

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav chovu a šlechtění zvířat**

---



Agronomická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



**Vliv folikulogeneze na efektivitu *in vitro* fertilizace  
prasečích oocytů**

Disertační práce

*Vedoucí práce:*

prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.

*Vypracoval:*

Ing. Šárka Hanuláková

---

Brno 2016

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci **Vliv folikulogeneze na efektivitu in vitro fertilizace prasečích oocytů** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektu IGA AF TP8/2011, TP1/2012. Experimentální část disertační práce byla vypracována na oddělení Genetiky a reprodukce ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i v Brně, kde byl výzkum podpořen prostřednictvím projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky COST CZ- LD 14104 a projektů Národní agentury pro zemědělský výzkum QJ1510138 a QI101A166.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Ing. Ladislavu Máchalovi, DrSc., za cenné rady a velkou podporu během celého studia. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michalovi Ješetovi, Ph.D., za odborné rady a pomoc při vzniku této disertační práce a v neposlední řadě také Ing. Marii Machatkové, CSc., za cenné připomínky a nápady při kontrole mé práce. Ráda bych také poděkovala všem svým kolegům z Výzkumného veterinárního ústavu v Brně, kteří se velkou měrou podíleli na experimentální části mé práce. Na závěr bych chtěla moc poděkovat celé své rodině a přátelům, bez jejichž podpory, pomoci a trpělivosti by tato práce nevznikla.

## ABSTRAKT

Polyspermická penetrace prasečích oocytů během fertilizace in vitro zůstává stále jedním z hlavních nevyřešených problémů. Správná selekce izolovaných oocytů respektující úroveň folikulogeneze je jednou z cest, jak zefektivnit stávající postupy. Z tohoto důvodu byla tato disertační práce zaměřena na výzkum změn v distribuci kortikálních granul u odlišných subpopulací prasečích oocytů s rozdílnou meiotickou kompetencí v průběhu folikulogeneze. K experimentům byly použity oocyty z malých ( $\leq 5$  mm) a středních (5-9 mm) folikulů izolované z předem vybraných ovárií rozdělených podle příslušné fáze estrálního cyklu. Oocyty byly barveny pomocí specifického lektinu PNA, konjugovaného s fluorescenční sondou fluorescein isothiocyanate. K vizualizaci kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop. Nezralé oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu, vykazovaly statisticky průkazné rozdíly v lokalizaci kortikálních granul v cytoplazmě (Idkg  $1,48 \pm 0,31$  vs. Idkg  $2,22 \pm 0,49$ ). S ohledem na fázi estrálního cyklu bylo zjištěno, že se s jednotlivými fázemi cyklu mění centrální lokalizace kortikálních granul, která se se zvyšující meiotickou kompetencí mění na lokalizaci periferní. Zralé oocyty, s odlišnou meiotickou kompetencí získané z malých a středních folikulů v jednotlivých fázích estrálního cyklu, ukázaly statisticky průkazné rozdíly v počtu kortikálních granul v cytoplazmě ( $73,89 \pm 18,8$  Cgs/ $100 \mu\text{m}^2$  vs.  $59,3 \pm 13,3$  Cgs/ $100 \mu\text{m}^2$ ). Bylo zjištěno, že při procesu zrání in vitro dochází se zvyšující se meiotickou kompetencí oocytů k signifikantnímu úbytku kortikálních granul v korové vrstvě ooplasmu. Bylo také prokázáno, že se oocyty s různou meiotickou kompetencí liší ve schopnosti prodělat normální fertilizaci, a že fertilizace in vitro u oocytů s nižší meiotickou kompetencí je doprovázena vyšším výskytem polyspermicky oplozených oocytů. Nebylo však možné potvrdit, že vyšší výskyt polyspermie je způsoben narušením průběhu kortikální reakce. Předložené výsledky ukázaly, že ve srovnání s ostatními fázemi folikulogeneze se pozdní luteální a časná folikulární fáze jeví jako optimální pro získání oocytů vhodných k maturaci a fertilizaci in vitro.

