

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv kultivačního systému na kvalitu buněk prasečích  
kumulo-oocytárních komplexů.  
Diplomová práce**

**Bc. Kristýna Tuťálková**

**Reprodukční biotechnologie**

**prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv kultivačního systému na kvalitu buněk prasečích kumulo-oocytárních komplexů." jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D., konzultantce doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph. D. a také pracovníkům Katedry veterinárních disciplín za odbornou pomoc, připomínky a vstřícnost, kterou vložili do této práce.

Nadále bych chtěla poděkovat své rodině a přáteli, kteří za mnou po celou dobu při psaní této práce stáli.

# Vliv kultivačního systému na kvalitu buněk prasečích kumulo-oocytárních komplexů.

## Souhrn

I když bylo již vynaloženo mnoho úsilí s cílem najít optimální systém pro zlepšení kvality oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách, stále jejich kvalita zaostává za oocyty dozralými *in vivo*. 2D kultivační systémy mají mnoho omezení, mezi které patří změna morfologie buněk, exprese genů, polarita a narušené interakce s okolním prostředím. Tyto nevýhody vedly k vytvoření systémů, které více napodobí prostředí *in vivo*. Jedním z těchto systémů je 3D kultivační systém využívající hydrogel GrowDex.

Hypotézou této práce bylo, že 3D kultivační systém zlepší kvalitu buněk z prasečích kumulo-oocytárních komplexů během meiotického zrání v *in vitro* podmínkách. Získané prasečí kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány do fáze MII po dobu 48 h. Pro srovnání konvenčního 2D systému a 3D systému s GrowDex bylo zvoleno sledování exprese proapoptického faktoru BAX a anti-apoptického faktoru Bcl-2, které jsou zapojeny do regulace apoptózy. Kumulární buňky zralých kumulo-oocytárních komplexů byly kultivované ve 2D a 3D kultivačním systému po dobu 0, 2, 4, 7 a 16 dní. Po skončení kultivace byla sledována exprese BAX a Bcl-2 imunocytochemickou metodou s využitím konfokálního mikroskopu a počítačové analýzy obrazu.

Kumulární buňky prasečích kumulo-oocytárních komplexů exprimovaly oba sledované faktory. Jejich exprese se ve 2D a 3D kultivačním systému signifikantně nelišila s výjimkou anti-apoptického faktoru Bcl-2, jehož exprese byla po 16 dnech kultivace ve 3D systému signifikantně nižší než v konvenčním 2D systému. Nepodařilo se prokázat hypotézu, že kultivace ve 3D kultivačním systému zlepšuje kvalitu prasečích kumulo-oocytárních komplexů a že tento kultivační systém může být vhodnější pro kultivaci kumulo-oocytárních komplexů v *in vitro* podmínkách.

**Klíčová slova:** kumulo-oocytární komplex, kultivace *in vitro*, 3D kultivační systém

# Effect of culture system on the quality of cells from porcine cumulo-oocyte complexes.

## Summary

Although much effort has been made to find the optimal system for improving the quality of oocytes cultivated *in vitro*, their quality still lags behind that of mature oocytes *in vivo*. 2D culture systems have many limitations, including changes in a cell morphology, a gene expression, a polarity and disturbed interactions with the environment. These disadvantages have led to the creation of systems that more imitate the *in vivo* environment. One of these systems is a 3D cultivation system using the GrowDex hydrogel.

The hypothesis of this theses was that the 3D cultivation system will improve the quality of cells from porcine cumulo-oocyte complexes during meiotic maturation *in vitro*. The obtained porcine cumulo-oocyte complexes were cultivated to phase MII for 48 h. For comparison the conventional 2D system and the 3D system with GrowDex were chosen monitoring of the expression of pro-apoptotic factor BAX and anti-apoptotic factor Bcl-2, which are involved in the regulation of apoptosis. Cumulative cells of mature cumulus-oocyte complexes were cultivated in 2D and 3D cultivation systems for 0, 2, 4, 7 and 16 days. At the end of the cultivation, the expression of BAX and Bcl-2 was monitored by immunocytochemistry method with using a confocal microscope and computer image analysis.

Cumulus cells of porcine cumulo-oocyte complexes expressed both factors of interest. Their expression did not differ significantly in the 2D and 3D culture system, with the exception of the anti-apoptotic factor Bcl-2, whose expression was significantly lower after 16 days of cultivation in the 3D system than in the conventional 2D system. It has not been possible to demonstrate that cultivation in a 3D cultivated system improves the quality of porcine cumulo-oocyte complexes and that this cultivated system may be more suitable for cultivating cumulus-oocyte complexes *in vitro*.

**Keywords:** cumulo-oocyte complex, *in vitro* cultivation, 3D cultivated system

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Oogeneze .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Kumulo-oocytární komplexy .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3</b>	<b>Kultivace kumulo-oocytárních komplexů v <i>in vitro</i> podmínkách.....</b>	<b>12</b>
3.3.1	Kultivační média.....	12
3.3.2	Kultivace prasečích oocytů .....	17
3.3.3	Kultivační systémy .....	20
<b>3.4</b>	<b>Apoptóza .....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Získávání kumulo-oocytárních komplexů (COC) .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Kultivace COC .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Kultivace kumulárních buněk .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Imunocytochemické stanovení exprese BAX a Bcl-2.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistické vyhodnocení .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Reprodukční biotechnologie využívané v reprodukci hospodářských zvířat zahrnují řadu metodik jako jsou kryokonzervace, embryotransfer, *in vitro* produkce embryí, *in vitro* fertilizace.

Využívání reprodukčních technik v chovech zvířat ale předpokládá, že budou dostatečně efektivní, a ačkoliv se techniky jako *in vitro* fertilizace, embryotransfer nebo mražení embryí běžně používají v chovu skotu, u prasat nemají zatím tak vysokou úspěšnost. Přitom prase je druh nejen hospodářsky významný, ale cenné je i jeho využití jako modelového zvíře, poskytující informace srovnatelné s člověkem.

Jedním z limitů pro širší využití reprodukčních biotechnologií u prasat jsou omezené znalosti o biologických procesech probíhajících v oocytech během jejich meiotického zrání. Proto je důležitým předpokladem dalšího pokroku důkladné poznání, pochopení a přesné definování biologických a biochemických procesů spojených se zráním oocytů a také hledání nových technik pro zrání v *in vitro* podmínkách.

V dnešní době se nové techniky kultivací buněk v *in vitro* podmínkách neustále vyvíjejí a mění tak, aby co nejlépe napodobily podmínky *in vivo*. Proto se zavádějí a zkoušejí 3D kultivační systémy, které lépe imitují podmínky ve folikulu a oocytům s cílem zlepšit vývojovou kompetenci *in vitro* kultivovaných oocytů. U prasat je využití 3D kultivačního systému zatím na počátku. Proto se tato diplomová práce zaměřuje na možnost využití 3D kultivačního systému při kultivaci prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou práce bylo, že 3D kultivační systém zlepší kvalitu buněk z prasečích kumulo-oocytárních komplexů během kultivace v *in vitro* podmínkách.

Cílem této práce bylo charakterizovat rozdíly mezi konvenčním 2D kultivačním systémem a 3D systémem využívajícím hydrogel GrowDex prostřednictvím exprese pro-apoptického faktoru BAX a anti-apoptického faktoru BCL-2 u kumulárních buněk z kumulo-oocytárních komplexů prasete.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Oogeneze

Oogeneze je diferenciacie vajíčka na buňku schopnou ďalšieho vývoje pri oplodnení. Oogeneze je zahájena v embryonálnom štádiu (Alberts 1998c).

Proces oogeneze probíhá v buňkách zárodečného epitelu vaječníků, které se označují jako primordiální zárodečné buňky (PGCs – Primordial Germ Cells). U zvířat PGCs nevznikají uvnitř gonád, ale migrují napříč embryem, aby dosáhly vyvíjejících se prekurzorů gonád, které vytvářejí vaječníky. PGC opouští zadní část gastrointestinálního epitelu a vstupují do mezenchymu hřbetního mezenteria a dále putují k hřebenům genitálií, které vyplňují (Fujimoto et al. 1977; Fujimoto et al. 1989).

Oogeneze začíná již v průběhu časného embryonálního vývoje seskupením PGCs ve žlutkovém váčku entodermu v zadní části střeva embrya (Chiquoine 1954; Mintz & Russell 1957) a je rozdělována do tří fází (Wassarman 1988; Picton et al. 1998):

- Fáze množení
- Fáze růstová
- Fáze zrání

#### **Fáze množení**

Buňky zárodečného epitelu se opakovaně dělí a vzniklé oogonie asymetrickým dělením dávají vznik diploidním primárním oocytům (Khanna 2010). Oocyty jsou obklopeny vrstvou folikulárních buněk, které spolu s oocytami vytváří primordiální folikuly.

#### **Fáze růstu**

Tato fáze je velmi dlouhá a komplikovaná, protože v cytoplazmě oocytu je třeba nashromáždit všechny látky potřebné pro vývoj embrya. Nejprve se primární oocyt enormně zvětšuje díky lipidovým inkluzím. Cytoplazma je bohatá na RNA, DNA, ATP a enzymy, protože dochází k replikaci cytoplazmatických organel během oogeneze, zejména mitochondrií a jejich molekul DNA (Schatten 1994). Ve folikulu je každý oocyt obklopen vícevrstvou kohortou folikulárních buněk (Khanna 2010).

Během jejich růstové fáze prodělávají oocyty komplexní změny, které spočívají v produkci nových genových proteinů, organel, modifikaci a redistribuci stávajících (Schatten 1994). Zralé savčí oocyty navíc obsahují různé množství „žloutku“ ve formě glykogenových granulí, malých lipidových kapiček a proteinů (Gosden & Bownes 1995). Tyto struktury poskytují energii a substráty pro syntézu nových membrán po oplození vajíčka.

Během růstu oocyty se orgány přesouvají k periférii buňky, kromě mitochondrií, které se přesouvají do centrální oblasti. Například Golgiho aparát se rozšiřuje a transformuje z několika zploštělých vaků na velké cisterny v korové oblasti oocytů, kde je aktivní při exportu glykoproteinů do ZP (Mehlmann et al. 1995) a při tvorbě kortikálních granulí. Jak roste oocyt, zvětšuje se v jaderné membráně počet jaderných pórů a chromatin se formuje do typického tvaru. Na konci růstového období a před meiotickým zráním je jádro oocytů ve stádiu zárodečného váčku (germinal vesicle, GV; Picton et al. 1998).

Během růstové fáze se průměr oocytů zvětšuje a oocyt postupně získává meiotickou kompetenci, tedy schopnost dokončit meiotické zráním a podstoupit oplození a následný embryonální vývoj (Sorensen & Wassarman 1976; Moor & Trounson 1977; Motlik & Fulka 1986; Schramm et al. 1993; Fair et al. 1995; Otoi et al. 1997; Hewitt & England 1998; Lucas et al. 2002) 7;).

### **Fáze zráním**

V této fázi vývoje dochází ke znovuzahájení meiózy. Fáze zráním zahrnuje jak jaderné zráním, tedy schopnost po znovuzahájení meiózy pokračovat až do stádia metafáze II tak cytoplazmatické zráním, tedy proces zahrnující nahromadění a případnou aktivaci faktorů nutných pro dokončení meiózy a následný embryonální vývoj po oplození (Khanna 2010; Schatten & Su 2015; Bennabi et al. 2016). Mezi tyto faktory patří např. MPF a MAP kinázy (mitogenem aktivovaná protein kináza; Kanayama et al. 2002).

### Jaderné zráním

Při kultivaci prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách trvá jaderné zráním 44–48 hodin (Motlik et al. 1984). Během jaderného zráním dochází k segregaci chromozomů a vydělení pólového tělíska a vyžaduje funkční jaderný mitotický aparát a řadu regulačních proteinů (Schatten & Su 2015; Bennabi et al. 2016).

Proces jaderného zráním začíná v prenatálním období, kdy se zastavuje ve fázi profázi prvního meoického dělení. Meióza pokračuje fází diplotene, při které dochází ke kondenzaci chromozomů a rozpadu zárodečného váčku (GVBD). Po GVBD prochází oocyt metafází I, anafází I a telofází I, ukončí prvním meiotickým dělením a poté rychle přejde do MII druhého meiotického dělení, kde dochází k meiotickému zastavení meiózy (II. meiotický blok) v metafázi II (Kubelka et al. 2000).

Na konci prvního meiotického dělení se polovina chromozomů oocyty vydělí v podobě prvního pólového tělíska. Cytoplazma se rozdělí asymetricky, většina jí zůstává v oocyty (Quetglas et al. 2010).

Jednotlivá stádia jaderného zrání jsou charakteristická konfigurací chromozómů (Landim-Alvarenga 1999):

- Stádium zárodečného váčku (GV) je charakterizovaný přítomností sférického jádra s neporušenou jadernou membránou a vláknitým chromatinem.
- Stádium rozpadu zárodečného váčku (GVBD) je charakterizované kondenzovaným chromatinem a nepřítomností viditelné jaderné membrány.
- Stádium metafáze I: chromozomy jsou uspořádané do metafázové destičky periferně umístěné v ooplazmě.
- Stádium metafáze II je charakteristické přítomností metafázové destičky s chromozomy uspořádanými na periférii ooplazmy a vydělením prvního pólového tělíska.

#### Cytoplazmatické zrání

Cytoplazmatické zrání oocyty je doprovázeno strukturálními a molekulárními změnami oocyty (Landim-Alvarenga & Maziero 2014), které jsou klíčové pro správný průběh oplození a časný embryonální vývoj. Během cytoplazmatického zrání dochází k redistribuci organel, reorganizaci cytoskeletu a transkripci proteinů (Bukowska et al. 2013; Landim-Alvarenga & Maziero 2014). Ultrastrukturální změny v cytoplazmě zahrnují migraci mitochondrií a Golgiho komplexu z periferie nezralého oocyty do perinukleárního prostoru. Kortikální granula, pocházející z Golgiho komplexu se ze středu oocyty přesouvají do periferie, kde zakotví pod membránou oocyty (Obr. 1.) (Cran & Moor 1990).

Součástí cytoplazmatického zrání je tvorba proteinů, lipidů a transkripčních faktorů nutných pro oplození a časnou embryogenezi (Krisher 2004; Swain & Pool 2008; Ferreira et al. 2009; Sanchez & Smitz 2012; Mao et al. 2014; Leader et al. 2017).

Swain & Pool (2008) popsali několik molekulárních a buněčných událostí oocyty, které musí nastat během úspěšného cytoplazmatického zrání jako je expanze kumulárních buněk, funkční signalizace vápníkovými kationty a formování kortikálních granul.

Oocyty izolované z malých antrálních folikulů mají velmi omezenou schopnost znovuzahájit meiózu. Po 24 hodinách kultivace zůstává více než 80 % z nich v GV fázi (Motlík et al. 1984). Prodloužení kultivačního intervalu až 48 hodin zvyšuje podíl oocyty

podstupujících GVBD a postupuje do druhé fázi mitózy nebo se formují shluky kondenzovaného chromatinu. V porovnání, v 66 % oocytů z folikulů o 0,8 - 1,6 mm GVBD a v 17,3% zrání postupuje do MII (Motlík & Fulka 1986).

Prasečí oocyty získávají částečnou meiotickou kompetenci ve velikosti 100–115  $\mu\text{m}$ . Takto dorostlé oocyty dozrají pouze do stádia MI (Luciano & Sirard 2018): Plně kompetentní oocyty jsou oocyty o velikosti  $\geq 120 \mu\text{m}$  (Hunter 2000). Prasečí meioticky kompetentní oocyty jsou získávány z folikulů o velikosti 3-8 mm (Motlík & Fulka 1986; Bolamba & Sirard 2000; Yoon et al. 2000; Sun et al. 2001; Liu et al. 2002; Lucas et al. 2002; Marchal et al. 2002).

### 3.2 Kumulo-oocytární komplexy

Oocyt obsahuje cytoplazmu, jádro a jadérko, kortikální granula (Erickson 1983), mitochondrie (Mtango 2008), ribozomy, Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum a cytoskelet. Oocyt je obklopený vrstvou *zona pellucida*. Kumulární buňky vytvářejí okolo oocytu vrstvu *corona radiata*, která je první bariérou proti průniku spermií do oocytu (Khanna 2013).

