on the day of hCG administration. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2011, 9.1: 1-9.

- LIN, Ying, et al. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *The Journal of cell biology*, 1994, 125.5: 1157-1163.
- LING, Hong-Yan, et al. CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2009, 36.9: e32-e39.
- LIU, Wei-Min, et al. Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PloS one*, 2012, 7.5: e37039.
- LOPERA-VASQUEZ, Ricaurte, et al. Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PloS one*, 2016, 11.2: e0148083.
- LUNN, Charles A., et al. Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF α convertase. *FEBS letters*, 1997, 400.3: 333-335.
- LV, Chao, et al. MiR-21 in extracellular vesicles contributes to the growth of fertilized eggs and embryo development in mice. *Bioscience Reports*, 2018, 38.4.
- MARTIN-DELEON, Patricia A. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Molecular and cellular endocrinology*, 2006, 250.1-2: 114-121.
- MAYBIN, Jacqueline A.; CRITCHLEY, Hilary OD; JABBOUR, Henry N. Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Molecular and cellular endocrinology*, 2011, 335.1: 42-51.
- MEIZEL, Stanley; TURNER, Kenneth O. The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *Journal of Experimental Zoology*, 1984, 231.2: 283-288.
- MEMILI, Erdogan; DOMINKO, Tanja; FIRST, Neal L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 1998, 51.1: 36-41.
- MINELLI, Alba, et al. Ecto-diadenosine polyphosphates hydrolase activity on human prostasomes. *The Prostate*, 2002, 51.1: 1-9.
- MOEIN-VAZIRI, Najmeh, et al. Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction*, 2014, 147.5: 719-32.
- MORENO-MOYA, Juan Manuel, et al. The transcriptomic and proteomic effects of ectopic overexpression of miR-30d in human endometrial epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*, 2014, 20.6: 550-566.
- MURALIDHARAN-CHARI, Vandhana, et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of cell science*, 2010, 123.10: 1603-1611.

MYLES, Diana G.; PRIMAKOFF, Paul. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of reproduction*, 1997, 56.2: 320-327.

NAKAMOTO, T., et al. Progesterone induces the fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. *Human Reproduction*, 2005, 20.6: 1447-1455.

NAVAKANITWORAKUL, Raphatphorn, et al. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Scientific reports*, 2016, 6.1: 1-14.

NG, York Hunt, et al. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PloS one*, 2013, 8.3: e58502.

NIXON, Brett, et al. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2019, 18: S91-S108.

OLIW, E. H., et al. Arachidonic acid 15-lipoxygenase and traces of E prostaglandins in purified human prostasomes. *Reproduction*, 1993, 99.1: 195-199.

OUYANG, Yingshi, et al. Placenta-specific microRNAs in exosomes—good things come in nano-packages. *Placenta*, 2014, 35: S69-S73.

PAP, E., et al. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation Research*, 2009, 58.1: 1-8.

PARK, Kwang-Hyun, et al. Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Science signaling*, 2011, 4.173: ra31-ra31.

PASQUINELLI, Amy E., et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, 408.6808: 86-89.

PATEL, Ramkrishna, et al. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4 in murine epididymis: secretion of splice variants in the luminal fluid and a role in sperm maturation. *Biology of reproduction*, 2013, 89.1: 6, 1-11.

POLLARD, John W., et al. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of reproduction*, 1991, 44.1: 102-107.

PONS-REJRAJI, Hanae, et al. Prostasomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *International journal of andrology*, 2011, 34.6pt1: 568-580.

RAPOSO, Graça; STOOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200.4: 373-383.

RATAJCZAK, Janina, et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 2006, 20.9: 1487-1495.

- RED-HORSE, Kristy, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of clinical investigation*, 2004, 114.6: 744-754.
- REILLY, Jackson N., et al. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Scientific reports*, 2016, 6.1: 1-15.
- REJRAJI, Hanae, et al. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of reproduction*, 2006, 74.6: 1104-1113.
- REKKER, Kadri, et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. *Clinical biochemistry*, 2014, 47.1-2: 135-138.
- RICE, Gregory E., et al. The effect of glucose on the release and bioactivity of exosomes from first trimester trophoblast cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 100.10: E1280-E1288.
- ROBAIRE, Bernard; HINTON, Barry T.; ORGEBIN-CRIST, Marie-Claire. The epididymis. In: *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press, 2006. p. 1071-1148.
- RONQUIST, Gunnar; BRODY, Isser. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1985, 822.2: 203-218.
- ROODA, Ilmatar, et al. Cellular, extracellular and extracellular vesicular miRNA profiles of pre-ovulatory follicles indicate signaling disturbances in polycystic ovaries. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21.24: 9550.
- SAEZ, Fabrice; FRENETTE, Gilles; SULLIVAN, Robert. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *Journal of Andrology*, 2003, 24.2: 149-154.
- SAEZ, Fabrice; SULLIVAN, Robert. Prostasomes, post-testicular sperm maturation and fertility. *Front. Biosci*, 2016, 21: 1464-1473.
- SALAMONSEN, Lois A., et al. The microenvironment of human implantation: determinant of reproductive success. *American journal of reproductive immunology*, 2016, 75.3: 218-225.
- SALOMON, C.; RICE, G. E. Role of exosomes in placental homeostasis and pregnancy disorders. *Progress in molecular biology and translational science*, 2017, 145: 163-179.
- SALOMON, Carlos, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PloS one*, 2013, 8.7: e68451.