## ABSTRACT

Polyspermic penetration of pig oocytes during fertilization *in vitro* still remains one of the major unsolved problems. An appropriate selection of isolated oocytes with respect to the level of folliculogenesis is one of the ways to improve current methods. For this reason, this dissertation thesis was focused on research of changes in distribution of cortical granules in different subpopulations of porcine oocytes with different meiotic competence during folliculogenesis. Oocytes from small ( $\leq 5$ mm) and medium (5-9 mm) follicles, collected from selected ovaries divided according to the phase of estral cycle, were used for the experiments. The oocytes were stained with PNA conjugated with fluorescent probe fluorescein isothiocyanate. A laser confocal microscope was used for visualization of the cortical granules. Immature oocytes with different meiotic competence, recovered from small and medium follicles in different phases of estral cycle, showed statistically significant differences in localization of cortical granules in cytoplasm ( $I_{dkg} 1.48 \pm 0.31$  vs.  $I_{dkg} 2.22 \pm 0.49$ ). With regard to the phase of estral cycle, the central localization of cortical granules changes with increasing meiotic competence to peripheral localization. Mature oocytes with different meiotic competence, recovered from small and medium follicles in individual phases of estral cycle, showed statistically significant differences in number of cortical granules in cytoplasm ( $73.89 \pm 18.8$  Cgs/ $100 \mu m^2$  vs.  $59.3 \pm 13.3$  Cgs/ $100 \mu m^2$ ). The experiment revealed a significant decrease of cortical granules in peripheral region of the ooplasm with increasing meiotic competence of oocytes during maturation *in vitro*. It also showed that oocytes with different meiotic competence differ in the ability to undergo normal fertilization and that fertilization *in vitro* in oocytes with lower meiotic competence is associated to higher incidence of polyspermic oocytes. However, disruption during cortical reaction as the cause for higher incidence of polyspermy could not be confirmed. The presented results indicate that in comparison with other phases of folliculogenesis, the late luteal and early follicular phase seem to be optimal for collection of oocytes suitable for maturation and fertilization *in vitro*.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1	Folikulogeneze .....	11
2.2	Oogeneze.....	12
2.3	Zrání oocytu .....	14
2.3.1	Jaderné zrání.....	14
2.3.2	Cytoplazmatické zrání.....	16
2.4	Meiotická a vývojová kompetence oocytu.....	19
2.5	Fertilizace in vitro .....	20
2.5.1	Monospermická penetrace .....	21
2.5.2	Polyspermická penetrace.....	23
2.6	Polyspermický blok.....	24
2.6.1	Kortikální reakce.....	25
2.6.2	Zonna hardening.....	30
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
4.1	Experiment 1 .....	33
4.1.1	Materiál a metodika.....	33
4.1.2	Statistické vyhodnocení .....	37
4.1.3	Výsledky .....	38
4.2	Experiment 2 .....	43
4.2.1	Materiál a metodika.....	43
4.2.2	Statistické vyhodnocení .....	47
4.2.3	Výsledky .....	47
4.3	Experiment 3 .....	52
4.3.1	Materiál a metodika.....	52
4.3.2	Statistické vyhodnocení .....	56
4.3.3	Výsledky .....	56
5	DISKUZE .....	59
6	ZÁVĚRY .....	66
7	LITERATURA .....	68

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP *adenosin triphosphate*, adenosin trifosfát

BFS *bovine fetal serum*, bovinní fetální sérum

BSA *bovine serum albumin*, bovinní sérový albumin

BTS *beltsville thawing solution*

CAMP *cyclic adenosin monophosphate*, cyklický adenosin monofosfát

CGs *cortical granules*, kortikální granula

DAG *diacylglycerol*

DNA *deoxyribonucleic acid*, deoxyribonukleová kyselina

FITC *fluorescein isothiocyanate*, fluorescenční isothiokyanát

FSH *follicle stimulating hormone*, folikulostimulační hormon

GV *germinal vesicle*, zárodečný váček

GVBD *germinal vesicle break down*, rozpad zárodečného váčku

IP3 *inositol -1,4,5 – triphosphate*, inositol - 1,4,5 – trifosfát

Idkg index distribuce kortikálních granul

IVF *in vitro fertilization*, oplození in vitro

IVM *in vitro maturation*, zrání in vitro

IVP *in vitro production*, produkce in vitro

LCA *lens culinaris agglutinin*, lens culinaris aglutinin

LH *luteinizing hormone*, luteinizační hormon

MII *metaphase II*, metafáze druhého meiotického dělení

MPF *M-phase promoting factor*, M-fázi podporující faktor

mRNA *messenger ribonucleic acid*, mediátorová ribonukleová kyselina

PBS *phosphate buffered saline*, pufovaný fyziologický roztok

PIP2 *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*, fosfatidil inositol 4,5-bifosfát