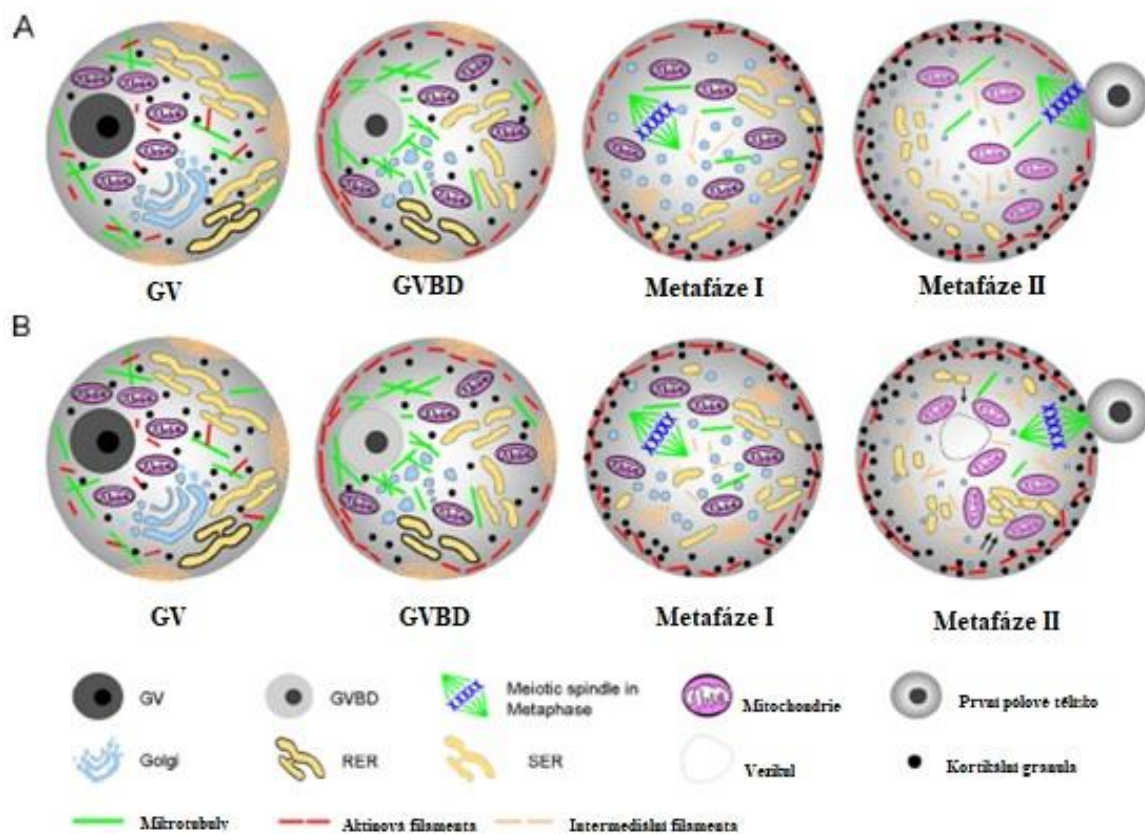
#### Jádro a jadérko

Jádro v savčích oocytech a zygotách je kompaktní a morfologicky se liší od jader v somatických buňkách (Kyogoku et al. 2014). Jadérko je malé bezbarvé, silně světlolomné, obvykle kulovité tělísko nacházející se uvnitř jádra. V jádře je zpravidla jedno jadérko. Je velmi bohaté na r-RNA (obsahuje až 20 % veškeré buněčné RNA), v jadérku se RNA také syntetizuje a formují se zde ribozomy (Benda a kol. 2005).

#### Mitochondrie

Cytoplazmatické zrání zahrnuje řadu složitých událostí, včetně syntézy proteinů a transkripce cytoplazmy RNA, která spotřebovává energii. Primární funkcí mitochondrií je syntéza ATP. Proto hrají mitochondrie mimořádně důležitou roli při dodávce energie, která je spotřebována během procesu zrání (Krisher & Bavister 1998; Stojkovic et al. 2001).

Pohyb mitochondrií do oblastí s vysokou energetickou spotřebou je rozhodující pro zrání oocytů. V nezralém myším oocytu jsou mitochondrie agregovány kolem zárodečného váčku a poté se vzdalují od perinukleární oblasti, při rozpadu zárodečného váčku zabírají většinu objemu oocytu (Dumollard et al. 2006).

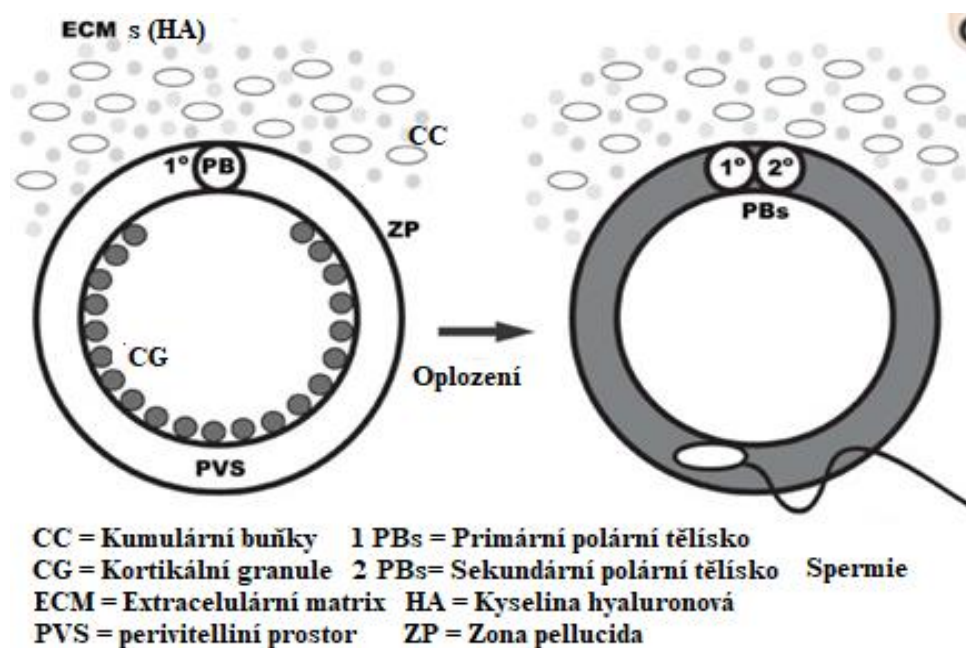


Obr. 1: Přehled distribuce cytoplazmatických organel a cytoskeletu během zrání oocytů u myši (A) a člověk (B). (A) V GV oocytech jsou mitochondrie agregovány kolem GV, Golgiho aparát je o něco koncentrovanější uvnitř než v kůře a střední vlákna jsou omezena na velké kortikální agregáty, zatímco ER, kortikální granule, mikrotubuly a mikrofilamenta jsou rovnoměrně rozloženy po celé cytoplazmě. Po GVBD se mitochondrie vzdalují v perinukleární oblasti je Golgiho aparát fragmentován a agregován v centrální části oocytu, ER lokalizuje v kortikální oblasti a mikrotubuly jsou kondenzovány kolem chromozomů, zatímco mikrofilamenta jsou hustě akumulována v subkortikální oblast oocytů. V metafázi I je Golgiho aparát dále fragmentován a dispergován po oocytu, ER se koncentruje ve vegetativní polovině zralého vajíčka a kortikální granule migrují směrem ke kortikální cytoplazmě a zastavují v kůře, zatímco velké agregáty intermediálních vláken se rozptýlí do několika malých skvrn; navíc jsou to mikrotubuly pozorovány jako plně organizovaná meiotická vřetena. V metafázi II bylo vytlačeno první pólové tělíčko, dole se vytvořila vřeténka první pólového tělíška a mezivláčna jsou rovnoměrně rozložena po celé cytoplazmě. (B) V oocytech metafáze-II je vřeteno se často orientuje kolmo na povrch oocytů mitochondriální agregáty SER (šipka) a mitochondriální váček jsou vidět komplex (dvojitá šipka), shluky ER jsou přítomny v celém oocytu a kortikální granule, které jsou obvykle chybí v myši, jsou přítomny v oblasti vřetena. GV = zárodečný váček; GVBD = rozpad zárodečných váčků; RER = drsné endoplazmatické retikulum; SER = hladké endoplazmatické retikulum (Luna Mao et al. 2014)

### Kortikální granula

Savčí kortikální granula vznikají z Golgiho komplexů během růstu oocytů (Austin 1956; Gulyas 1980). Během časného růstu folikulů Golgiho komplexy hypertrofují, proliferují a tvorbu kortikální granul během této fáze (Abbott & Ducibella, 2001; Gulyas 1980; Szollosi 1967). Nejprve se vytvářejí malé vezikuly z hypertrofovaných Golgiho komplexů, které migrují směrem k subkortikální oblasti oocytů (Obr. 2). Tyto vezikuly se potom spojí a vytvoří se zralá kortikální granula, které se nakonec oddělí od Golgiho komplexů (Gulyas 1980).

Savčí kortikální granula mají v průměru velikost od 0,2  $\mu\text{m}$  do 0,6  $\mu\text{m}$  a liší se od většiny ostatních regulačních sekrečních organel v tom, že se po uvolnění neobnovují (Gulyas 1980). Charakteristickým rysem dozrálých oocytů jsou přítomnost kortikálních granul. Tyto granula jsou vázána pod membránou uspořádané podél povrchu a hrají významnou roli v průběhu oplození. Jsou syntetizována pouze v samičích zárodečných buňkách a transformují oocyt po vstupu spermie (Liu 2011).



Obr. 2: Exocytóza savčích kortikálních granul během oplození. Kortikální granula jsou sekreční vezikuly umístěné v kůře neoplozených oocytů (znázorněné v šedých kruzích). Po fúzi gamet podstoupí kortikální granule exocytózu a uvolní jejich obsah, aby se vytvořil blok polyspermie. Pro přehlednost nejsou buněčné struktury znázorněny v měřítku (upraveno podle Liu, 2011).

### Golgiho komplex

Golgiho komplex se hojně vyskytuje ve zralých oocytech, během GV stádia je lokalizován periferně. Po GVBD se jaderný obal rozpadá, chromozomy kondenzují a Golgiho aparát podléhá fragmentaci (Obr. 1) a je rozptýlen po celém oocytu v MI fázi. ato distribuce je udržována po vydělení prvního pólového tělíska v MII oocytech (Obr. 1) (Moreno et al. 2002). Aktivita Golgiho aparátu je zastavena v dozrálých oocytech (Trounson & Gosden 2003).

### Zona pellucida

Oocyt je obklopen *zona pellucida*, světlolomnou blankou, která je přibližně u prasete 16  $\mu\text{m}$  tlustá a je složená ze specifických proteinů (Knobil & Neil 1994). *Zona pellucida* zastává

významnou funkci při vývoji oocytu a při oplození. Podílí se na vazbě spermie a je bariérou proti polyspermii (Fritz & Speroff 2011).

Funkce proteinů *zona pellucida*:

- ZP1 propojuje ZP2 a ZP3.
- ZP2 udržuje kontakt ZP mezi oocytem a spermii (Jones & Lopez 2014). Poté, co se spermie váže na ZP2, jsou kortikální granula exocytována a uvolňují ovastacin do perivitelinního prostoru. Ovastacin štěpí ZP2 na N-konci, brání více spermii ve vazbě a proniká oocytem (Burkart et al. 2012; Avella et al. 2014).
- ZP3 umožňuje spermii přilnout k *zona pellucida* a je hlavním bodem při oplodnění (Jones & Lopez 2014).

### **Corona radiata**

Oocyt je obklopen těsně spojenými granulózními buňkami (*corona radiata*, kupovitě buňky), které spolu s oocytem tvoří kompaktní kumulo-oocytární komplex (COC). Tato vrstva granulóznic buněk je zodpovědná za udržování komunikace mezi oocytem a somatickými buňkami (Rybska et al. 2018). Buňky podporují nejen cytoplazmatické zrání oocytu, ale jsou klíčové při udržování meiotického bloku a indukce ovulace (Falcon & Hurd 2013). Vrstvy buněk *corona radiata* patří mezi morfologická kritéria pro způsobilost buňky k *in vitro* zrání (Gordon 2003).

### **Cytoskelet**

Eukaryotické buňky obsahují tři hlavní typy cytoskeletálních vláken: mikrofilamenta, intermediární vlákna a mikrotubuly. Cytoskelet je dynamická a přizpůsobivá struktura, která může zůstat nezměněna nebo může být modifikována podle potřeb buňky.

- Mikrotubuly

Mikrotubuly vykazují relativně jednotnou distribuci ve fázi GV v myších oocytech (Obr. 1). Podobně jsou mikrofilamenta rozptýlena v celé ooplazmě (Sun & Schatten, 2006). Po GVBD se mikrotubuly kondenzují kolem chromozomů a začnou migrovat do kůry, zatímco mikrofilamenta se hustě hromadí v subkortikální oblasti oocytů, zejména v okolí meiotického vřeténka oocytu. Ve zralých myších oocytech ve stádiu MII se mikrotubuly a mikrofilamenta hromadí hlavně v kortikální cytoplazmatické oblasti (Gumus et al. 2010; Sun & Schatten 2006; Verlhac et al. 2000).

- Mikrofilamenta

Aktinová vlákna (mikrofilamenta) regulují různé dynamické jevy během meiotického zrání oocytů a oplodnění. U většiny druhů nejsou mikrofilamenta nutná pro rozpad zárodečných

váčeků a tvorbu meiotického vřetena, ale zprostředkovávají migraci periferních jader (chromozomů), ukotvení kortikálního vřetene, homologní separaci chromozomů, vývoj kůry, tvorbu polarity a vytlačení prvního pólového tělíska během oocytů zrání. Migrace periferních kortikálních granul je řízena mikrofilamenty, zatímco pohyb mitochondrií je zprostředkován mikrotubuly. Během oplodnění se mikrofilamenta podílejí na inkorporaci spermií, rotaci vřeténka (mys), exocytóze kortikálních granul a vytlačení druhého pólového tělíska (Sun & Schatten 2006).

- Intermediární vlákna

Plancha (1996) jako první popsal organizaci a dynamiku cytoplazmatických intermediárních vláken během zrání oocytů u křečka. V rostoucích oocytech křečka v profázi I jsou cytokeratiny, první cytoplazmatická intermediální vlákna (Plancha et al. 1989), jsou omezeny na 4–10 velkých kortikálních agregátů, což odpovídá rozsáhlé síti intermediárních vláken (Obr. 3). Tyto velké agregáty se rozptylují do několika malých míst počínaje v MI až do konce zrání v MII, kde cytokeratin vykazuje skvrnitý vzor, který je rovnoměrně distribuován v cytoplazmě (Plancha 1996).

### **Kumulární buňky**

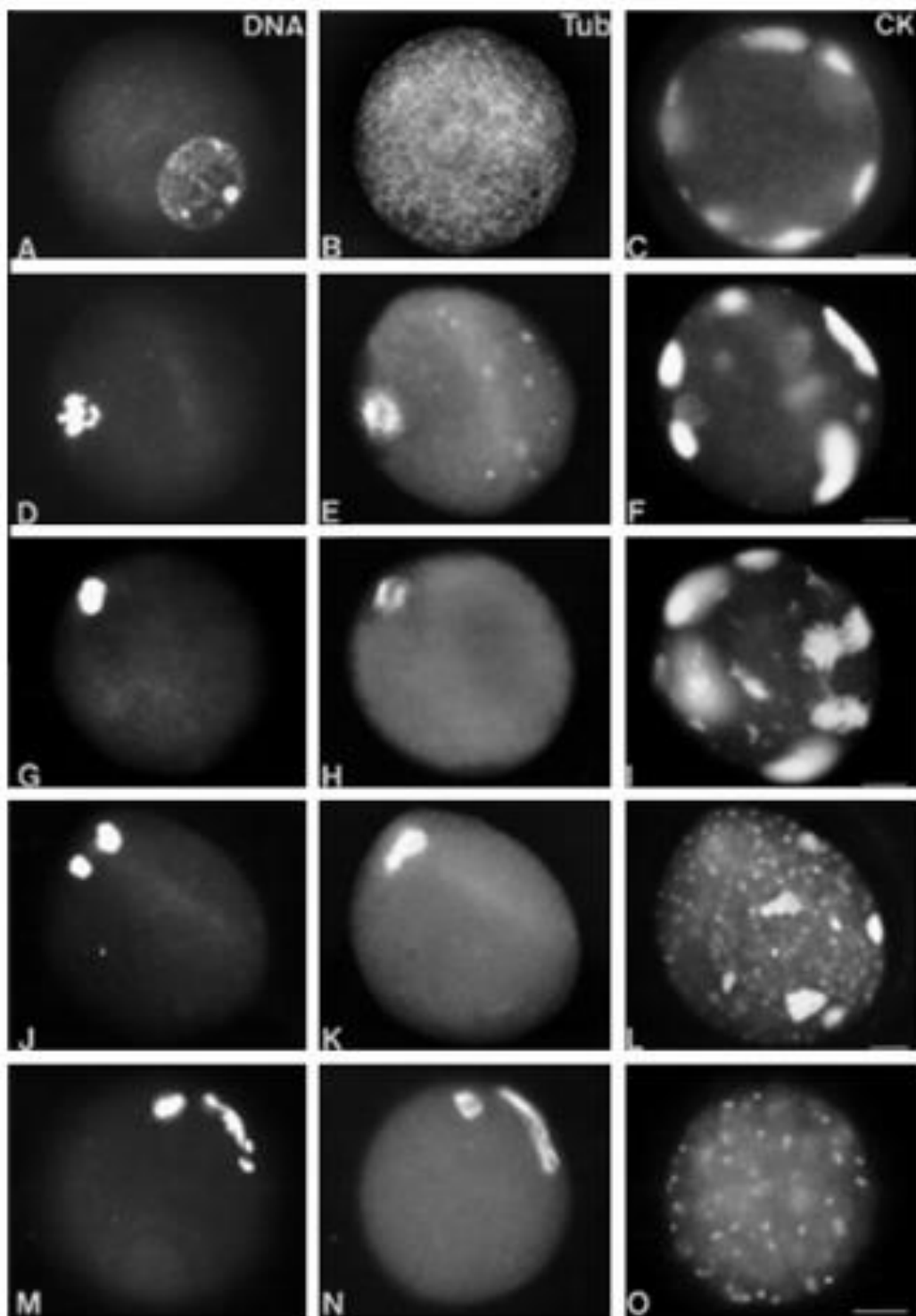
Savčí oocyt je obklopen specializovanými somatickými buňkami, kumulárními buňkami, které podporují zrání oocytů a umožňují jeho oplodnění a vývoj v životaschopné embryo.

Funkce kumulárních buněk jsou závislé na spojích, které se tvoří mezi kumulárními buňkami a oocyty. Spojy jsou tvořeny seskupením proteinů mezibuněčného membránového kanálu zvaných konexiny, které umožňují výměnu malých molekul, jako jsou aminokyseliny, metabolity a nukleotidy mezi sousedními buňkami (Kidder & Mhawi 2002).

Spojení gap junction mezi kumulárními buňkami a oocyty jsou považovány za nezbytné pro zrání a oplodnění oocytů, u prasete MI až MII (Furger et al. 1996; Santiquet et al. 2012; Feng et al. 2013) což dokazuje důležitost těchto buněk (Hashimoto et al. 1998).