- SANG, Qing, et al. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98.7: 3068-3079.
- SATOH, T., et al. Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1995, 1266.2: 117-123.
- SEALS, Darren F.; COURTNEIDGE, Sara A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & development*, 2003, 17.1: 7-30.
- SHIFREN, Jan L., et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1996, 81.8: 3112-3118.
- SCHUH, Kai, et al. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279.27: 28220-28226.
- SCHWARZ, A., et al. Vesicular transfer of membrane components to bovine epididymal spermatozoa. *Cell and tissue research*, 2013, 353.3: 549-561.
- SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2020, 21.7: 363-383.
- SIMON, Carlos, et al. Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocrine reviews*, 2018, 39.3: 292-332.
- SLATER, Michael; MURPHY, Christopher R. Chondroitin sulphate and heparan sulfate proteoglycan are sequentially expressed in the uterine extracellular matrix during early pregnancy in the rat. *Matrix biology*, 1999, 18.2: 125-131.
- SOHEL, Md Mahmudul Hasan, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PloS one*, 2013, 8.11: e78505.
- STOREY, Bayard T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 1997, 3.3: 203-213.
- STRUM, Jay C., et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Molecular endocrinology*, 2009, 23.11: 1876-1884.
- SUTTON, R., et al. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *Reproduction*, 1984, 72.2: 415-422.

TANG, Fuchou, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes & development*, 2007, 21.6: 644-648.

TAYLOR, Abby, et al. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation. *Human Reproduction*, 2013, 28.9: 2332-2342.

THÉRY, Clotilde, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology*, 2001, 166.12: 7309-7318.

THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2002, 2.8: 569-579.

THIMON, Véronique, et al. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Human reproduction*, 2008, 23.8: 1698-1707.

TIMPL, Rupert, et al. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2003, 4.6: 479-489.

TWENTER, Hannah, et al. Transfer of MicroRNAs from epididymal epithelium to equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 87: 102841.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*, 2004, 216.1-2: 31-39.

VILELLA, Felipe, et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*, 2015, 142.18: 3210-3221.

VLASSOV, Alexander V., et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2012, 1820.7: 940-948.

WANG, Huayang, et al. Leptin-promoted human extravillous trophoblast invasion is MMP14 dependent and requires the cross talk between Notch1 and PI3K/Akt signaling. *Biology of reproduction*, 2014, 90.4: 78, 1-10.

WENNEMUTH, Gunther; BABCOCK, Donner F.; HILLE, Bertil. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *The Journal of general physiology*, 2003, 122.1: 115-128.

WILCOX, Allen J.; BAIRD, Donna Day; WEINBERG, Clarice R. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 1999, 340.23: 1796-1799.

WILLIS, G. R., et al. Young women with polycystic ovary syndrome have raised levels of circulating annexin V-positive platelet microparticles. *Human Reproduction*, 2014, 29.12:

2756-2763.

WILSON, Ross C., et al. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular cell*, 2015, 57.3: 397-407.

YANAGIMACHI, R., et al. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *American Journal of Anatomy*, 1985, 172.4: 317-330.

YÁÑEZ-MÓ, María, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*, 2015, 4.1: 27066.

ZHANG, Chao, et al. The anti-apoptotic role of berberine in preimplantation embryo in vitro development through regulation of miRNA-21. *PLoS One*, 2015, 10.6: e0129527.

ZHANG, Chi, et al. Adam10 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Developmental Dynamics*, 2010, 239.10: 2594-2602.

ZHANG, Meijia; OUYANG, Hong; XIA, Guoliang. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular human reproduction*, 2009, 15.7: 399-409.

ZHAO, Chun, et al. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PloS one*, 2011, 6.8: e23925.

Zdroje obrázků

RAPOSO, Graça; STORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013, 200.4: 373-383.

SULLIVAN, Robert; FRENETTE, Gilles; GIROUARD, Julie. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*, 2007, 9.4: 483-491.

ANDRADE, Gabriella Mamede, et al. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 2019, 16: 485-496.

ANDRONICO, Francesca, et al. Extracellular vesicles in human oogenesis and implantation. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.9: 2162.

LATIFI, Zeinab, et al. Potential roles of metalloproteinases of endometrium-derived exosomes in embryo-maternal crosstalk during implantation. *Journal of cellular physiology*, 2018, 233.6: 4530-4545.