PLC *phospholipase C*, fosfolipáza C

PKC *protein kinase C*, protein kináza C

PNA *peanut agglutinin*, peanut aglutinin

RNA *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina

rRNA *ribosomal ribonucleic acid*, ribozomální ribonukleová kyselina

SNARE *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*

VAMP *vesicle associated membrane protein*

ZP *zona pellucida*

ZP1-ZP3 zonální glykoproteiny

# 1 ÚVOD

Technologie in vitro produkce embryí je považována za jednu z nejdůležitějších technologií v zemědělském a biomedicínském výzkumu. Díky fyziologické podobnosti s člověkem nabývají prasata stále větší význam jako potenciální dárci tkání pro účely xenotransplantace orgánů nebo tvorby specifických proteinů ve výzkumu geneticky modifikovaných organismů. Zájem o velké množství zralých prasečích oocytů a prasečích embryí je právě z těchto důvodů značný. Nicméně biotechnologické postupy při in vitro produkci prasečích embryí jsou ve srovnání s jinými druhy hospodářských zvířat stále neefektivní. Nedokončené cytoplazmatické zrání, polyspermická penetrace nebo nedostatečná schopnost tvorby blastocyst jsou jedny z hlavních problémů, které do dnešní doby stále nebyly překonány. Úroveň jaderného a především cytoplazmatického zrání hraje v efektivitě in vitro fertilizace důležitou roli. Schopnost oocyty dokončit jaderné zrání, podstoupit úspěšně fertilizaci, časný embryonální vývoj a diferenciaci až do stádia blastocysty jsou výsledkem funkčního stavu oocyty a úrovně jeho meiotické a vývojové kompetence. Je obecně známo, že polyspermická penetrace způsobuje abnormální oplození oocyty a časnou embryonální mortalitu. Důležitou roli v jejím zablokování hraje kortikální granula. Kvantitativní studie změn populace kortikálních granulí je proto nezbytná pro pochopení mechanismu blokování polyspermické penetrace během fertilizace prasečích oocytů in vitro. Tyto znalosti jsou významné pro vývoj optimálních podmínek a zdokonalování metod maturace a fertilizace prasečích oocytů in vitro. Správná selekce izolovaných oocytů respektující úroveň folikulogeneze je jednou z cest, jak zefektivnit stávající postupy. Z tohoto důvodu byla tato disertační práce zaměřena na výzkum změn v distribuci kortikálních granulí u odlišných subpopulací prasečích oocytů s rozdílnou meiotickou kompetencí v průběhu folikulogeneze.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Folikulogeneze

Plně zralý oocyt schopný úspěšně podstoupit fertilizaci a embryonální vývoj je výsledkem dlouhého selekčního procesu folikulogeneze (Van den Hurk a Zhao, 2005).

Bielanska-Osuchowska (2006) uvádí, že folikulogeneze u prasat začíná již během fetálního vývoje a pokračuje po celou dobu dospělosti. Formování primordiálních folikulů započiná u plodu 56 den březosti prasnice, a jejich přeměna do primárního stádia pak v pozdní fázi březosti. Telfer (1996) doplňuje, že v období puberty činí zásoba primárních folikulů u prasat v průměru 420 000. Bielanska-Osuchowska (2006) dále uvádí, že první tvorba ovariálních folikulů započiná v nejhlubší části korové vrstvy ovárií a vývoj fetálních primordiálních folikulů je možné rozdělit do jednotlivých fází v závislosti na tvaru folikulárních buněk.

Folikuly přítomné v kortexu ovárií jsou v rozdílném stádiu vývoje a regrese. Formování folikulu je začátkem procesu folikulogeneze, který může být definován jako proces, ve kterém primordiální folikuly obsahující malou zárodečnou buňku, a vrstvu plochých granulózních buněk, se dále diferencují do dalších vývojových stádií a končí přeměnou do antrálních (preovulačních) folikulů, které obsahují plně vyvinutý oocyt s granulózními buňkami (Silva et al., 2009).