Časný vývoj embryí do určité míry závisí na úspěšné koordinaci procesů, ke kterým dochází během zrání cytoplazmy oocytů, včetně molekulárních změn, reorganizace organel a cytoskeletálních změn (Damiani et al., 1996; Salamone et al. 2001; Reyes & Ross 2016). Četné studie ukázaly, že přítomnost kumulárních buněk může zlepšit cytoplazmatické zrání (Tanghe et al. 2002; Ikeda & Yamada 2014).





Obr. 3: Redistribuce cytokeratinů během *in vitro* zrání oocytů u křečka. Oocyty jsou trojitě značeny pro DNA (A, D, G, J, M), tubulin (B, E, H, K, N) a CK (C, F, I, L, O). (A – C) Profáze I. (D – F) Prometáfáze I. (G – I) Metafáze I. (J – L) Pozdní anafáze I nebo telofáze I. (M – O) Metafáze II. Bars = 20 lm (Plancha 1996).

### 3.3 Kultivace kumulo-oocytárních komplexů v *in vitro* podmínkách

V roce 1935, byla *in vitro* metoda poprvé zaznamenána u Pincus & Enzmann (1935). Metoda byla vyzkoušena na králíkovi, který ovuluje hned po kopulaci. Oocyty byly odebrány z velkých folikulů a kultivovány *in vitro* podmínkách. Kultivační médium se skládalo ze sterilní králičí krevní plazmy, do které bylo přidáno několik kapek pufovaného fosfátu Ringerova roztoku (Pincus & Enzmann 1935). Pincus & Enzmann (1935) zjistili, že tyto experimenty jasně ukazují, že oocyt ve zralých folikulech savců je meioticky kompetentní a oplození-schopný. Další zjištění bylo, že folikulární buňky slouží buď k udržování oocytu v nutričním stavu, ve kterém je jaderné zrání nemožné nebo, že skutečně dodávají do oocytu látku nebo látky, které přímo inhibují zrání jader (Pincus & Enzmann 1935).

Maturace oocytů v podmínkách *in vitro* (IVM) je základem reprodukčních biotechnologií u zvířat, včetně přenosu jader a transgeneze. Aplikace těchto technologií může mít pozitivní dopad na zemědělskou produkci potravin, konzervování genetické rozmanitosti a transgenní živočišné produkce, která má potenciál ke zlepšení výkonnostních charakteristik potravinářských zvířat a odolnosti vůči chorobám, jakož i produkce člověka farmaceutické proteiny, modely pro biomedicínský výzkum a zdroj tkání pro xenotransplantaci (Yuan & Krisher 2011). IVM zahrnuje umělé odstranění COCs z antrálních folikulů a jejich kultivaci ve standardní buněčné kultuře (Lonergan & Fair 2016).

Během kultivace dochází, podobně jako v *in vivo* podmínkách k expanzi kumulu. Expanze kumulu COC je nezbytná pro meiotickou zrání a získání vývojové kompetence. Expanze kumulu je založena na syntéze glykosaminoglykanu bohatého na kyselinu hyaluronovou (HA) v extracelulárním prostoru. Zde hrají roli strukturální složky expandovaného kumulu a signální molekuly regulující maturaci oocytů (Chen et al. 1993; Tirone et al. 1993; Kimura et al. 2002; Han et al. 2006; Yokoo et al. 2010).

Zásadní pro úspěšnou expanzi v *in vivo* podmínkách je dostačující počet vrstev kumulárních buněk, jejich kompaktnost a dostatečná produkce HA. Expanzí kumulu je zásadní podmínkou pro úspěšné zrání oocytů, oplození a bezchybný časný embryonální vývoj (Chen et al. 1993; Tirone et al. 1993; Kimura et al. 2002; Han et al. 2006; Yokoo et al. 2010).

#### 3.3.1 Kultivační média

Kultivační média používaná u hospodářských zvířat pro IVM mohou být rozdělena na jednoduchá a komplexní. Jednoduchá média jsou pufovaná hydrogenuhličitánem obsahující základní fyziologický roztok přísad pyruvátu, laktátu a glukózy (využitelné jsou jen L –

izomery); hlavní rozdíly mezi různými formami jednoduchých médií se liší v rozdílech v jejich iontové koncentraci a v hladinách energetických zdrojů (Gordon 2003).

Komplexní média obsahují kromě základní složky jednoduchých médií také bílkoviny, v podobných koncentracích jako se nacházejí v séru. Kvalitní kultivační médium sérum nepotřebuje. Pevný dusík je přítomen jako volná aminokyselina (Gordon 2003).

Složení média je hlavním faktorem, který udržuje oocyty, které poté dosahují zrání a oplodnění (Alofi & Alhimaidi 2004). Mnoho důležitých přísad, které se přidávají do kultivačních médií přispívají ke zrání a oplodnění oocytů v prostředí podobné *in vivo* podmínkám.

Tyto doplňky pomáhají oocytu k vývoji, protože obsahují základní materiály pro proces zrání oocytů (Chiamenti et al. 2009). Tkáňové kultivační médium 199 (TCM-199) (Kharche et al. 2006; Amer et al. 2008), minimální esenciální médium a (MEM) (Ravindranatha et al. 2001) a NCSU 23, 37 se používají pro zrání oocytů u savců.

Kultivační médium poskytuje oocytům energii, jako je pyruvát a adenosintrifosfát-ATP (Araujo et al. 2009). Pyruvát sodný je doplněk přidáný ke zlepšení přežití buněk v kultuře. Je to meziprodukt v glykolytické dráze, takže přísada zlepšuje schopnost buňky metabolizovat glukózu v médiu za účelem výroby energie. Na tomto základě se přísada pyruvátu objevuje jak v kultivačním médiu blastocyst, tak v TCM-199, kde je nezbytný (Stryer & Freeman 1988; Hadwin et al. 1992). ATP jako zdroj energie. Jeho význam spočívá v tom, že při rozkladu ATP na ADP a Pi dochází k uvolnění značného množství energie (Alberts 1998c).

### **Tkáňové kultivační médium 199**

Médium 199 bylo první nutričně definované médium vyvinuté Morganem, Mortonem a Parkerem v roce 1950. Toto komplexní médium bylo vytvořeno speciálně pro studium na primárních kuřecích embryonálních fibroblastech (Morgan et al. 1950).

Tkáňové kultivační médium – TCM 199, běžné médium pro zrání oocytů, bývá používáno ve většině laboratoří (Mattioli et al. 1989; Yoshida et al. 1990; Wang et al. 1991; Funahashi et al. 1994 a, b). Toto médium je pufrované s hydrogenuhličitanem nebo HEPES a doplněné různými séry, gonadotropiny či steroidy (estradiol-17 b) (Gordon 2003). Médium TCM 199 je doplněno buď Hankovou nebo Earleovou solí, které udržují strukturální a fyziologickou integritu buněk *in vitro*.

Média využívající Earleovu sůl jsou pufrována systémem hydrogenuhličitan či kyselinou uhličitou, které udržují pH v inkubátoru a CO<sub>2</sub>. Použití Earleovy soli v atmosférických podmínkách povede k rychlému zvýšení pH kultivačního média. Média TCM 199, které využívají Hanksovu sůl jsou pufrována solnými roztoky navrženými pro atmosférickou rovnováhu a použití v CO<sub>2</sub> inkubátoru povede k rychlému poklesu pH kultivačního média (Earle 1943).

Pyoos et al. (2018) ve své studii porovnávali účinky mezi třemi kultivačními médii (TCM-199 + EGF, NCSU-23 a NCSU-37) na základě míry zralosti a formace pólových tělísek.

TCM 199 + EGF médium (Tab. 1) je doplněno o 10 % BSA. Přidáním β-merkapt ethanolu a L-cysteinu vede ke zvýšené koncentraci cysteinového glutathionu oocytů mezi buňkami granulózy, která napomáhá expanzi kumulu, a to vede ke zrání oocytů (Pyoos et al. 2018).

Tab. 1: Složení tkáňového kulturního média-199 (20ml). BSA: bovinní sérový albumin, EGF: růstový hormon (upraveno podle Pyoos et al. 2018).

<i>Složení TCM 199 + EGF</i>	<i>Koncentrace</i>
<i>TCM 199 + 10 % BSA</i>	20 ml
<i>EGF</i>	40 µl
<i>Pyruvát sodný</i>	20 µl
<i>Folikulární tekutina</i>	20 ml

### **NCSU 23 médium**

NCSU-23 médium je doplněno o gonadotropní hormony FSH a LH. Uvádí se, že tyto gonadotropiny pomáhají v expanzi kumulárních buněk (Sutton et al. 2003), které umožňují meiotickou kompetenci a zvyšují šance na další embryonální vývoj (Tab. 2) (Pyoos et al. 2018).

Bylo prokázáno, že luteinizační hormon zvyšuje intracelulárních hladiny oscilace vápníku a více přispívá k indukované meióze vedoucí k vývoji (Wang et al. 2013).

Tab. 2: Složení NCSU 23 zracího média (50 ml). PFF: prasečí folikulární tekutina (upraveno podle Pyoos et al. 2018).

<i>Složení NCSU-23 média</i>	<i>Koncentrace</i>
<i>Roztok A</i>	36 ml
<i>Roztok B</i>	9 ml

<i>PFF</i>	5 ml
<i>Glukóza</i>	0,0045 g
<i>Sorbitol</i>	0,0984 g
<i>B-ME roztok</i>	50 µl
<i>L-cystein roztok</i>	0,5 ml
<i>Antibiotika (Antimycotic 2%)</i>	1 ml
<i>FSH</i>	100 µl
<i>LH</i>	10 µl

### **NCSU 37 médium**

Médium NCSU-37 je doplněno o gonadotropiny PMSG a hCG (Tab. 3). (Pyoos et al. 2018).

Tabulka 3: Složení NCSU-37 zračního média (50ml) (upraveno podle Pyoos et al. 2018).

<i>Složení NCSU-37 média</i>	<i>Koncentrace</i>
<i>Roztok A</i>	36 ml
<i>Roztok B</i>	9 ml
<i>PFF</i>	5 ml
<i>Glukóza</i>	0,0045 g
<i>Sorbitol</i>	0,0984 g
<i>B-ME roztok</i>	50 µl
<i>L-cystein roztok</i>	0,5 ml
<i>Antibiotikum (Antimykotic 2 %)</i>	1 ml
<i>dbcAMP</i>	200 µl
<i>PMSG</i>	10 µl
<i>hCG</i>	10 µl

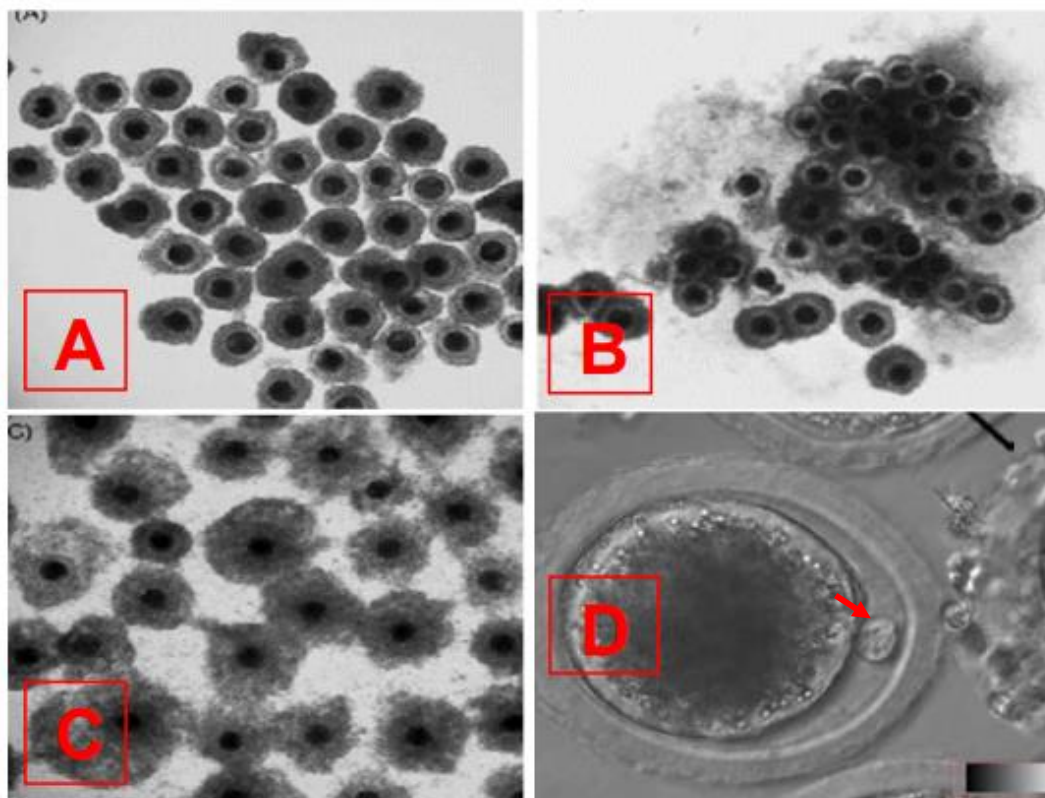
Ukázalo se, že další složky, které se přidávají do NCSU-23 a NCSU-37 médií jako jsou HEPES, laktát, pyruvát (Lee et al. 2012) a folikulární tekutina, která se široce používá jako náhrada za sérum, díky tomu se tyto média označují jako modifikovaná (Kim et al. 1996).

Tab. 4: Významné efekty různých *in vitro* maturačních médií na míru zrání a formování pólového tělíska (upraveno podle Pyoos et al. 2018).

Média	Oocyty (No.)	Míra zralosti (%)	Pólové tělísko
TCM -199+EGF	284	77,1 ( $\pm 0,76$ )	72,5 ( $\pm 0,64$ )
NCSU-23	284	77,1 ( $\pm 0,76$ )	72,7 ( $\pm 1,61$ )
NCSU-37	284	85,9 ( $\pm 1,13$ )	81,9 ( $\pm 0,89$ )

Míra zrání a formování pólového tělíska byly významně vyšší ( $P < 0,05$ ) pro NCSU 37 s mírou zralosti 85,9 % a u 81,9 % se vytvořilo pólové tělísko (Obr. 4), jinak neexistovaly žádné významné rozdíly u médií TCM 199+EGF a NCSU-23 ( $P > 0,05$ ) u obou s mírou zralosti 77,1 % a vytvořením pólového tělíska 72,5 % u TCM 199 + EGF; 72,7 % u NCSU-23 média, jak je uvedeno v (Tab. 4) (Pyoos et al. 2018).

Pyoos et al. (2018) prokázali, že NCSU-37 měla nejvyšší míru zrání oocytů ve srovnání s médii TCM 199 + EGF a NCSU-23 v důsledku jejich odlišností ve složení. NCSU-37 tedy dosáhla nejlepších výsledků.



Obr. 4: (A) Úplná expanze zralého kumulo – oocytárního komplexu v epidermalním růstovém faktoru po 48 hodinách; (B) Zralý kumulo-oocytární komplex v NCSU-23 po 48 hodinách; (C) Zralý kumulo-oocytární komplex v NCSU-37 po 48 hodinách; (D) Vytvoření prvního pólového tělíska označeno šipkou (Pyoos et al. 2018).

### 3.3.2 Kultivace prasečích oocytů

Vaječníky z poražených samic představují hlavní zdroj oocytů pro laboratorní použití (Tellado et al. 2014). Oocyt uzavřený uvnitř folikulu musí zůstat metabolicky aktivní, zatímco je transportován z jatek do laboratoře. Metabolismus buněk závisí na enzymatické aktivitě, které je závislé na teplotě (Nelson & Cox 2005). Snížený přísun kyslíku během transportu vaječnicků by mohl modifikovat redoxní potenciál a zvýšit se produkce ROS v prasečích oocytech (Cunningham & Klein 2007). Reaktivní kyslíkový metabolit může tedy způsobit poškození nukleových kyselin v oocytech, může narušit maturaci oocytů tak i zhroucení vezikul a nižší vitalitu oocytů. Změny metabolismu folikulů, ke kterým dochází během transportu vaječnicků z jatek do laboratoře mohou modifikovat folikulární tekutinu a tím ovlivnit kvalitu oocytů (Nelson & Cox 2005).

#### Kvalita folikulů a oocytů

Vybírají se takové antrální folikuly, které mají průměr průměr 3–6 mm ty jsou aspirovány jehlou. Aspirované oocyty s rovnoměrně granulovanou cytoplazmou a alespoň třemi jednotnými vrstvami kompaktních buněk kumulu (Gordon 2003).

#### Vyrovnávací systémy, osmolarita a povrchové napětí

Média jsou založena na vyváženém salinickém roztoku (BSS), které dodávají základní ionty a je také důležitý pro udržení osmotické rovnováhy (Adams 1990).

Je velmi důležité udržovat správný pH růstového média mezi 7,3 a 7,5, čehož je obvykle dosaženo pomocí systému bikarbonát či CO<sub>2</sub>. V přítomnosti 5 % CO<sub>2</sub> ve vzduchu vytváří pH 7,4. Protože produkty metabolismu rostoucích buňky snižují pH média, je někdy nutné zvýšit hladinu bikarbonátu v médiu pro udržení pH. Fosfát v BSS také pomáhá udržovat pH a dodávat esenciální fosfátové ionty (Adams 1990).

Osmolarita médií, která jsou neúčinnější pro kultivaci savčích oocytů a embryí *in vitro*, je nižší než u ovidukální tekutiny. Osmolarita by se měla pohybovat mezi 210 až 362 mOsm (Van Winkle et al. 1990; Miyoshi et al. 1994; Miyoshi et al. 1995; Hay-Schmidt 1993; Hadi et al. 2005).

Oocyty a embrya mohou přežít vysokou fyziologickou osmolaritu *in vivo* možná díky přítomnosti aminokyselin, jako je glycin, které slouží jako organické osmolarity v samičím reprodukčním traktu (Miyoshi & Mizobe 2014).