Přeměna primárního folikulu na sekundární (pre-antrální) folikul je uskutečňována vrstvením granulózních buněk okolo oocytu. V této chvíli vstupuje oocyt do rozsáhlé růstové fáze, která je typická vysokou proliferační aktivitou granulózních buněk, a vytvořením théky z intersticiálních buněk stromatu (Picton et al., 1998). Granulózní buňky aktivně ovlivňují růst oocytu, na druhou stranu oocyt aktivně ovládá proliferaci, morfogenezi a diferenciaci (Picton a Gosden, 1998). Proliferace granulózních buněk je zodpovědná za další vývoj primárního folikulu, který se mění na folikul sekundární. Vzájemná komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami je pak zabezpečována pomocí mezibuněčných spojů tzv. gap junctions (Smith, 2001). Pomocí těchto spojů je umožněna výměna živin, metabolických prekurzorů, informačních molekul a inhibič-

ních a signálních faktorů, které jsou nezbytné pro indukci a regulaci diferenciaci folikulárních oddílů z určité vývojové fáze na další (Van den Hurk a Zhao, 2005).

Matzuk et al. (2002) k tomu dodávají, že po dosažení prahové velikosti oocyty potlačí schopnost granulóznic buněk podporovat jejich další růst. Tím oocyt určuje nejen velikost folikulu, ale nepřímo také svůj vlastní růst.

Vývoj středních a pozdních fází folikulů je řízen pomocí gonadotropních hormonů adenohipofýzy, především pak FSH, který je převažujícím faktorem přežití folikulu. K dalšímu rozvoji sekundárních folikulů však stačí cirkulace pouze malého množství FSH (McGee a Hsueh, 2000). Eppig a O'Brien (1996) doplňují, že vývoj primordiálních folikulů je iniciován v ovariální tkáni bez působení gonadotropinů.

Jak uvádí Fair (2003) pod vlivem gonadotropinů dochází k přeměně sekundárního folikulu na terciální, označovaný často jako Graafův nebo antrální folikul. Pro toto stádium je charakteristická pokračující proliferace granulóznic buněk a jejich další diferenciaci na thekální buňky, které vytváří uvnitř folikulu *thecu internu* a *thecu externu*. Charakteristické je také vytvoření antrální dutiny, která je vyplněná folikulární tekutinou. Findlay et al. (2003) dodává, že buňky granulózy vytváří 3 fenotypově odlišné populace buněk, tvořící jednak těsnou vrstvu kolem oocyty, buňky murální přiléhající ke stěně folikulu a buňky antrální, které obklopují vytvořenou antrální dutinu.

Navzdory velké počáteční zásobě folikulů, pouze v průměru 1% této populace dosáhne preovulační fáze během reprodukčního života samice a většina podlehně atresii (Sato et al., 1990).

## 2.2 Oogeneze

Oogeneze začíná formováním primordiálních zárodečných buněk, které vznikají ve žloutkovém váčku a migrují přes mezoderm a entoderm do budoucích gonád, v jejichž vývoji hrají zárodečné buňky nezastupitelnou roli (Van Voorhis, 1998). Black a Erickson (1968) dodávají, že u plodu prasat je nejvyšší počet zárodečných buněk (v průměru 1,1 milionů) v 50. dni vývoje plodu. Van Voorhis (1998) dále doplňuje, že během migrace k samičím gonádám zárodečné buňky podstupují druhově specifický počet mitóz,

ztrácí schopnost pohybu a stávají se z nich oogonie, které vykazují vysokou frekvenci mitotických dělení.

Přeměna oogonií na primární oocyt je uskutečňována ještě v prenatálním období, a je doprovázena přerušením profáze prvního zracího dělení, které je pozastaveno až do období pohlavního dospívání (Marvan et al., 2003). Wassarman (1988a) k tomu dodává, že během profáze prvního meiotického dělení dojde ke spárování homologních chromozomů, k jejich kondenzaci a výměně genetického materiálu mezi nesesterskými chromatidami (crossing over).

V diplotenním stádiu je meióza přerušena a oocyt se nyní nachází ve fázi prvního meiotického bloku, který je prolomen až s nástupem puberty prasnice. Fáze růstu oocyty zahrnuje dlouhé období a trvá až do konce pohlavní činnosti. Pro toto období je charakteristický růst jádra, aktivní syntéza RNA a proteinů, hromadění žloutkových inkluzí a vznik a hromadění kortikálních granul (Marvan et al., 2003). Picton et al. (1998) dodávají, že růst oocyty je nezbytnou součástí v procesu získávání vývojové a meiotické kompetence a v dokončení jaderného a cytoplazmatického zrání, pro které je typická vysoká proteosyntetická aktivita a tvorba nových organel spolu s reorganizací již vytvořených.