Miyoshi & Mizobe (2014), provedli studii, kdy výsledky ukazují, že kultivace uměle aktivovaných prasečích oocytů v izotonickém médiu zlepšuje rychlost dělení, ale ve srovnání s hypotonickými médii inhibuje vývoj dělení. Přidání glycinu do izotonického média brání této inhibici vývoje oocytů, což má za následek zlepšení rychlosti tvorby blastocyst ve srovnání s hypotonickým médiem.

Pufrační systém používaný při zrání závisí, zda je médium vystavené vzduchu nebo atmosféře obohacené o CO<sub>2</sub>. Výhodou fosfátového pufru v médiích pro krátkodobou práci s oocyty je, že nevyžadují CO<sub>2</sub> pro udržení relativně konstantního pH (Gordon 2003).

### **Doba zrání**

Při inkubaci by doba neměla přesáhnout 48 hodin (Petters & Well 1993).

Několik důležitých faktorů pro úspěch IVM závisí na inkubační době, která může ovlivnit konečnou kvalitu (Miyoshi et al. 2002). Signální dráha 3', 5' cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) je vysoce časově závislá a omezená na časové mechanismy, načež vyvolává rozpad zárodečných váčků, takže zrání jader závisí i na cAMP, oocyt tedy může dosáhnout metafázy II (Sirard et al. 2006). Podobně dalším časově závislým faktorem je sekrece steroidních hormonů kumulo-oocytárních komplexů získaných z malých a velkých folikulů během IVM. Topfer et al. (2016) pozorovali, že oocyty získané z malých folikulů mají menší schopnost podporovat syntézu estradiolu v první polovině IVM (28 h) a potlačit syntézu progesteronu na konci IVM (48 h) ve srovnání s oocyty z velkých folikulů. Sekrece steroidních hormonů pomocí COC je tedy časově závislá, a proto by doba *in vitro* zrání měla být přesná a definovaná (Sirard et al. 2006; Topfer et al. 2016).

### **Teplota a plynná fáze**

Nejběžnější plynná atmosféra, který se používá pro IVM je 5 % CO<sub>2</sub>, s 20 % O<sub>2</sub>. Tato koncentrace plynů, která je pozorována v samičím reprodukčním traktu a folikulární tekutině se pohybuje mezi 1,3 a 8,5 % O<sub>2</sub> (Banwell et al. 2007). Koncentrace plynů hraje významnou roli v buněčné aktivitě v mnoha typech buněk, jako jsou oocyty, somatické buňky, kmenové buňky a embrya (Hirao et al. 2012). Některé studie prokázaly, že nižší obsah kyslíku 5 % během IVM vedlo k vyšší produkci embryí (Hashimoto et al. 2000, Hashimoto et al. 2009; Miller & Rorie 2000; Bermejoalvarez et al. 2010), zatímco v jiných studiích byly škodlivé (Castro & Hansen 2007; Pinyopummintr & Bavister 1995).

Konvenční systémy zrání *in vitro* pro prasečí oocyty se udržují při teplotě 38,5–39 °C, která souvisí s normální tělesnou teplotou.



Abeydeera et al. (2001) studovali teplotu kultivačního média, které měly 35 °C, protože to byla nejnižší teplota zaznamenaná v preovulačních folikulech. Předpokládalo se, že kultivace při 35 °C prasečích oocytů během IVM může poskytnout lepší tepelné prostředí pro dokončení jaderného či cytoplazmatického zrání. Ale ve výsledku pouze několik (7 %) oocytů dosáhlo stádia MII, při kultivaci v 35 °C po dobu 44 hodin. Pokud, ale byla doba kultivace prodloužena na 68 hodin tak více jak polovina (58 %) oocytů dokončilo jaderné zrání do metafáze II.

Eng et al. (1986) zjistili, že prasečí oocyty kultivované při teplotě 39 °C měly vyšší procento tvorby pólového tělíska než při kultivaci v 37 °C. Zdá se, že nižší kultivační teplota oocytů vyžaduje mnohem delší kultivační období pro dokončení procesu zrání (Mazia 1961).

Nízká teplota může interferovat s normální enzymatickou a metabolickou aktivitou oocytů. Studie z roku 2000 ukázala, že snížení teploty kultivačního média způsobilo ztrátu mikrotubulů (Wang et al. 2000), které jsou nezbytné pro metafázovou destičku a vytlačování pólového tělíska během zrání oocytů což naznačuje, že mikrotubuly jsou citlivé na teplotu (Petzelt 1979).

### **Antibiotika v kultivačních médiích**

Antibiotika se přidávají do všech médií používaných v tkáňové kultuře (Quinn 2014). Do maturačního média jsou obvykle antibiotika dodána, aby zabránila růstu a proliferaci mikroorganismů během kultivace (Gordon 2003). Ideální antibiotika pro oocyt by měla mít širokospektrální aktivitu. Použití stopového množství penicilinu (50-100 µg/ml) a streptomycinu (50-100 mg/ml) v proplachovacích tekutinách a kultivačních médiích. Většina komerčních společností zabývajících se asistovanou reprodukcí poskytuje svá média s 10 µg/ml gestamicinu (Quinn 2014).

### **Vliv amoniaku**

Účinky vysokých koncentrací amoniaku během IVM a následného vývoje embryí byly předmětem studie zjištěné Hammon et al. (1999). Uvádí se několik zpráv, že amoniak může být spojený s negativními dopady na vývoj raného bovinního embrya, když je vystaven tomuto činidlu během kultivace embryí. Došli k výsledku, že bovinní oocyty jsou schopné tolerovat vysoké koncentrace amoniaku během zrání. V jiné studii Sinclairu et al. (2000 a) ukázal, že vystavení vysokým koncentracím amoniaku *in vivo* podmínkách byli ohroženy následné schopnosti oocytů se vyvinout do stádia blastocysty *in vitro*.

### 3.3.3 Kultivační systémy

Ačkoli jsou systémy folikulárních kultur užitečné pro sběr zralých oocytů, maturační a vývojové kompetence pěstovaných oocytů *in vitro*, tak klesá ve srovnání se získanými a vyzrálými oocyty *in vivo* (Desai et al. 2011). Vkládá se mnoho úsilí pro zlepšení kvality oocytů pěstovaných *in vitro*, ale i přesto jejich příčina snížené kvality zůstává neznámá.

Klasicky upřednostňovaným modelem je hlavně dvourozměrné kultivační systém (2D). Takové kultivační systémy stále neodrážejí situaci *in vivo*, protože buňky v těle pravděpodobně přijímají signály ze všech tří rozměrů (3D). Proto byly zavedeny 3D kultury, aby se zlepšila simulace takových podmínek v živém organismu (Desai et al. 2011).

#### 2D kultivační systém

Konvenční 2D buněčná kultura se spoléhá na přilnutí k plochému povrchu (Petriho misce), aby poskytla buňkám mechanickou podporu (Edmondson et al. 2014).

Adherentní kultury mají bohužel řadu nevýhod. Za prvé, 2D kultivované buňky napodobují přirozené struktury tkání. V této kultivační metodě nejsou interakce mezi buňkami a buňkami a extracelulárními prostředím reprezentovány tak jak by byly v nádorové hmotě. Tyto interakce jsou odpovědné za buněčnou diferenciaci, proliferaci, vitalitu, zploštění buněk ovlivňuje jaderný tvar (Thomas et al. 2002) tudíž i expresi genů a proteinů (Vergani et al. 2004), reakci na podněty, metabolismus řady léků a další buněčné funkce (Pampaloni et al. 2009; Baker & Chen, 2012; Hickman et al. 2014; Bissell et al. 2003). Díky tomuto 2D buněčné kultury špatně napodobují podmínky *in vivo*. Růst na dvourozměrných (2D) površích má za následek zploštění a remodelaci buňky a jejího vnitřního cytoskeletu. Změněná morfologie buněk může ovlivnit jejich funkci (Mahmud et al. 2009; Kilian et al. 2010) organizace struktur uvnitř buňky, sekrece a buněčná signalizace (Debnath & Brugge 2005; Nelson & Bissell 2006). Kvůli poruchám v interakcích s vnějším prostředím ztrácejí buňky adherentně svoji polaritu (Mseka et al. 2007), což mění reakci těchto buněk na různé jevy, například na apoptózu (Weaver et al. 2002; Meyers et al. 2003). Další nevýhodou 2D kultury je, že buňky v monovrstvě mají neomezený přístup k složkám média, jako je kyslík, živiny, metabolity a signální molekuly (Pampaloni et al. 2009).

2D systémy jsou jednoduché, pohodlné, nákladově efektivní a široce používané. Stále však existují obavy z různých nevýhod a omezení (Kapałczyńska et al. 2016; Ryan et al. 2016). Klíčovým omezením 2D kultury je neschopnost napodobit *in vivo* prostředí.

Vzhledem k mnoha nevýhodám 2D systémů byla potřeba najít alternativní modely jako jsou 3D kultivační systémy (Kapałczyńska et al. 2016).

### **3D kultivační systém**

Dnes se objevují 3D buněčné kultury, a to nejen jako nový nástroj v časném objevu léků, ale také jako potenciální terapeutika k léčbě nemocí (Yang & Engler 2017).

*In vivo*, oocyty zrají ve složitém prostředí, kde buněčné kontakty, komunikace a stimulace signalizace umožňují samičím gametám získat jejich vývojovou kompetenci. *In vitro* podmínky, poskytnou fyziologičtější prostředí pro oocyty a embrya. Tyto systémy, pojmenované skafold, byly vytvořeny a použity pro *in vitro* kultivaci, která poskytuje vhodnější prostředí pro buněčný růst, diferenciaci a funkci (Knight & Przyborski 2015), protože mohou zachytit buňky nebo umožnit jejich migraci a začlenit biologicky aktivní molekuly. (Heywood et al. 2004; Jongpaiboonkit et al. 2008; Topman et al. 2013). Buňky mohou přijímat podněty z prostředí, jak se to děje *in vivo* (Cawkill & Eaglestone 2007; Lee et al. 2008). Navíc ve 3D kulturách je zachována morfologie a polarita buněk (Yamada & Cukierma 2007; Petersen et al. 1992; Benya & Shaffer 1982). Dalším důležitým atributem 3D kultury je její podobnost s buňkami rostoucími *in vivo* z hlediska buněčné topologie, genové exprese, signalizace a metabolismu (Ghosh et al. 2005; Berthiaume et al. 1996; Semino et al. 2003; Powers et al. 2002; Frieboes et al. 2006; Marushima et al. 2011).

Ukázalo se, že 3D buněčné kultury mají odlišnou genovou expresi ve srovnání s 2D buněčnou kulturou. Zschenker et al. (2012) porovnal úroveň genové exprese v různých buněčných liniích rakoviny a jejich původ a výskyt ve tkáních zastával názor, že více než 30 % genů má různé úrovně exprese.

Nedávné pokroky v buněčné biologii, technikách mikrofabrikace a tkáňovém inženýrství umožnily vývoj široké škály technologií 3D buněčných kultur. Ty zahrnují mnohobuněčné sféroidy, organoidy, matrice, hydrogely, orgány na čípech a 3D biotisk (Yang & Engler 2017).

Trojrozměrný kultivační systém může podporovat vývoj folikulů pomocí biologických materiálů pro udržení výměny informací mezi buňkami. Kromě toho lze zralé oocyty získat použitím trojrozměrného kultivačního systému v *in vitro* kultuře z folikulů primátů (Smih & Takayama 2017).

Pro 3D kultivační systém se využívají kolagenové hydrogely, protože pojivová tkáň je součástí vaječníku, která je složena hlavně z vyšší koncentrace kolagenu (Berkholtz et al. 2006).

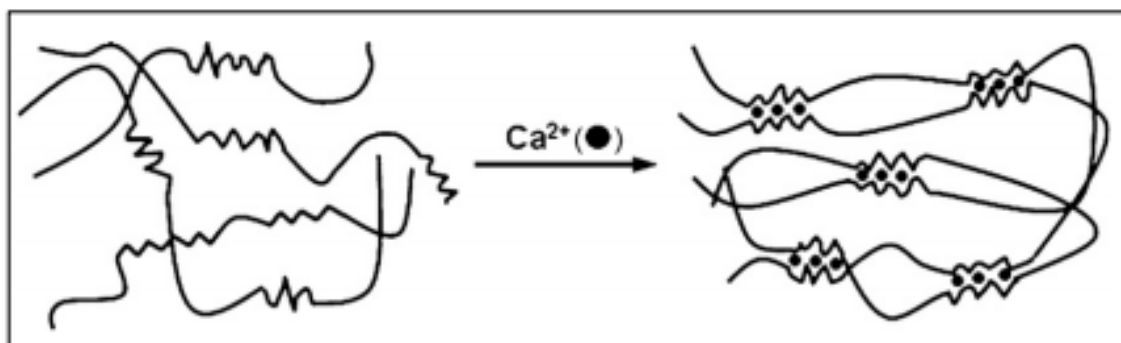
Hydrogely z přírodních zdrojů, jako je kolagen, fibrin nebo Matrigel, jsou biokompatibilní, mají přirozené adhezivní vlastnosti a udržují mnoho fyziologických funkcí buněk – což má za následek vysokou životaschopnost buněk, kontrolovanou proliferaci, řízenou diferenciaci a buněčný fenotyp pozorovaný *in vivo* podmínkách (Glowacki & Mizuno 2008; Pathak & Kumar 2011; Orgel et al. 2014).

Syntetické hydrogely lze rozdělit na nepřirozené a přírodní polymery (Przyborski 2011). Polyethylenglykol (PEG), kyselina polyprolaktón (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a další (Raeber et al. 2005; Zhang & Khademhosseini 2017). Mají tu výhodu, že jsou poměrně levné, jsou relativně inertní. Jedním z nejlépe charakterizovaných přírodních hydrogelů je kyselina hyaluronová (HA) - glykosaminoglykan, který lze modifikovat funkčními skupinami (Burdick & Prestwich 2011; Baeva et al. 2014; Goubko et al. 2014).

### Alginátový hydrogel

Alginát je lineární polysacharid produkovaný jako složka ECM v hnědých řasách a některých bakteriích. Polysacharid je složen z opakujících se jednotek (Amsden & Turner 1999). Proto alginátové hydrogely prokázaly vysokou použitelnost jako strukturu pro imobilizaci buněk. Hydrogely, tj. síť hydrofilních polymerních řetězců s vysokým obsahem vody (95 %), jsou velmi atraktivní jako 3D skaffold pro buněčnou a tkáňovou kulturu *in vitro*. Díky jejich schopnosti napodobovat fyzikální vlastnosti nativní měkké tkáně (Tibbitt & Anseth 2009) vynikají vysokou pórovitostí pro účinnou difúzi proteinů a živin (Obr. 5).

Roztok chloridu vápenatého ( $\text{CaCl}_2$ ) se používá jako činidlo do alginátového roztoku, přičemž okamžitě vytvoří 3D síť vysoce hydratovaného gelu (Andersen et al. 2012). Chlorid sodný se často přidává do roztoku  $\text{CaCl}_2$  pro větší uniformitu a vyšší pórovitost výsledného alginátového gelu poskytnutím antigenizujících kationtů; pokud není přidán chlorid sodný, stává se, že alginát je na povrchu kuličky pevně obalen, čímž omezuje další difúzi iontů vápníku do středu gelu (Smidsrod & Skjakbraek 1990).



Obr. 5: Alginátové hydrogely připravené iontovým zesíťováním (model vaječných krabic). Pouze guluronátové bloky se podílejí na tvorbě vlnité struktury podobné vaječným krabičkám s mezerami, ve kterých jsou umístěny ionty vápníku (Kong et al. 2006).

Důležité je, že alginátová matrice poskytuje strukturální podporu nezbytnou k udržení esenciálních interakcí oocytů a somatických buněk *in vitro* v rostoucím folikulu (Smidsrod & Skjakbraek 1990).

Xu et al. (2006) provedli studii, která ukázala, že oocyty kultivované *in vitro* v alginátovém hydrogelovém scaffoldu jsou schopny znovuzahájit meiózu, podstoupit rozpad zárodečného váčku, vytlačování pólového tělíska a k oplodnění, které vede k narození životaschopných a plodným potomkům.

Tabulka 5: Klíčové aspekty buněčné charakteristiky v porovnání mezi 2D a 3D kultivačními systémy.

<i>Buněčné charakteristiky</i>	<i>2D</i>	<i>3D</i>
<i>Podobné jako in vivo</i>	Nenapodobuje přirozenou strukturu tkáně (Takai et al. 2016).	Tkáně a orgány <i>in vivo</i> jsou ve 3D formě (Takai et al. 2016).
<i>Morfologie</i>	Změny v morfologii buněk (Kapałczyńska et al. 2016).	Vyazuje tvar, který je podobný podmínkám <i>in vivo</i> (Vinci et al. 2012; Li et al. 2014).
<i>Polarita</i>	Částečná polarizace (Antoni et al. 2015)	Přesnější zobrazení polarizace buněk (Antoni et al. 2015)
<i>Proliferace</i>	Rychlejší proliferace buněk než <i>in vivo</i> prostředí (Edmondson et al. 2014).	Rychlejší i pomalejší proliferace ve srovnání s 2D kultivovanými buňkami v závislosti na typu buňky či typu 3D kultivačního systému (Edmondson et al. 2014).
<i>Expres genů</i>	Rozdílné úrovně v genové expresi a sestřih, topologii a biochemii buňky (Pampaloni et al. 2007).	Rovnoměrnější exprese genů (Cukierman et al. 2002).
<i>Kultivace</i>	Buňky v jedné vrstvě (Pampaloni et al. 2007).	Buňky se více vrstvách (Edmondson et al. 2014).
<i>Kontakt</i>	Narušení interakcí mezi buněčným a extracelulárním prostředím (Kapałczyńska et al. 2016).	Vzájemný kontakt mezi buňkami (Cukierman et al. 2002).
<i>Náklady během údržování kultivačního systému</i>	Jednoduché, levné, komerčně dostupné testy a média (Friedrich et al. 2007).	Dražší, časově náročnější a méně komerčně dostupných testů (Friedrich et al. 2007).