Během růstové fáze zvětší oocyt svoji velikost ze 40  $\mu\text{m}$  až na 120  $\mu\text{m}$  (Kanitz et al., 2001). Gosden (2002) doplňuje, že po dosažení prahové velikosti oocyty dochází k pozastavení syntézy mRNA, která je znovu obnovena až po oplození oocyty.

Jednou z nejvýznamnějších změn v průběhu růstové fáze oocyty je vytvoření glykoproteinové membrány tzv. zony pellucidy, která pomocí 3 glykoproteinů ZP1, ZP2 a ZP3 vytváří ochranný obal okolo oocyty. Tyto glykoproteiny jsou nezbytné pro normální vývoj folikulu (Soyal et al., 2000).

Koncovou fází oogeneze je období zrání oocyty, při kterém dochází k prolomení prvního meiotického bloku a znovuzahájení meiózy, ve které oocyt vstupuje do druhého zracího dělení, přerušeno v metafázi v tzv. druhém meiotickém bloku. Druhé zrací dělení je obnoveno pouze v případě oplození (Ohashi et al., 2013).

## 2.3 Zrání oocyty

Mnohé z událostí, které připravují oocyt pro budoucí fertilizaci, iniciaci a zahájení embryonálního vývoje, probíhají během zrání oocyty. Zrání oocyty je spojeno se získáním schopnosti prodělat nejenom jaderné zrání, ale také zrání cytoplazmatické a genomické (Opiela a Katska-Ksiazkiewicz, 2004).

Plně dorostlý oocyt většiny savců je zastaven v G2 fázi prvního meiotického dělení (stádium GV). Meióza je obnovena až v reakci na specifický signál, jako je předovulační LH peak v podmínkách *in vivo* nebo vyjmutí oocyty z folikulárního prostředí a jeho kultivace *in vitro*. Obnovení meiózy je doprovázeno rozpadem zárodečného váčku (GVBD), kondenzací chromozomů a formováním dělicího vřeténka. Oocyt následně prochází přes metafázi I, anafázi I, telofázi I a bez dekondenzace chromozomů vstupuje do meiózy druhého zracího dělení. Po dosažení metafáze druhého zracího dělení, doprovázeného vydělením prvního pólového tělíska, je v této fázi opět pozastaven (Katska-Ksiazkiewicz, 2006).

V přirozeném říjovém cyklu probíhá jaderné, cytoplazmatické i genomické zrání současně. Nicméně u oocytů podstupujících zrání v *in vitro* systému může docházet k asynchronii mezi jednotlivými typy zrání, což může vyústit ve ztrátu vývojového potenciálu (Opiela a Katska-Ksiazkiewicz, 2004).

Navzdory faktu, že zrací proces *in vitro* je neustále optimalizován, *in vitro* zrající oocyty mají stále nižší vývojový potenciál a vysoký podíl vývojových abnormalit (Niemann et al., 2002).

### 2.3.1 Jaderné zrání

Kanitz et al. (2001) uvádí, že prolomení prvního meiotického bloku je iniciováno buď zvýšením koncentrace luteinizačního hormonu nebo vyjmutím oocyty z antrálního folikulu, čímž dojde ke spontánnímu meiotickému zrání. Autoři dále uvádí, že období zrání oocyty závisí na vzájemné komunikaci mezi oocytem a folikulárními buňkami a celý proces je pod kontrolou gonadotropních hormonů.

Oocyty se před vstupem do fáze zrání nachází v profázi prvního zracího dělení ve stádiu zárodečného váčku neboli tzv. germinal vesicle stage (GV stádium), kde je jádro tvořeno jadernou membránou a jadérkem obklopeným rozptýleným chromatinem. Se vstupem do fáze zrání dochází k rozpadu zárodečného váčku v procesu nazvaném jako GVBD neboli germinal vesicle break down, který nastane u prasat za 24 hodin po LH peaku (Torner et al., 1998).

Podle Motlika a Fulky (1976) se chromatin oocyty ve stádiu GVBD vyskytuje ve 4 konfiguracích (GV1 až GV4) podle změn na chromatinu a mizení membrány jádra a jadérka.

Obnovení meiózy je spojeno s poklesem inhibičního faktoru cAMP (cyclic adenosin monophosphate), syntetizovaného z ATP (adenosin triphosphate), jehož vysoká hladina bránila prolomení prvního meiotického bloku (Mehlmann, 2005). Nicméně pokles hladiny cAMP není jedinou příčinou finálního zrání oocytů. Snížení koncentrace cAMP aktivuje další z řady regulačních mechanismů obnovujících meiózu, kterým je MPF (M-phase promoting factor) faktor (Hunter, 2000). Jeho zvyšující se hladina po rozpadu zárodečného váčku způsobí přestup oocyty z G2 do M – fáze buněčného cyklu a je také zodpovědná za rozpad jaderné membrány, kondenzaci chromozomů, reorganizaci organel a formování dělicího vřeténka (Stojkovic et al., 1999).

Katska-Ksiazkiewicz (2006) dodává, že obnovení meiózy u prasečích oocytů je řízeno složitou kaskádou fosforylačních a defosforylačních událostí vedoucích k aktivaci MPF faktoru. Tento buněčný regulátor je složený ze dvou podjednotek, a to katalytické podjednotky p34cdc2 a regulační podjednotky cyclinu B1 (Kanitz et al., 2001).

V průběhu S a G2 fáze buněčného cyklu dochází sdružením těchto dvou podjednotek k vytvoření tzv. pre-MPF faktoru, který je neaktivní formou MPF. Tato neaktivní forma je aktivována pomocí fosforylačních a defosforylačních procesů (Katska-Ksiazkiewicz, 2006)

Říha et al. (1999) doplňuje, že aktivovaný MPF faktor řídí rozpad zárodečného váčku. Výsledkem těchto dějů je dokončení prvního zracího dělení a nástup druhého zracího dělení, který vede k vytvoření pro metafázi II typické konfigurace chromozomů označovaných jako tzv. plate. V jeho blízkosti je lokalizována oddělená polovina chromo-

zomů v podobě 1. pólového tělíška. Současně jsou uvolněny relativně pevné vazby mezi oocytem a kumulárními buňkami, které v této době sekrenují látky mucinózního charakteru, což se morfologicky projevuje jako expanze kumulárního komplexu.

### **2.3.2 Cytoplazmatické zrání**

Komplex událostí, které nastávají během zrání oocyty, nezávisí pouze na správné dynamice chromozomální separace, ale také na redistribuci cytoplazmatických organel a na uložení mRNA, proteinů a transkripčních faktorů potřebných v dalších procesech.

Sirard et al. (2006) doplňuje, že se jedná o specifický proces hromadění substrátů a živin, které jsou nezbytné pro dosažení vývojové kompetence oocyty.

Transkripty a proteiny uložené v cytoplazmě oocytů jsou zásadní pro proces zrání, a pro zajištění progresivního časného embryonálního vývoje, kdy je aktivován embryonální genom a syntéza nových proteinů je nezbytná (Ferreira et al., 2009). Autoři dále uvádí, že ačkoliv jsou jaderné i cytoplazmatické zrání dva odlišné procesy, jedná se o propojené děje, které probíhají současně v determinovaném čase, a to i přes to, že molekulární programování cytoplasmy začalo již během fáze růstu oocyty.

Proces cytoplazmatického zrání bývá rozdělen do třech hlavních dějů:

1. Redistribuce organel
2. Dynamika cytoskeletálních filament
3. Molekulární zrání

#### **2.3.2.1 Redistribuce organel**

Je dobře známo, že během zrání oocyty lze pozorovat několik ultrastrukturálních změn týkajících se morfologie a přerozdělování cytoplazmatických organel. K distribuci cytoplazmatických organel během zrání dochází za pomoci mikrotubulů a mikrofilament v závislosti na potřebách buňky během každé fáze vývoje (Ferreira et al., 2009).

Pro cytoplazmatické zrání je nezbytná aktivace metabolických drah zapojených do syntézy proteinů. Z tohoto důvodu hrají důležitou roli mitochondrie, které jsou klíčovou součástí metabolických dějů zodpovědných za přísun energie během procesu zrání



(Stojkovic et al., 2001). Je obecně známo, že během redistribuce vnitrobuněčných organel dochází k přesunu nejen mitochondrií, ale také ribozomů, endoplazmatického retikula, Golgio komplexu a kortikálních granul. Nicméně mitochondriální systém je jedním z nejdůležitějších ukazatelů cytoplasmatické zralosti oocyty neboť je nezbytný nejen pro produkci ATP, ale účastní se také regulace apoptózy a homeostázy vápníku (Sun et al. 2001; Sato et al., 2014).