### 3.4 Apoptóza

Buňky mnohobuněčného organismu jsou členy vysoce organizované skupiny. Počet buněk v této skupině je přísně regulován – nejen kontrolou rychlosti buněčného dělení, ale také kontrolou rychlosti buněčné smrti. Pokud jsou buňky nepotřebné, dochází k programované buněčné smrti, běžně se nazývá apoptóza (Alberts 1998c).

Důležité je, že na rozdíl od nekrózy (neregulovaná forma buněčné smrti často způsobené akutním buněčným traumatem) vyžaduje apoptóza přívod energie. Během nekrózy jsou buněčné obsahy nekontrolovaně uvolňovány do buněčného prostředí a následně dochází k poškození okolních buněk se silnou zánětlivou odpovědí v odpovídající tkáni (Leist & Jaattela 2001).

Kumulární buňky obklopují a vzájemně komunikují s oocyty během vývoje folikulů a po ovulaci, což naznačuje, že výskyt apoptózy v buňkách kumulu může ovlivnit kvalitu oocytů. Tyto buňky uvolňují signály důležité pro dozrávání oocytů a vývojovou způsobilost, a proto výskyt apoptózy v těchto buňkách má dopad na samičí gametu (Yuan et al. 2005).

V době ovulace Graafova folikulů prasknou a způsobí vznik kompetentních oocytů v metafázi II. Po ovulaci mají tyto oocyty první pólové tělíčko. Pokud nedojde k oplodnění, dojde k postovulačnímu stárnutí a spontánní aktivaci oocytu nebo apoptóze (Tripathi et al. 2012; Chaube et al. 2007; Prekumar & Chaube, 2013; Prekumar & Chaube 2014; Prasad et al. 2014) nebo k apoptóze oocytů (Tripathi et al. 2010; Tripathi et al. 2011; Chaube et al. 2014; Chaube et al. 2008, Chaube et al. 2009; Chaube et al. 2009; Tripathi & Chaube 2015). Studie naznačují, že dobré kvalitní oocyty jsou ovulovány nejprve během časného reprodukčního života. Postupem času dochází ke stárnutí, oocyt se stává více náchylný k apoptóze a omezuje reprodukční výsledek jedince (Wu et al. 2000; Santonocito et al. 2013; Tsutsumi et al. 2014).

### ROS

Mezi ROS patří volné radikály vytvořené z molekuly kyslíku, které obsahují nepárový elektron. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou metabolity kyslíku, které vyvolávají buněčnou nerovnováhu a vyvolávají toxické účinky (Halliwell & Aruoma 1991; Halliwell & Chirico 1993; Agarwal et al. 2005) vedoucí k buněčné smrti. Aby se stal stabilním, ROS se váže na kovy, jako jsou železo nebo měď, nicméně toto navazání vede k poškození buněk. Tedy intracelulární koncentrace ROS musí zůstat nízké (Agarwal et al. 2003, 2005).

Mitochondrie spotřebovávají většinu dostupného molekulárního kyslíku a představují hlavní místo produkce ROS v aerobních buňkách (Boveris & Chance 1973). ROS, pokud nejsou

detoxikovány, mohou způsobit dysfunkci či smrt buněk. Samotné mitochondrie jsou velmi citlivé vůči škodlivých účinků kyslíkových radikálů. Proto ROS produkované mitochondriemi mohou oxidovat proteiny a indukovat peroxidaci lipidů, čímž narušují bariérové vlastnosti mitochondriální membrány.

Dalším cílem ROS je mitochondriální DNA (mtDNA), které je obzvláště citlivé na poškození způsobené ROS v důsledku jeho uzavření blízkost dýchacího řetězce a nedostatek ochranných histonů. Hladina oxidativně modifikovaných bází v mtDNA je tedy 10 až 20krát vyšší než v jaderné DNA (Richter 1995). mtDNA kóduje několik proteinů nezbytných pro funkci dýchacího řetězce, a tedy pro syntézu ATP oxidační fosforylací. Oxidační poškození způsobené ROS je pravděpodobně hlavní příčinou mitochondriální genomové nestability a respirační dysfunkce. Vysoká produkce ROS vedou k oxidačnímu stresu buňky, včetně buněčných membrán a nukleových kyselin. Následně oxidativní stres vyvolává poškození DNA, spouští se apoptóza, (Hockenbery et al. 1993) a smrt.

### **Receptory a ligandy**

Receptory smrti jsou transmembránové proteiny typu I a právě jejich složka intracytoplazmatické domény smrti (DD) je nezbytná pro vznik signální přenosu a apoptózy (Itoh & Nagata 1993, Tartaglia et al. 1993).

Tyto receptory se označují jako receptory smrti, protože jednou z jejich nejvýznamnějších funkcí je indukce programované buněčné smrti potřebné pro přenos cytotoxického signálu. Apoptóza je iniciována vazbou ligandů na specifické receptory umístěné na buněčných membráne. Smrtící ligandy a receptory (TNF $\alpha$ ) a jeho receptory (TNFR), FasL (také nazývaný Apo-1ligand nebo ligand CD95) a Fas (Apo-1 nebo CD95), (TRAIL) a jeho receptory (TRAILRs) (Daniel et al. 2001).

Na aktivaci pro-apoptotických faktorů se podílejí aktivní receptory, které se nacházejí v cytosolu a po dostatečném signálu změni svou konformaci a přesunou se do mitochondriální membrány, kde iniciují tak permeabilitu vnější membrany mitochondrie, a to vede k uvolnění cytochromu C (Hata et al. 2015; Chipuk et al. 2010; Czabotar et al. 2014). Každý receptor buněčné smrti aktivuje specifickou kaspázu, která způsobí apoptotickou smrt buněk během několika hodin (Manabe et al. 2003).

### **Proapoptické a antiapoptické faktory**

Bcl (**B-Cell Lymphoma**) proteiny jsou známé regulátory apoptózy. Tato rodina se skládá z proteinů, které mohou buď zvýšit nebo zabránit buněčné smrti (Allen et al. 1998; Adams &

Cory 1998). Důležitými prvky v apoptotické signalizaci jsou rodina proteinů Bcl-2, cytochrom C, APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) a kaspázy. Do skupiny antiapoptotických a proapoptotických faktorů patří i rodina proteinů Bcl-2 (Tabulka 6).

Existují čtyři domény BH – BH1, BH2, BH3 a BH4. Antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 (včetně Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-xW) sdílejí domény BH1 a BH2 a v některých případech doménu BH4. Většina členů proapoptické rodiny, jako je Bax a Bak, obsahuje doménu BH3, která může být také přítomna v některých antiapoptotických proteinech (Bcl-2 a Bcl-xL) (Sattler et al. 1997).

Apoptóza je spouštěna pro-apoptickými proteiny, které jsou pouze pro BH3 (Letai et al. 2002). Zahrnuje proteiny Bid, Bim, Bmf, Bad, Bik, Puma a Noxa, které selektivně reagují na přicházející apoptotické stimuly a buněčnou smrt navozují zejména interakcemi s proteiny BAX, BAK a BOK. (Jin & El-Deiry 2005). Ty se nacházejí v cytosolu a po dostatečném signálu změni svou konformaci a přesunou se do mitochondriální membrány, kde iniciují tak permeabilitu vnější membrány mitochondrií to vede k uvolnění cytochromu C (Hata et al. 2015; Chipuk et al. 2010; Czabotar et al. 2014) a následnou regulaci aktivity kaspázy 9 (Sattler et al. 1997). Doména BH3 podporuje dimerizaci (homodimery či heterodimery) členů rodiny Bcl-2.

Anti-apoptotické členy, včetně Bcl-2 podporují přežití buňky. Pro-apoptotické proteiny BCL-2 (BAX a BAK) vyvolávají buněčnou smrt, které jsou aktivovány během apoptózy a vytvářejí póry v mitochondriálních vnějších membránách, které umožňují uvolňování proapoptotických faktorů (Hata et al. 2015; Chipuk et al. 2010; Czabotar et al. 2014). Antiapoptotické proteiny Bcl-2 inhibují účinky proapoptotických proteinů, Bax a Bak, dvěma různými mechanismy, inhibicí přímou vazbou nebo regulací prostřednictvím proteinů obsahujících pouze BH3 (Kastan & Bartek, 2004). Homodimerizace Bcl-2 zahrnuje interakci „head-to-tail“, ve které N-koncová oblast obsahující doménu BH4 interaguje s vzdálenějšími oblastmi Bcl-2, kde jsou umístěny BH1, BH2 a BH3 (Sattler et al. 1997). Bcl-2 interaguje s buněčným Baxem za vzniku heterodimeru Bcl-2 / Bax, čímž brání tvorbě homologního dimeru Bax / Bax (Barnum & O'Connell, 2014) což je časný krok apoptózy (Whittaker et al. 2017).

Bcl-2 je integrální mitochondriální, jaderný a endoplazmatický membránový protein retikula. Ukázalo se, že nadměrná exprese Bcl-2 chrání buňky před apoptózou.



Tabulka 6: Seznam členů rodiny Bcl-2 proteinů podle jejich podtříd (upraveno podle Suhaili et al. 2017).

*Proteiny Bcl-2*

<i>Proteiny s více doménami</i>		BH proteiny BH3 proapoptotické	
<i>Antiapoptotické proteiny</i>	Proapoptotické proteiny	Přímé aktivátory	Depresory/senzibilizátory
<i>Bcl-xl</i>	BAX	Bid	Bad
<i>Bcl-2</i>	BAK	Bim	Bik
<i>NOXA</i>	BOK	PUMA	BMF
<i>Bcl-w</i>			HRK
<i>Mcl-1</i>			NOXA
<i>A1/BFL1</i>			
<i>Bcl-B</i>			

**Mechanismus apoptózy**

Apoptóza je vyvolávána více signálními cestami a je regulována složitými vnějšími a vnitřními ligandy. Proces apoptózy je řízen cestou buněčných signálů diverzity a podílí se na přežití buňky či buněčné smrti. Existují dvě hlavní cesty apoptózy – vnější cesta (dráha receptoru smrti) a vnitřní cesta (mitochondriální cesta) rozlišené podle toho, zda jsou nebo nejsou zahrnuty kaspázy (Adrain et al. 2002).

Buňky podstupující apoptózu jsou charakterizovány kondenzací chromatinu, jadernou fragmentací, fragmentací internukleozomální DNA, vyklenutím plazmatické membrány, tvorbou apoptotický těl (membránou ohraničené buněčné fragmenty, které jsou následně fagocytovány bílými krvinkami (makrofágy), zadržení organel a nakonec fagocytózou (Kerr & Harmon 1991).

Rodina proteinů Bcl-2 řídí uvolňování cytochromu C (Adams & Cory 1998), který se sám uvolňuje při narušení mitochondrií a dochází ke štěpení Bid. Bid, Bax a Bak jsou členy rodiny Bcl-2 a jsou pro-apoptotické, zatímco Bcl-2 a Bcl-XL inhibují uvolňování cytochromu C a jsou antiapoptotické. Zdá se, že antiapoptotické molekuly, jako je Bcl-XL, soutěží o vazbu s aktivovanou formou Bid, a tím zabraňují aktivaci Bax nebo Bak, čímž se zabrání

mitochondriálnímu uvolňování cytochromu C (Cheng et al. 2001). Výsledek této konkurence určuje, zda je signál pro buněčnou smrt úspěšný.

## **Kaspázy**

Kaspázy jsou syntetizovány jako pro-enzymy s velmi nízkou aktivitou, které vyžadují aktivaci. Aktivovány jsou štěpením jinými kaspázami, které tak zajistí aktivaci proteolytické kaskády kaspád. Aktivace kaspáz je regulována členy proteinových rodin Bcl-2 a IAP (Alberts 1998c). Na základě velikosti pro-domény jsou kaspázy rozděleny na dlouhé a krátké obsahující pro-doménu. Dlouhé pro-doménové kaspázy, tj. kaspáza 1, 2, 4, 5, 8, 9 a 10, patří do skupiny iniciátorů kaspázy, zatímco krátké pro-doménové kaspázy, tj. kaspáza 3, 6, 7, 11 a 13, představují efektorové enzymy (Orrenius et al. 2015; Zhivotovsky et al. 1999).

Pro-kaspázy slouží jako „cytoplazmatický regulátor“ apoptózy, který se po aktivaci může translokovat do jiných intracelulárních kompartmentů, jako je endoplazmatické retikulum a jádro (Mancini et al. 1998; Samali et al. 1998). Kaspázy štěpí proteiny, lokalizované v buněčných membránách, cytoplazmě a v jádře (Zhivotovsky et al. 1997; Stroh & Schulze-Osthoff 1998).

Zhivotovsky et al. (1997) zjistili, že v jádru byla nalezena pro-kaspáza 2 a kaspázy 2 a 3. Kaspáza 2 je také důležitá pro programovanou smrt oocytů během vývoje myší (Bergeron et al. 1998). Pro-kaspázy 7 a 8 byly nalezeny pouze v cytosolu. V apoptotických buňkách byly kaspázy 3, 8 a 9 přítomny ve cytosolické frakci, zatímco kaspázy 3 a 9 byly také nalezeny v mitochondriální frakci a kaspáza 7 v mikrosomu. Aktivovaná kaspáza 8 přenáší apoptotický signál buď přímým štěpením (aktivací) efektorových kaspáz nebo štěpením proteinu interagujícího s BH3 Bcl2, což vede k uvolnění cytochromu C z mitochondrií, spuštění aktivace kaspázy 9 v komplexu s dATP a Apaf-1. Tvorba komplexu, zvaného apoptosóm, vede k aktivaci kaspázy 9 (Rytomaa et al. 1999) a následné aktivaci efektorové kaspázy 3, 6 či kaspázy 7 (Robertson et al. 2002).

## 4 Metodika

### 4.1 Získávání kumulo-oocytárních komplexů (COC)

Vaječníky byly získány na jatkách z prasnic v neznámém stádiu estrálního cyklu. Vaječníky byly transportovány do laboratoře při teplotě 38,5–39 °C do 2 hodin po porážce.

V laboratoři byly vaječníky opláchnuty fyziologickým roztokem. Poté byly z folikulů aspirovány kumulo-oocytární komplexy (COC) společně s folikulární tekutinou. COC byly aspirovány z antrálních folikulů (průměr: 3–6 mm) pomocí 20 ml injekční stříkačky a jehly o průměru 1,8 mm.

Ke kultivaci byly vybírány COC s několika kompaktními vrstvami kumulárních buněk a s oocytem s celistvou a kompaktní cytoplasmou (skupina A a B dle tab. 7).

Tabulka 4: Charakteristické vlastnosti aspirovaných COC.

Stupeň	Výběr oocytů
Stupeň A	Oocyty obklopené 3 nebo více úplnými vrstvami kupovitých buněk ulpívajícími na <i>zona pellucida</i> s homogenním jádrem
Stupeň B	Oocyty obklopené 2 úplnými vrstvami kupovitých buněk ulpívajícími na <i>zona pellucida</i> s homogenním jádrem
Stupeň C	Oocyty obklopené 1 úplnou vrstvou kumulárních buněk ulpívající na <i>zona pellucida</i>
Stupeň D	Oocyty mají méně než 1 úplnou vrstvu kumulárních buněk ulpívající na <i>zona pellucida</i> a s pyknotickým jádrem – nevratné zahuštění chromatinu

### 4.2 Kultivace COC

COC byly kultivovány při 38,5–39 °C a 5 % CO<sub>2</sub> v kultivačních čtyřjamkových NUNC petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) s 1ml modifikovaného média M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Velká Británie) obsahující hydrogenuhličitan sodný (0,039 ml na 1 ml média, Sigma Aldrich, Německo), laktát sodný (0,6 mg/ml, Sigma Aldrich, Německo), pyruvát sodný (0,25 mg/ml, Sigma Aldrich, Německo), gentamicin sulfát (0,025 mg/ml, Sigma Aldrich, Německo), HEPES (1,5 mg/ml, Sigma Aldrich, Německo) s přísadkou PG 600 (Intervet, Boxmeer, Holandsko). V jedné jamce bylo kultivováno maximálně 60 COC.

COC byly kultivovány 48 hodin do stádia MII. Poté byly získány kumulární buňky pomocí opakovaným nasáváním COC do tenkostěné pipety.

### **4.3 Kultivace kumulárních buněk**

Kumulární buňky získané z COC byly následně kultivovány po dobu 2, 4, 7 a 16 dní při teplotě 38,5–39 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>.

Skupina buněk kultivovaná v konvenčním 2D systému v modifikovaném médiu M199 v NUNC petriho miskách byla kontrolní skupinou (2D). Pokusná skupina kumulárních buněk (3D) byla kultivována v médiu s 0,7% hydrogelem GrowDex (UPM, Biochemicals, Finsko).

Buňky ve 2D i 3D skupině byly každé dva dny přeneseny do nového média.

### **4.4 Imunocytochemické stanovení exprese BAX a Bcl-2**

Po skončení kultivace byly kumulární buňky opláchnuty ve fosfátovém pufru (PBS, Sigma Aldrich, Německo) a fixovány v 2,5 % (w/v) paraformaldehydu v PBS při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Fixované buňky byly až do dalšího zpracování uchovávány ve 4°C.

Plazmatická membrána kumulárních buněk byla permeabilizována 0,5 % (w/v) Tritonem X v PBS s 0,01 % sérovým bovinním albuminem (BSA, Sigma Aldrich, Německo).