Torner et al. (2004) uvádí, že mitochondrie jsou v průběhu zrání přesouvány z disperzního rozložení, typického pro oocyt ve stádiu zárodečného vajíčka, do formy, která je typická klastrovým uspořádáním mitochondrií. Pohyb mitochondrií do oblastí s vysokou energetickou náročností je rozhodující pro oocyt i během kritických úseků buněčného cyklu. Stojkovic et al. (2001) dále doplňují, že během období zrání syntetizují mitochondrie ATP nezbytné k syntéze nových proteinů, díky kterým je možné dokončení zracího procesu a embryonálního vývoje.

Proteosyntéza je nezbytná nejen pro zrání oocyty, ale také pro formování zygoty a časného embrya. Za tímto účelem musí být v průběhu zrání přítomné dostatečné množství ribozomů syntetizovaných transkripcí ribozomálních RNA (rRNA) genů (Ferreira et al., 2009).

FitzHarris et al. (2007) uvádí, že neméně důležitou roli v maturačním procesu zastává také endoplazmatické retikulum, jehož funkcí jsou zejména skládání a degradace proteinů, metabolismus lipidů a je také hlavní endogenní zásobárnou a regulátorem vápenatých iontů. Biochemické a strukturální změny v endoplazmatickém retikulu během zrání jsou rozhodující pro správnou funkci regulace intracelulárního vápníku (Ferreira et al., 2009).

Díky hypertrofické a proliferační činnosti Golgiho komplexů dochází také k formování kortikálních granul (Gulyas, 1979; Guraya, 1982). Kortikální granula jsou orgány vyskytující se výhradně v oocytech. Jejich skladba zahrnuje rozmanitou skladbu proteinů, strukturálních molekul, enzymů a glykosaminoglykanů. Exocytóza kortikálních granul (kortikální reakce) je jeden z nejdůležitějších mechanismů používaných oocytem k zabránění polyspermické penetrace (Wang et al., 1997; Wessel et al., 2001; Liu, 2011)

### **2.3.2.2 Dynamika cytoskeletálních filament**

Cytoskeletální filamenta jsou dynamické a adaptabilní struktury, které mohou zůstat bez změny nebo prodělat potřebnou změnu. Tento systém je také zodpovědný za segregaci chromozomů během meiózy a mitózy, dělení buňky během cytokineze a za přesun molekul a organel uvnitř buněk (Alberts et al., 2004). Alberts et al. (2004) dále doplňují, že cytoskeleton je složen ze tří typů filament, které jsou tvořeny pomocí subjednotek charakteristických pro každý typ. Mikrotubuly jsou složeny z globularu a kompaktních tubulinových podjednotek, zatím co aktinová filamenta jsou tvořena globularem a kompaktními aktinovými podjednotkami. Intermediální filamenta jsou složena z prodloužených vláknitých polypeptidových podjednotek uspořádaných do tetrameru obsahujícího jak tubulinové subjednotky, tak i aktinové monomery.

### **2.3.2.3 Molekulární zrání**

Molekulární zrání koresponduje s fází růstu a zrání oocyty a zahrnuje transkripci, uchování a zpracování mRNA kyselin, které budou později přeměněny pomocí ribosomů v proteiny. Proteiny odvozené od těchto mRNA kyselin jsou zapojeny jak v procesu zrání, tak také v procesu fertilizace, formování prvojadra a v časně embryogenezi. Tyto proteiny jsou pak uloženy až do doby jejich vhodného využití (Sirard, 2001). Sirard (2001) dále uvádí, že až do aktivace embryonálního genomu má správné uložení transkriptů v cytoplazmě oocyty velký význam. Po obnovení meiózy je zastavena exprese genů a pouze ty transkripty, které byly vytvořeny a uloženy v růstové fázi oocyty, budou metabolizovány v potřebnou dobu.

Tomek et al. (2002) uvádí, že mRNA transkribovaná během molekulárního zrání je akumulována v přechodně neaktivní formě. Biosyntetickým aparátem cytoplazmy je mRNA převáděna do formy ribonukleoproteinových částic. V této formě je mRNA chráněna proti nukleolytické degradaci a je tak chráněna a uložena do doby časně embryonálního vývoje (Fulka et al., 1998).