Po opláchnutí v PBS s 0,1 % (w/v) Tween 20 byly buňky inkubovány s primární protilátkou králičí anti-BAX nebo anti-Bcl-2 (Termofisher, Německo), ředěnou v poměru 1:100 v roztoku 0,1 % (w/v) BSA a 0,1 % (w/v) Tween 20 v PBS. Inkubace probíhala po dobu 14-16 hodin ve vlhké komůrce při teplotě 4 ° C.

Po inkubaci byly kumulární buňky 3x opláchnuty v PBS s 0,1 % (w/v) Tween 20 a následně inkubovány se sekundární protilátkou anti-králičí IgG konjugovaným s fluoresceinisothiokyanátem (FITC; Termofisher, Německo) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly buňky opět opláchnuty v PBS s 0,1 % (w/v) Tween 20.

Kumulární buňky byly poté montovány na podložní sklíčka do montovacího média Vectashield s 4', 6 – diamidino-2-fenylyndolu (DAPI; Vector Laboratories, Inc.) pro obarvení chromatinu.

V každém experimentu byla barvena také kontrolní skupina, ve které byly buňky inkubovány místo primární protilátky pouze v roztoku v roztoku 0,1 % (w/v) BSA a 0,1 %

(w/v) Tween 20 v PBS. Ostatní kroky včetně inkubace se sekundární protilátkou probíhaly shodně jako pokusných skupin.

Kumulární buňky byly snímány pomocí konfokálního mikroskopu (Zeiss, Německo) při vlnové délce světla 350 nm (DAPI) a 500 nm (FITC).

Snímky byly vyhodnoceny v softwaru NIS Elements AR Software (NIKON, Japonsko).

Specifita vazby použitých protilátek byla ověřena pomocí metody Western blott. Protilátky se vážaly na proteiny o molekulové hmotnosti cca 25-26 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti BAX a BCL-2. Tato stanovení nesou součástí výsledků.

#### **4.5 Statistické vyhodnocení**

Expresí proteinů byla vyjádřena jako střední intenzita signálu FITC fluorescence, snižená o střední intenzitu signálu kontrolní skupiny, inkubované bez primární protilátky. Z naměřených hodnot byly vypočítány průměrné hodnoty a ty byly vztaženy k průměrné hodnotě skupiny, která nebyla kultivovaná (0 hod). Střední intenzita signálu byla vyjádřena jako relativní. Experimenty byly 3x zopakovány.

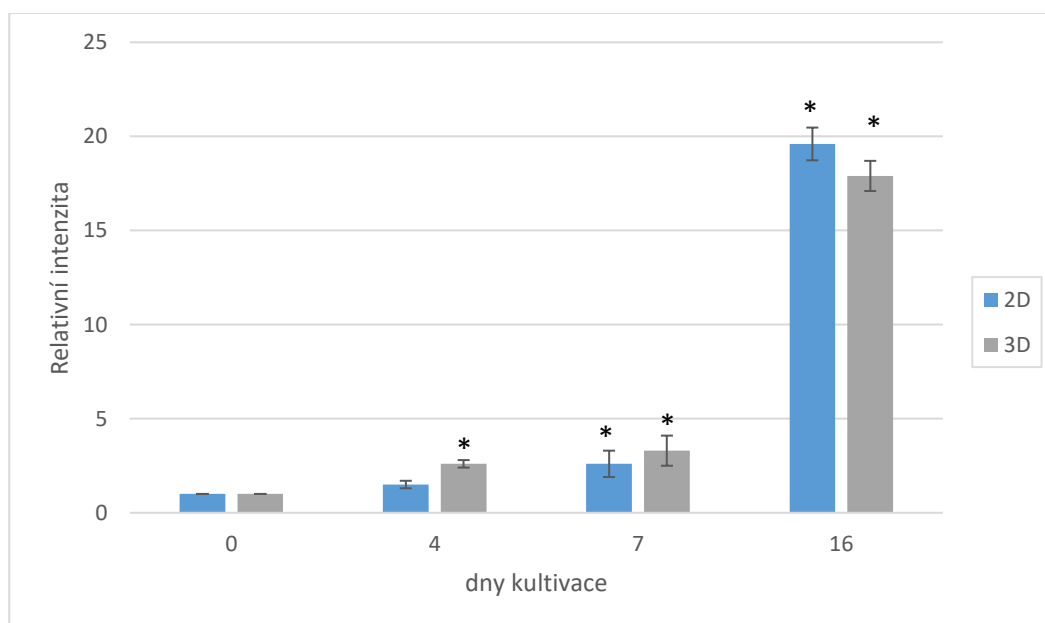
Data ze všech experimentů byla vyhodnocena pomocí statistické analýzy, která byla provedena pomocí t-testu a jednofaktorové analýzy rozptylu (Microsoft Excel) Signifikantní rozdíly byly stanoveny při hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky

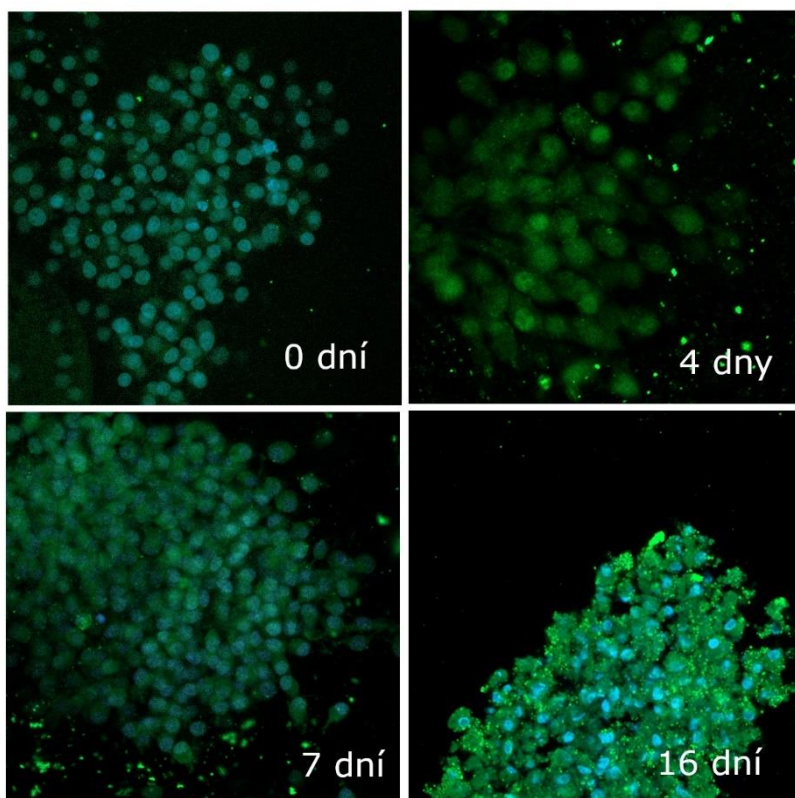
Prasečí kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány 48 hodin do stádia MII a následně byly kumulární buňky kultivovány po dobu 0, 2, 4, 7 a 16 dní. Kontrolní skupina byla kultivována v konvenčním 2D kultivačním systému a pokusná skupina v 3D kultivačním systému s GrowDex. Po skončení kultivace byly v kumulárních buňkách stanoveny pro-apoptotický faktor BAX a anti-apoptotický faktor BCL-2. Oba faktory byly v kumulárních buňkách přítomny.

### Pro-apoptotický faktor BAX

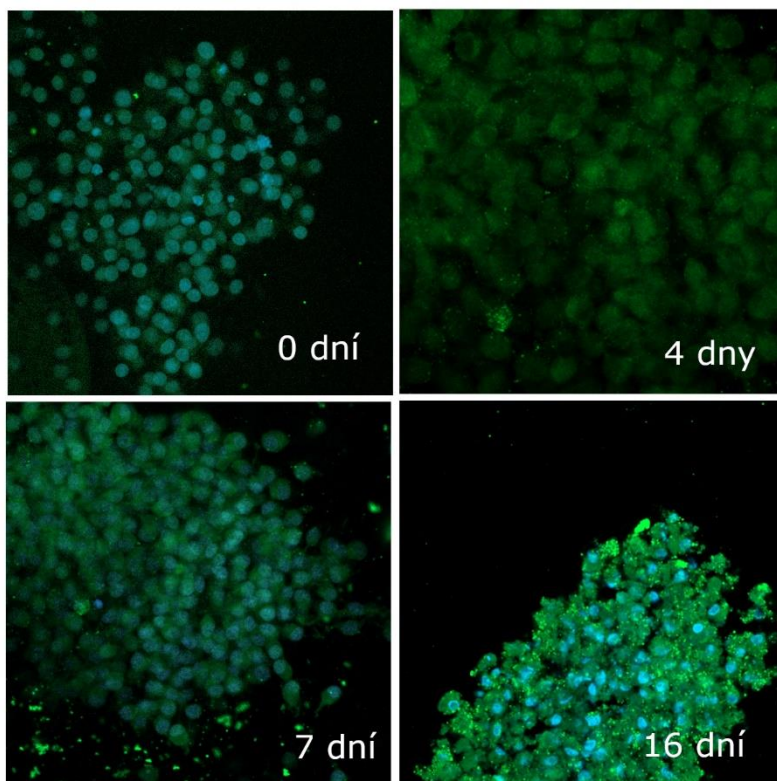
Během kultivace se množství proteinu v kumulárních buňkách zvyšovalo. Signifikantní zvýšení intenzity signálu oproti kontrolní skupině, která nebyla kultivována (0 dní), bylo zjištěno ve skupinách kultivovaných 7 a 16 dní, a to v obou kultivačních systémech a ve skupině kultivované po dobu 4 dní ve 3D systému s GrowDex. Rozdíly v expresi BAX mezi 2D kultivačním systémem (Obr.6) a 3D systémem (Obr. 7) nebyly signifikantní. Relativní průměrná intenzita signálu v průběhu kultivace vztažená ke průměrné intenzitě signálu nekultivovaných buněk spolu se směrodatnými odchylkami je v Grafu 1.



Graf 1: Relativní intenzita signálu pro-apoptotického faktoru BAX v kumulárních buňkách prasete kultivovaných po dobu 0, 4, 7 a 16 dní ve 2D a 3D kultivačním systému *in vitro*. Hodnoty jsou vztaženy k intenzitě signálu kumulárních buněk ze zralých kumulo-oocytárních komplexů (0 hod kultivace). \* Statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu oproti skupině kultivované 0 dní; P=0,05.



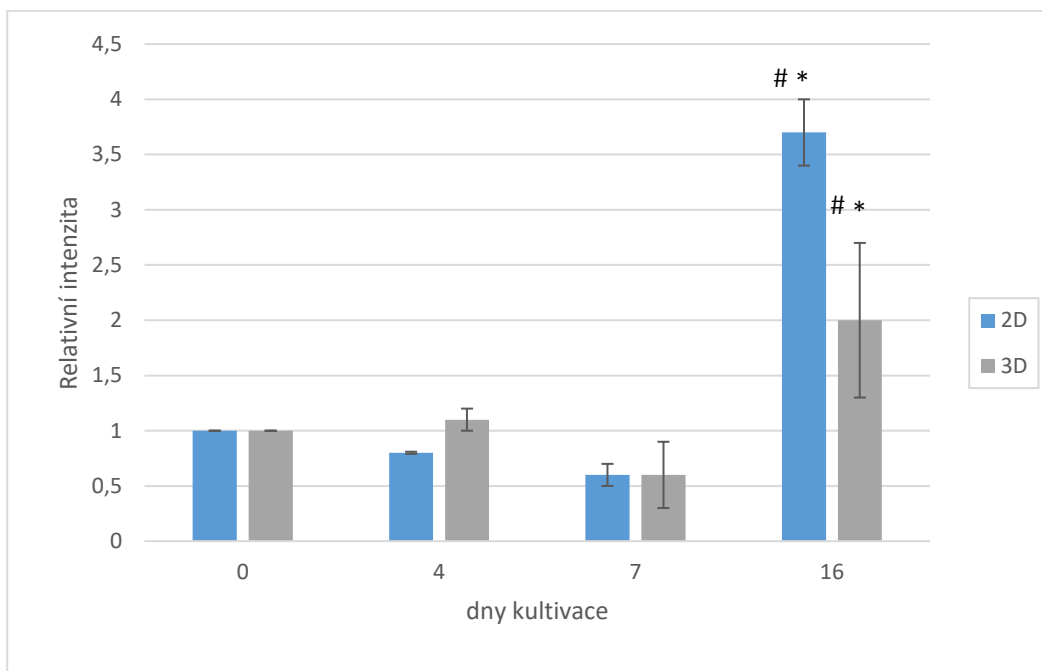
Obr 6: Expres pro-apoptického faktoru BAX v prasečích kumulárních buňkách kultivovaných v konvenčním 2D *in vitro* kultivačním systému stanovená imunocytochemicky. Buňky byly kultivovány po dobu 0, 4, 7 a 16 dní. Zeleně – protein BAX (FITC), modře – chromatin (DAPI). Zvětšení 400x.



Obr 7: Expres pro-apoptického faktoru BAX v prasečích kumulárních buňkách kultivovaných ve 3D *in vitro* kultivačním systému s GrowDex stanovená imunocytochemicky. Buňky byly kultivovány po dobu 0, 4, 7 a 16 dní. Zeleně – protein BAX (FITC), modře – chromatin (DAPI). Zvětšení 400x.

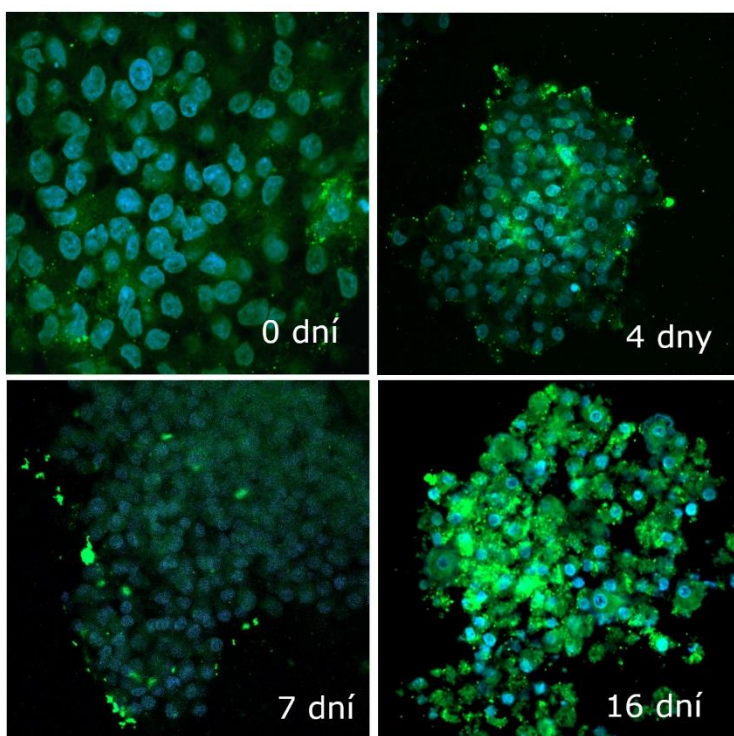
## Anti-apoptický faktor BCL-2

Během kultivace kumulárních buněk nebyly zjištěny signifikantní změny v množství proteinu BCL-2 s výjimkou skupin buněk, které byly kultivovány po dobu 16 dní. Rozdíly v expresi BCL-2 mezi 2D kultivačním systémem (Obr. 8) a 3D systémem s GrowDexem (Obr. 9) nebyly signifikantní. Relativní průměrná intenzita signálu v průběhu kultivace vztažená ke průměrné intenzitě signálu nekultivovaných buněk spolu se směrodatnými odchylkami je uvedena v Grafu 2.

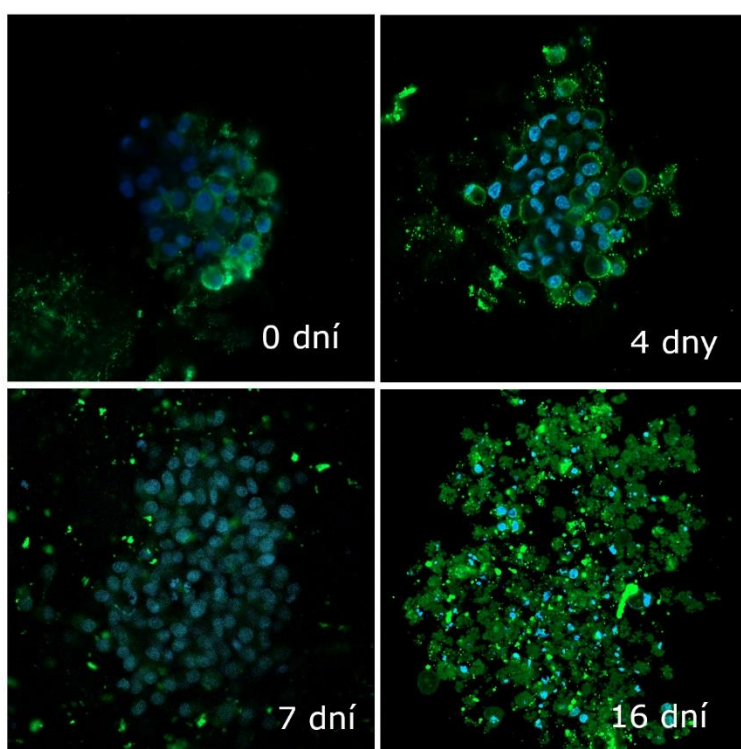


Graf 2: Relativní intenzita signálu anti-apoptického faktoru BCL-2 v kumulárních buňkách prasete kultivovaných po dobu 0, 4, 7 a 16 dní ve 2D a 3D kultivačním systému *in vitro*. Hodnoty jsou vztaženy k intenzitě signálu kumulárních buněk ze zralých kumulo-oocytárních komplexů (0 hod kultivace). \* Statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu oproti skupině kultivované 0 dní; # statisticky významné rozdíly v intenzitě signálu mezi 2D a 3D kultivačním systémem,  $P=0,05$ .





Obr 8: Expres anti-apoptického faktoru BCL-2 v prasečích kumulárních buňkách kultivovaných v konvenčním 2D *in vitro* kultivačním systému stanovená imunocytochemicky. Buňky byly kultivovány po dobu 0, 4, 7 a 16 dní. Zeleně – protein BCL-2 (FITC), modře – chromatin (DAPI). Zvětšení 400x.



Obr 9: Expres anti-apoptického faktoru BCL-2 v prasečích kumulárních buňkách kultivovaných ve 3D *in vitro* kultivačním systému s GrowDex stanovená imunocytochemicky. Buňky byly kultivovány po dobu 0, 4, 7 a 16 dní. Zeleně – protein BCL-2 (FITC), modře – chromatin (DAPI). Zvětšení 400x.

## 6 Diskuze

Cílem experimentů bylo porovnat vliv kultivačních systémů na expresi pro-apoptického faktoru BAX a anti-apoptického faktoru BCL-2 v prasečích kumulárních buňkách kultivovaných v 2D a 3D kultivačním systému. Prasečí kumulo-oocytární komplexy byly kultivovány 48 hodin do stádia MII a následně byly folikulární buňky kultivovány po dobu 4, 7 a 16 dní v konvenčním 2D kultivačním systému a ve 3D kultivačním systému s GrowDex.

Konvenční 2D kultivační systémy jsou široce rozšířené, ale buňky rostoucí v adheované vrstvě postrádají přirozené uspořádání *in vivo* podmínek, což ovlivňuje také jejich morfologii, genovou expresi (Vergani et al. 2004), díky narušení gap junction spojů i komunikaci (Debnath & Brugge 2005) a další buněčné funkce (Mahmud et al. 2009; Kilian et al. 2010) včetně apoptózy (Weaver et al. 2002). Naproti tomu experimenty s kultivací buněk ve 3D kultivačním systému prokázaly pozitivní efekt těchto systémů na proliferaci, diferenciaci a viabilitu buněk (Baker & Chen 2012; Gauvin et al. 2012; Bonnier et al. 2015), protože tyto systémy lépe imitují přirozené prostředí buněk a díky tomu předchází problémům generovaných 2D kultivačními systémy.

V dostupné literatuře nebyly nalezeny údaje o kultivaci prasečích kumulo-oocytárních komplexů v 3D systému využívající hydrogel GrowDex. Proto bylo prvním krokem porovnat průběh meiotického zrání kumulo-oocytárních komplexů v konvenčním kultivačním systému a v systému s GrowDex. Výsledky (nejsou součástí této práce) ukázaly, že jsou oba systémy srovnatelné. V rámci experimentů této práce byla proto srovnána exprese apoptotických faktorů BAX a Bcl-2 v prasečích kumulárních buňkách, které byly dále kultivovány po skončení meiotického zrání oocytů. Nepodařilo se nám prokázat hypotézu, že v 3D kultivačním systému bude oproti konvenčnímu systému nižší exprese pro-apoptického faktoru BAX a vyšší exprese anti-apoptického faktoru BCL-2.

Kumulární buňky prasete byly zvoleny k experimentům jako model, který poskytuje poznatky využitelné v humánní oblasti, protože mohou odrážet vývojový potenciál embrya (Corn et al., 2005) a počet apoptotických buněk a exprese apoptotických faktorů koreluje s kvalitou oocytů a úspěšnosti IVF což je významné zejména v asistované reprodukci (Host et al., 2000; Filali et al., 2009).

Oba dva zvolené faktory BAX a BCL-2 patří do rodiny faktorů BCL, které ovlivňují uvolňování cytochromu C z mitochondrií a mitochondriální membrány, a tak spouští vnitřní apoptotickou dráhu (Hata et al. 2015; Chipuk et al. 2010; Czabotar et al. 2014). Výsledky našich experimentů ukázaly, že se exprese během kultivace kumulárních buněk zvyšovala u obou

faktorů. Tento fakt může být dán tím, že mechanismus antiapoptotického účinku Bcl-2 spočívá v interakci s proapoptickým faktorem BAX. Vzniklé heterodimeru Bcl-2/BAX, brání tvorbě homologního dimeru BAX/BAX (Barnum & O'Connell, 2014) a tím i spuštění apoptotické dráhy (Whittaker et al. 2017). K podobným závěrům došel ve svých studiích i Zhang et al. (2004) který uvádí, že je interakce BAX / Bcl-2 v buňce upřednostňována. Zvýšená exprese BAX pak nutně nemusí znamenat buněčnou smrt, což může být případ zvýšené exprese obou proteinů v kultivovaných prasečích buňkách. To zároveň znamená, že i když se naše hypotéza nepotvrdila, nelze na základě našich výsledků vyvodit závěr, že 3D kultivační systém s GrowDex nepřináší žádný profit při kultivaci kumulárních buněk. Oba dva systémy se jeví jako srovnatelné, ale bylo by žádoucí zaměřit se také na markery proliferace a viability buněk, které také významně odráží kondici buněk kultivovaných v *in vitro* systémech.

## 7 Závěr

I když se nepodařilo prokázat pomocí exprese pro-apoptotického faktoru BAX a anti-apoptotického faktoru BCL-2 v prasečích kumulárních buňkách rozdíl mezi 2D a 3D kultivačním systémem, neznamená to, že je možné rezignovat na možnost využívat 3D kultivační systémy, které dokáží lépe simulovat podmínky v živém organismu a nenarušují morfologii a fyziologii buněk tak jako konvenční 2D systémy.

Technologie 3D kultivačních systémů se již ukázaly jako důležitý nástroj, který může usnadnit výzkum v biomedicínské oblasti s realističtějšími výsledky. Metody 3D kultury však musí překonat mnoho problémů. Metodiky je třeba v první řadě standardizovat, protože metoda 3D buněčné kultury je obtížnější a složitější než metoda 2D buněčné kultury a má tedy nízkou reprodukovatelnost a vyžaduje vysokou úroveň dovedností. Očekává se tedy, že technologie 3D buněčné kultury významně přispěje k budoucímu výzkumu. K tomu lze s úspěchem využívat prasečí oocyty a kumulární buňky, protože prase je cenné jako modelové zvíře pro humání obast. Tímto směrem by bylo vhodné orientovat i další výzkumné aktivity.

## 8 Literatura

Abbott AL, Ducibella T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience* **6**:D792–D806.

Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. 2001. Effect of incubation temperature on in vitro maturation of porcine oocytes: nuclear maturation, fertilisation and developmental competence. *Zygote* **9**:331-337.

Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322–1326.

Adams RLP. 1990. *Cell Culture for Biochemists*. Elsevier, Amsterdam; New York.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. 2002. Caspase Cascades in Apoptosis. Caspases-their role in cell death and cell survival. Ed. Marek Los and Henning Walczak. *Molecular Biology Intelligence Unit 24*. New York: New York.

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2005 Oxidative stress and its implications in female infertility-a clinician's perspective. *Reproductive BioMedicine Online* **11**:641–650.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003 Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* **79**:829–843.

Alberts, B. 1998c. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem.

Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**:427–445.

Alofi AA, Alhimaidi AR. 2004. In vitro maturation (IVM) and fertilization (IVF) of sheep ova cultured in two different media. *Journal of King Saud University* **16**:15–24.

Amer HA, Hegab AO, Zaabal SM. 2008. Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, in vitro maturation, and steroid hormone production in buffaloes. *Animal of Reproduction* **5**:55-62.

Amsden B, Turner N. 1999. Diffusion characteristics of calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering* **65**:605-610.

Andersen T, Strand B, Formo K, Alsberg E, Christensen B. 2012. Alginates as biomaterials in tissue engineering. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **37**:227-258.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. 2015. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:5517–5527.

Austin CR. 1956. Cortical granules in hamster eggs. *Experimental Cell Research* **10**:533–540.

Avella MA, Baibakov B, Dean J. 2014. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *Journal of Cell Biology* **205**:801–809.

Baeva LF, Lyle DB, Rios M, Langone J J, Lightfoote M M. 2014. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1beta production. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* **102**:305–314.

Baker BM, Chen CS. 2012. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science* **125**:3015–3024.

Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thomson JG. 2007. Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. *Human Reproduction* **22**:2768-2775.

Barnum KJ, O’Connell MJ. 2014. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology* **1170**:29–40.

Benda V, Babůrek I, Kotrba P. 2005. *Základy biologie*. VŠCHT, Praha.

Bennabi I, Terret ME, Verlhac MH. 2016. Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *Journal of Cell Biology* **215**:611–619.

Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**:215–224.

Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova, Varmuža S, Latham KE, Vady JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2 deficient mice. *Genes & Development* **12**:1304–1314.

Berkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD. 2006. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochemistry and Cell Biology* **126**:583–592.

Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adan A. 2010. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reproductive Biomedicine Online* **20**:341-349.

Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. 1996. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **10**:1471–1484.

Bissell MJ, Rizki A, Mian IS. 2003. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology* **15**:753–762.

Bolamba D, Sirard MA. 2000. Ovulation and follicular growth in gonadotropin-treated gilts followed by in vitro fertilization and development of their oocytes. *Theriogenology* **53**:1421-1437.

Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A, Blanco A, Byrne HJ. 2015. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro* **29**:124–131.

Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal* **134**:707-716.

Bukowska D, Kempisty B, Ciesiolka S, Piotrowska H, Antosik P, Wozna M, Porowski S, Ociepa E, Maryniak H, Jaskowski JM, Bryja A., Nowicki. M. 2013. Molecular aspects of cytoplasmic and nuclear maturation of pig oocytes. *Medycyna Weterynaryjna* **69**:456-460.

Burdick JA, Prestwich GD. 2011. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* **23**:H41–H56.

Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M, Dean, J. 2012. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology* **197**:37–44.

Castro EPLA, Hansen PJ. 2007. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* **68**:763-770.

Cawkill D, Eaglestone SS. 2007. Evolution of cell-based reagent provision. *Drug Discovery Today* **12**:820–825.

Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner T. 2005. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertility and Sterility* **84**:627–633.

Cran DG, Moor RM. 1990. Programming the oocyte for fertilization. *Fertilization in Mammals*. Serono Symposia, Norwell, MA.

Cunningham JG, Klein BG. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology*. Saunders, Filadelfie.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**:49–63.

Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, Duby RT. 1996. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **45**:521–534.

Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. 2001. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* **15**:1022–1032.

Debnath J, Brugge JS. 2005. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews. Cancer* **5**:675–688.

Desai N, AbdelHafez F, Ali MY, Sayed EH, Abu-Alhassan AM, Falcone T, Goldfarb J. 2011. Mouse ovarian follicle cryopreservation using vitrification or slow programmed cooling: Assessment of in vitro development, maturation, ultra-structure and meiotic spindle organization. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **37**:1–12.

Dumollard R, Duchen M, Sardet C. 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**:314-323.

Earle W. 1943. Production of Malignancy In Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. *Journal of the National Cancer Institute* **4**:165-169.

Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* **12**:207-218.

Eng LA, Kornegay ET, Huntingdon J, Wellman T. 1986. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **76**:657–762.

Erickson GF, Hofeditz C, Hsueh AJW. 1983. GnRH stimulates meiotic maturation in preantral follicles of hypophysectomized rats. In *Factors Regulating Ovarian Function*. Raven Press New York.

Fair T, Hyttel P, Greve T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation in diameter to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development* **42**:437-442.

Feng G, Shi D, Yang S, Wang X. 2013. Co-culture embedded in cumulus clumps promotes maturation of denuded oocytes and reconstructs gap junctions between oocytes and cumulus cells. *Zygote* **21**:231–237.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**:836–848.



Filali M, N Frydman, Mp Belot, L Hesters, F Gaudin, G. Tachdjian, D Emilie, R Frydman, V Machelon. 2009. Oocyte in-vitro maturation: BCL2 mRNA content in cumulus cells reflects oocyte competency. *Reproductive BioMedicine* **19**:4.

Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:2225–2233.

Frieboes HB, Zheng, Sun C, Tromberg B, Gatenby R, Cristini V. 2006. An integrated computational/experimental model of tumor invasion. *Cancer Research* **66**:1597–1604.

Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology* **83**:849–871.

Fritz MA, Speroff L. 2011. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M. 1977. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record* **188**:315-330.

Fujimoto T, Ukeshima A, Miyayama Y, Kuwana T, Yoshinaga K, Nakamura, M. 1989. The primordial germ cells in amniotes: their migration in vivo and behavior in vitro. *Progress in clinical and biological research* **296**:13-21.

Funahashi H, Cantley T, Stumpf TT, Terlouw SL, Rieke A, Day BN. 1994b. In vitro development of in vitro-matured pig oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biology of Reproduction* **50**:1072-1077.

Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL, Cantley T, Rieke A, Day BN. 1994a. Developmental ability of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **41**:1425-1433.

Furger C, Cronier L, Poirot C, Pouchelet M. 1996 Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Molecular Human Reproduction* **2**:541–548.

Gauvin R, Chen YC, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, Bae H, Chen S, Khademhosseini A. 2012. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* **33**:3824–3834.

Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, Reschner A. 2005. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology* **204**:522–531.

Glowacki J, Mizuno S. 2008. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* **89**:338–344.

Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CABI Publishing, Wallingford.

Gosden RG, Bownes M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145**:27-37.

Goubko CA, Basak A, Majumdar S, Cao X. 2014. Dynamic cell patterning of photoresponsive hyaluronic acid hydrogels. *Journal Of Biomedical Materials Research. Part A* **102**:381–391.

Gulyas BJ. 1980. Cortical granules of mammalian eggs. *International Review of Cytology* **63**:357–392.

Gumus E, Bulut HE, Kaloglu C. 2010. Cytoskeletal changes in oocytes and early embryos during in vitro fertilization process in mice. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **39**:51–58.

Hadi T, Hammer MA, Algire C, Richards T, Baltz JM. 2005. Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2 cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females. *Biology of Reproduction* **72**:179–187.

Hadwin TP. 1992. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, New York.

Halliwell B, Aruoma OI. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies letters* **281**:9–19.

Halliwell B, Chirico S. 1993 Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition* **57**:715-724.

Hammon DS, Wang S, Holyoak GR, Knight–Sherod J, Evans RC. 1999. Effects of high ammonia concentrations during IVMon oocyte maturation and in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* **51**:375.

Han ZB, Lan CG, Wu YG, Han D, Feng WG, Wang JZ, Tan JH. 2006. Interactive effect of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complexes morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction* **132**:749–758.

Hashimoto S, Minami N, Takakura R. 2000. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development* **57**:353-360.

Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1998. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **49**:1451–1463.

Hashimoto S. 2009. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *Journal of Reproduction and Development* **55**:1-10.

Hata AN, Engelman JA, Faber AC. 2015. The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer Discovery* **5**:475–487.

Hay-Schmidt A. 1993. The influence of osmolality on mouse two-cell development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **10**:95–98.

Hewitt DA, England GC. 1998. The effect of oocyte size in bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* **49**:957-966.

Heywood HK, Sembi PK, Lee DA, Bader DL. 2004. Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs. *Tissue Engineering* **10**:1467–1479.

Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, van der Kuip H. 2014. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnology Journal* **9**:1115–1128.

Hirao Y, Shimizu M, Iga K, Takenouchi N. 2012. Optimization of oxygen concentration for growing bovine oocytes in vitro: constant low and high oxygen concentrations compromise the yield of fully grown oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **58**:204-211.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer S J. 1993 Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**:241–251.

Host E, Mikkelsen AI, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. 2000. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **79**:936–940.

Hunter MG. 2000 Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **5**:122–130.

Chaube SK, Dubey PK, Mishra SK, Shrivastav TG. 2007. Verapamil inhibits spontaneous parthenogenetic activation in aged rat eggs cultured in vitro. *Cloning Stem Cells* **9**:608–617.

Chaube SK, Khatun S, Misra SK, Shrivastav TG. 2008. Calcium ionophore-induced egg activation and apoptosis are associated with the generation of intracellular hydrogen peroxide. *Free Radical Research* **42**:212–220.

Chaube SK, Shrivastav TG, Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AK. 2014. Neem leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. *SpringerPlus* **3**:464–468.

Chaube SK, Tripathi A, Khatun S, Mishra SK, Prasad PV, Shrivastav TG. 2009. Extracellular calcium protects against verapamil-induced metaphase-II arrest and initiation of apoptosis in aged rat eggs. *Cell Biology International* **33**:337–343.

Chen L, Russell PT, Larsen WJ. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: role for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development* **34**:87–93.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX – and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* **8**:705-711.

Chiamenti A, Aguiar Filho CR, Freitas Neto LM, Chaves RM, Paula-Lopes FF, Lima PF, Gonçalves PB, Cavalcanti Neto CC, Oliveira MAL. 2010. Effects of retinoids on the in vitro development of *Capra hircus* embryos to blastocysts in two different culture systems. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:e68-e72.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. 2010. The BCL-2 family reunion. *Molecular Cell* **37**:299–310.

Chiquoine D. 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical Record* **118**:135-146.

Ikeda S, Yamada M. 2014. Midkine and cytoplasmic maturation of mammalian oocytes in the context of ovarian follicle physiology. *British Journal of Pharmacology* **171**:827–836.

Itoh N, Nagata S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:10932-10937.

Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy* **4**:139-163.

Jones RE, Lopez KH. 2013. *Human reproductive biology*. Elsevier/Academic Press, Boston.

Jongpaiboonkit L, King WJ, Lyons GE, Paguirigan AL, Warrick JW, Beebe DJ, Murphy WL. 2008. An adaptable hydrogel array format for 3–dimensional cell culture and analysis. *Biomaterials* **29**:3346–3356.

Kanayama N, Miyano T, Lee J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote* **10**:261-270.

Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski L, Lamperska K. 2016. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* **14**:910–919.

Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**:316–323.

Kerr JFR, Harmon BV. 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, edited by Tomei LD and Cope FO. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991, p. 321.

Khanna P. 2010. *Cell and Molecular Biology*. I K International Publishing House, New Delhi.

Khanna P. 2013. *Essentials of Genetics*. I K International Publishing House, New Delhi.

Kharche SD, Goel AK, Jindal SK, Sinha NK. 2006. In vitro maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. *Small Ruminant Research* **64**:186-189.

Kidder GM, Mhawi AA. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* **123**:613–620.

Kilian K, Bugarija B, Lahn BT, Mrksich M. 2007. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:4872–4877.

Kim KS, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K. 1996. The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* **45**:787-799.

Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* **66**:707–717.

Knight E, Przyborski S. 2015. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy* **227**:746–756.

Knobil E, Neil JD. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

Kong HJ, Boonthekul T, Mooney DJ. 2006. Quantifying the relation between adhesion ligandreceptor bond formation and cell phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:18534–18539.

Krisher RL, Bavister BD. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* **49**:103-114.

Krisher RL. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* **82**:E14–E23.

Kubelka M, Motlík J, Schultz RM, Pavlok A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction* **62**:292-302.

Kyogoku H, Kitajima TS, Miyano T. 2014. Nucleolus precursor body (NPB): a distinct structure in mammalian oocytes and zygotes. *Nucleus* **5**:493-498.

Landim-Alvarenga FC, Maziero RRD. 2014. Control of oocyte maturation. *Animal Reproduction* **11**:150-158.

Landim-Alvarenga FC. 1999. Produção in vitro de embriões equinos: avanços e limitações. *Semana Acadêmica da Faculdade de Veterinária* **27**:54-89.

Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*. **14**:61-86.

Lee JH, Hyun SH, Lee ES. 2012. A comparative study on the parthenogenetic development of pig oocytes cultured in north carolina state university-23 and porcine zygote medium-3. *Journal of Embryo Transfer* **27**:121-126.

Leist M, Jäättelä M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**:589-598.

Letai, A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**:183-192.

Li J, Huan Y, Xie B, Wang J, Zhao Y, Jiao M, Huang T, Kong Q, Liu Z. 2014. Identification and characterization of an oocyte factor required for sperm decondensation in pig. *Reproduction* **148**:367-375.

Liu M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive biology and endocrinology* **9**:149.

Liu RH, Li YH, Jiao LH, Wang XN, Wang H, Wang WH. 2002. Extracellular and intracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different sizes of follicles. *Zygote* **10**:253-260.

Lonergan P, Fair T. 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences* **4**:255-268.

Luca X, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* **58**:871-885.

- Lucas X, Martínez EA, Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* **58**:871-885.
- Luciano AM, Sirard MA. 2018. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biology of Reproduction* **98**:162–169.
- Ly D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. 2017. Three-dimensional cell culture: a powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters* **14**:6999–7010.
- Mahmud G, Campbell CJ, Bishop KJM, Komarova YA, Chaga O, Soh S, Huda S, Kandere-Grzybowska K, Grzybowski BA. 2009. Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature Physics* **5**:606–612.
- Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. 2003. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer–stromal cell interactions. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* **201**:221-228.
- Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling. *The Journal of Cell Biology* **140**:1485-1495.
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. 2014. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive Biomedicine Online* **28**:284–299.
- Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and development competence of porcine oocytes. *Theriogenology* **57**:1523-1532.
- Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T, Maehashi H, Ishii Y, Eda H, Aoki K, Iida Y, Morikawa T, Ohkawa K. 2011. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF $\beta$  stimulation. *International Journal of Oncology* **39**:1327–1336.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* **31**:1201-1207.
- Mazia D. 1961. Mitosis and physiology of cell division. In *The Cell* **3**:77–412.
- Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* **170**:607-615.

Meyers J, Craig J, Odde DJ. 2003. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Current Biology* **16**:1685–1693.

Miller GF, Rorie RW. 2000. Effect of oxygen concentration during oocyte maturation on subsequent bovine embryo cleavage and development in vitro. *Research Series – Arkansas Agricultural Experiment Station* **478**:43-44.

Mintz B, Russell ES. 1957. Gene-induced Embryological Modifications of Primordial Germ Cells in the Mouse. *The Journal of Experimental Zoology* **134**:207-137.

Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K. 1995. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **103**:27–32.

Miyoshi K, Funahashi H, Okuda K, Niwa K. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity. *Journal of Reproduction and Fertility* **100**:21–26.

Miyoshi K, Mizobe Y. 2014. Osmolarity – and stage-dependent effects of glycine on parthenogenetic development of pig oocytes. *The Journal of Reproduction and Development* **60**:349-354.

Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. 2002. Utility of Rapidly Matured Oocytes as Recipients for Production of Cloned Embryos from Somatic Cells in the Pig. *Biology of Reproduction* **67**:540-545.

Moor RM, Trounson AO. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *Journal of Reproduction and Fertility* **49**:101-109.

Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J. 2002. Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefeldin A. *Biology of Reproduction* **66**:1259-1266.

Morgan JF, Morton HJ, Parker RC. 1950. The Nutrition of Animal Cells in Tissue Culture. I. Initial Studies on a Synthetic Medium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **73**:1-8.

Motlik J, Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* **25**:87–96.

Motlík J, Crozet N, Fulka J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility* **72**:323-328.



Mseka T, Bamburg JR, Cramer LP. 2007. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *Journal of Cell Science* **120**:4332–4344.

Mtango NR, Potireddy S, Latham KE. 2008. Oocyte quality and maternal control of development. *International Review of Cell and Molecular Biology* **268**:223-290.

Nelson CM, Bissell MJ. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**:287–330.

Nelson D, Cox M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman and Company, New York.

Orgel J P, Persikov AV, Antipova O. 2014. Variation in the helical structure of native collagen. *Public Library of Science One* **9**:e89519.

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**:72–81.

Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* **42**:437-442.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:839–845.

Pampaloni F, Stelzer EHK. 2009. Three-Dimensional Cell Cultures in Toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **26**:117-138.

Pathak A, Kumar S. 2011. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences From Nano to Macro* **3**:267–278.

Petersen OW, Rønnev-Jessen L, Howlett AR, Bissel MJ. 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:9064–9068.

Petters RM, Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **48**:61-73.

Petzelt C. 1979. Biochemistry of the mitotic spindle. *International Review of Cytology* **60**:53–85.

Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145**:30–38.

Pincus G, Enzmann EV. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: i. the activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine* **62**:665-675.

Pinyopummintr T, Bavister BD. 1995. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* **44**:471-477.

Plancha CE, Carmo-Fonseca M, David-Ferreira JF. 1989. Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos. *Differentiation* **42**:1-9.

Plancha CE. 1996. Cytokeratin dynamics during oocyte maturation in the hamster requires reaching of metaphase I. *Differentiation* **60**:87–98.

Powers MJ, Janigian DM, Wack KE, Baker CS, Beer Stolz D, Griffith LG. 2002. Functional behavior of primary rat liver cells in a three-dimensional perfused microarray bioreactor. *Tissue Engineering* **8**:499–513.

Prasad S, Premkumar KV, Koch B. 2014. Abortive spontaneous egg activation: a pathological condition in mammalian egg. *ISSRF News Lett.*

Premkumar KV, Chaube SK. 2013. An insufficient increase of cytosolic free calcium level results postovulatory aging-induced abortive spontaneous egg activation in rat. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **30**:117–123.

Premkumar KV, Chaube SK. 2014. RyR channel-mediated increase of cytosolic free calcium level signals cyclin B1 degradation during abortive spontaneous egg activation in rat. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* **50**:640–647.

Przyborski S. 2011. 3D cell culture developments in technology to improve in vitro analyses. *Drug Discovery World* **12**:67-72.

Pyoos GM, Maqhashu AM, Scholtz MM, Nedambale TL. 2018. The comparison of three media on the in vitro maturation rate of pig oocytes. *South African Journal of Animal Science* **48**:1027.

Quetglas MD, Adona PR, de Bem THC, Pires PRL, Leal CLV. 2010. Effect of cyclin-dependent Kinase (CDK) inhibition on expression, localization and activity of maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:1074-1081.

Quinn, P. 2014. *Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA. 2005. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophysical Journal* **89**:1374–1388.
- Ravindranatha BM, Nandi S, Gupta P, Sarma PV. 2001. Comparison of three different media on maturation of buffalo oocytes in vitro. *The Indian Journal of a Animal Sciences* **71**:841-843.
- Reyes JM, Ross PJ. 2016. Cytoplasmic polyadenylation in mammalian oocyte maturation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **7**:71–89.
- Richter C. 1995. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **27**:647-653.
- Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:29803–29809.
- Ryan S-L, Baird A-M, Vaz G, Urquhart AJ, Senge M, Richard DJ, O'Byrne KJ, Davies AM. 2016. Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture. *Assay and Drug Development Technologies* **14**:19–28.
- Rybska M, Knap S, Jankowski M, Jeseta M, Bukowska D, Antosik P, Nowicki M, Zabel M, Kempisty B, Jaśkowski JM. 2018. Cytoplasmic and nuclear maturation of oocytes in mammals – living in the shadow of cells developmental capability. *Medical Journal of Cell Biology* **6**:13-17.
- Rytomaa M, Martins LM, Downward J. 1999. Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Current Biology* **9**:1043–1046.
- Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, DUBY RT. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biology of Reproduction* **64**:1761–1768.
- Samali A, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. 1998. Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **431**:167-170.
- Sanchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1822**:1896–1912.
- Santiquet NW, Develle Y, Laroche A, Robert C, Richard FJ. 2012. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biology of Reproduction* **87**:46.

Santonocito M, Guglielmino MR, Vento M, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Casciano I, Scollo P, Romani M, Tatone C, Purrello M, Di Pietro C. 2013. The apoptotic transcriptome of the human MII oocyte: characterization and age-related changes. *Apoptosis* **18**:201–211.

Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* **275**:983–986.

Semino CE, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. 2003. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* **71**:262–270.

Schatten G. 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Developmental Biology* **165**:299-335.

Schatten H, Sun QY. 2015. Centrosome and microtubule functions and dysfunctions in meiosis: Implications for age-related infertility and developmental disorders. *Reproduction, Fertility and Development* **27**:934–943.

Schramm RD, Tennier MT, Boatman DE, Bavister BD. 1993. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in unstimulated rhesus monkey. *Biology of Reproduction* **48**:349-356.

Sinclair KD, Kuran M, Staines ME, Aubailly S, Mackie K, Robinson JJ, Webb R, McEvoy TG. 2000a. In vitro blastocyst production following exposure of heifers to excess rumen degradable nitrogen during either the preantral or antral stages of follicular growth. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **25**:41.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**:126–136.

Smidsrod O, Skjakbraek G. 1990. Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Trends in Biotechnology* **8**:71-78

Smith GD, Takayama S. 2017. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction* **23**:257-268.

Sorensen RA, Wassarman PM. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* **50**:531-536.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovicová P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and

Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. *Biology of Reproduction* **64**:904-909.

Stroh C, Schulze-Osthoff K. 1998. Death by a thousand cuts: an everincreasing list of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **5**:997-1000.

Stryer L, Freeman WH. 1988. *Biochemistry*. W.H.Freeman & CO LTD, New York.

Suhaili SH, Karimian H, Stellato M, Lee TH, Aguilar MI. 2017. Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophysical Reviews* **9**:443–457.

Sun QY, Schatten H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* **131**:193–205.

Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Schatten H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* **122**:155-163.

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Effects of in-vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update* **9**:35-48.

Swain JE, Pool TB. 2008. ART failure: Oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction Update* **14**:431–446.

Szollosi D. 1967. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *The Anatomical Record* **159**:431–446.

Takai A, Fako V, Dang H, Forgues M, Yu Z, Budhu A, Wang XW. 2016. Three-dimensional organotypic culture models of human hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports* **6**:21174.

Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, De Kruif A. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* **60**:135–149.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845-853.

Tellado MN, Alvarez GM, Dalvit GC, Cetica PD. 2014. The conditions of ovary storage affect the quality of porcine oocytes. *Advances in Reproductive Sciences* **2**:57-67.

Thomas CH, Collier JH, Sfeir CS, Healy KE. 2002. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:1972–1977.

Tibbitt MW, Anseth KS. 2009. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol Bioeng* **103**:655-663.

Tirone E, Siracusa G, Hascall VC, Frajese G, Salustri A. 1993. Oocytes preserve the ability of mouse cumulus cells in culture to synthesize hyaluronic acid and dermatan sulfate. *Developmental Biology* **160**:405–412.

Topfer D, Ebeling S, Weitzel JM, Spannbrucker AC. 2016. Effect of follicle size on in vitro maturation of pre-pubertal porcine cumulus oocyte complexes. *Reproduction in Domestic Animals* **51**:370-377.

Topman G, Shoham N, Sharabani-Yosef O, Lin FH, Gefen A. 2013. A new technique for studying directional cell migration in a hydrogel-based three-dimensional matrix for tissue engineering model systems. *Micron* **51**:9–12.

Tripathi A, Premkumar KV, Chaube SK. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology* **223**:592–600.

Tripathi A, Premkumar KV, Pandey AN, Khatun S, Mishra SK, Shrivastav TG, Chaube SK. 2011. Melatonin protect against clomiphene citrate-induced generation of free radicals and egg apoptosis in rat. *European Journal of Pharmacology* **667**:419–424.

Tripathi A, Shrivastav TG, Chaube SK. 2012. An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* **3**:27–36.

Tsutsumi M, Fujiwara R, Nishizawa H, Ito M, Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kato T, Fujii T, Kurahashi H. 2014. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. *Public Library of Science One* **9**:e96710.

Van Winkle LJ, Haghghat N, Campione AL. 1990. Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *Journal of Experimental Zoology* **253**:215–219.

Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, et al. 2001 Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosisrelated proteins and transcription factor GATA-4. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**:3421–3429.

Vergani L, Grattarola M, Nicolini C. 2004. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**:1447–1461.

Verlhac MH. 2011. Spindle positioning: going against the actin flow. *Nature Cell Biology* **13**:1183–1185.

Vinci M, Gowan S, Boxall B, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D, Eccles AS. 2012. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology* **10**:29.

Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z. 2000. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**:7124–7129.

Wang Q, Zhao M, Jin Y, Kim N, Cui X. 2013. Gonadotropins improve porcine oocyte maturation and embryo development through regulation of maternal gene expression. *Journal of Embryology Trans* **28**:361-371.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. 2000. Cooling induced spindle disassembly and the recovery after warming in living human eggs. *Biology of Reproduction* **62**:191.

Wang WH, Niwa K, Okuda K. 1991. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa *Journal of Reproduction and Fertility* **93**:491-496.

Wassarman PM. 1988. *The Mammalian ovum. The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York.

Weaver V, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JCR, Giancotti F, Werb Z, Bissell MJ. 2002. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* **2**:205–216.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727–730.

Whittaker SR, Mallinger A, Workman P, Clarke PA. 2017. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* **173**:83–105.

Wu J, Zhang L, Wang X. 2000. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertility and Sterility* **74**:1137–1141.

Xu M, Kreeger P K, Shea L D, Woodruff T K. 2006. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Engineering* **12**:2739-2746.

Yamada K, Cukierman E. 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**:601–610.

Yang Y, Eglen RM. 2017. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *Society for Laboratory Automation and Screening Discovery* **22**:456–472.

Yokoo M, Kimura N, Sato E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development* **56**:15–19.

Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee B C, Lee ES. 2000. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development* **12**:133-139.

Yoshida M, Ishigaki Y, Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **88**:1-8.

Yuan Y, Krisher RL. 2012. In vitro maturation (IVM) of porcine oocytes. *Methods in Molecular Biology* **825**:183–198.

Yuan YQ, Van Soom A, Leroy JL, Dewulf J, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelmanb LJ. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* **63**:2147–2163.

Zhang YS, Khademhosseini A. 2017. Advances in engineering hydrogels. *Science* **356**:e3627.

Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanags DM, Orrenius S. 1997. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **230**:481-488.

Zhivotovsky B, Samali A, Gam A, Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **6**:644–651.

Zschenker O, Streichert T, Hehlhans S, Cordes N. 2012. Genome – wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. *Public Library of Science One* **7**:e34279.



## 9 Seznam použitých zkratk

2D	Dvourozměrný
3D	Trojrozměrný
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosin trifosfát
BSA	Bovinní sérový albumin
BSS	Salinní roztok
CaCl <sub>2</sub>	Chlorid vápenatý
cAMP	Buněčný posel
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
COC	Kumulo-oocytární komplex
DD	Doména smrti
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor
ER	Endoplazmatické retikulum
FSH	Folikulostimulační hormon
GV	Zárodečný váček
GVBD	Rozpad zárodečného váčku
HA	Kyselina hyaluronová
hCG	Humánní choriový gonadotropin
HEPES	Organické chemické pufrovací činidlo
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
IVM	<i>In vitro</i> maturace
LH	Luteinizační hormon
MAP kináza	Mitogen aktivovaná protein kináza
MEM	Minimální Essentiální Médium
MI	Metafáze I
MII	Metafáze II
MPF	Maturaci podporující faktor
mRNA	Messenger Ribonukleová kyselina
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina

NCSU-23	North Carolina State University 23 medium
NCSU-37	North Carolina State University 37 medium
O <sub>2</sub>	Kyslík
PBS	Pufrovaný fyziologický roztok
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Kyselina polyglykolová
PGCs	Primordiální kmenové buňky
PLA	Kyselina polyprolaktónová
PMSG	Koňský choriový gonadotropin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RER	Drsné endoplazmatické retikulum;
RIOD	Relativní optická denzita
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní kyslíkový metabolit
rRNA	Ribozomální Ribonukleová kyselina
SDS	Sodium dodecylsulfát
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza
SER	Hladké endoplazmatické retikulum
TCM	Tkáňové médium pro kultivaci
ZP	Zóna pellucida