## 2.4 Meiotická a vývojová kompetence oocytu

Meiotická kompetence je charakterizována jako schopnost oocytů znovu zahájit proces meiózy a během folikulogeneze dosáhnout stádia metafáze II (Mermillod et al., 2000). Společně s cytoplazmatickou zralostí, charakterizovanou redistribucí organel, cytoskeletální dynamikou a proteosyntetickou aktivitou, jsou předpokladem pro dosažení vývojové kompetence oocytu.

Plná kompetence ke zrání je však docílena až u oocytů pocházejících z folikulů větších než 3 mm v průměru. Oocyty pocházející z folikulů menších než 3 mm nejsou plně meioticky a vývojově kompetentní, protože jsou cytoplasmaticky deficitní (Sun et al., 2001, Marchal et al., 2002). Sun et al. (2001) dále dodává, že navzdory tomu je však relativně velká část oocytů získaná z malých folikulů schopna znovu zahájit meiózu, nicméně jejich schopnost dokončit zrání, podstoupit fertilizaci a začít s embryonálním vývojem je limitována.

Je obecně známo, že obě kompetence závisí na velikosti a stupni atrezie folikulu, ze kterého oocyt pochází (Balomba and Sirard, 2000; , Feng et al., 2007). Pouze malá část oocytů je schopna plnohodnotné kompetence dosáhnout, neboť většina folikulů podlehne fyziologické atrezii (Mermillod et al., 2000).

Lonergan et al. (1994) uvedl, že oocyty nabývají meiotickou kompetenci až po vytvoření antrální dutiny a pouze oocyty o minimálním průměru 115  $\mu\text{m}$  jsou schopny dosáhnout metafáze II. Motlík et al. (1984) a Crozet et al. (1986) k tomu dodávají, že nabytí meiotické kompetence je spojeno nejen s velikostí oocytu a folikulu, ale také s jadernou morfologií a transkripční aktivitou oocytu.

Machatkova et al. (2008) popisují, že u prasat se populace oocytů mění z hlediska kvantity, morfologické kvality a meiotické kompetence podle fáze folikulárního vývoje. Pochopení mechanismu vývoje folikulu během folikulogeneze a jeho vlivu na vývojový potenciál oocytu je nezbytným předpokladem pro zlepšení metod ovlivňujících řízenou reprodukci v in vitro systému (Evans, 2003).

Vývojová a meiotická kompetence ovlivňují časný embryonální vývoj, in vitro produkci embryí a přežití embryí po transferu do recipientky. Tyto kompetence mohou být sou-

hrnně charakterizovány jako schopnost oocyty dozrát, být fertilizován a dát životaschopné a plodné potomstvo (Duranthon a Renard, 2001).

## 2.5 Fertilizace in vitro

Po počátečních úspěších s odchováním životaschopného potomstva mnoha druhů hospodářských zvířat pomocí IVM a IVF technik, byly tyto technologie příslibem zvýšení produkce embryí od geneticky cenných zvířat. Kromě využití ovariální zásoby nezralých oocytů, umožňují tyto techniky využít oocyty získané post mortem a zachránit tak genetický materiál od cenných samic nebo využít ovariální zásoby juvenilních zvířat, což vede k významnému zkrácení generačního intervalu (Gruppen, 2014).

Fertilizace in vitro (IVF) je vysoce specializovanou metodou asistované reprodukce, jejímž hlavním přínosem je řízená produkce životaschopné generace nových jedinců. Nízký podíl monospermické penetrace a vysoký výskyt polyspermie je hlavním a stále nevyřešeným problémem provázejícím fertilizaci a produkci prasečích embryí in vitro (Funahashi a Day 1997, Day, 2000, Abeydeera 2002, Coy a Romar 2002, Funahashi 2003)

Wang et al. (1998) uvedl, že zpočátku se oocyty, zrající in vitro, považovaly za defektní ve schopnosti spustit a dokončit kortikální reakci, která brání v polyspermické penetraci. Ačkoliv morfologické srovnání oocytů zrajících in vivo i in vitro ukázalo, že oba typy oocytů mají podobnou schopnost uvolnit kortikální granula po penetraci spermie, jiný výzkum odhalil, že schéma uvolňování kortikálních granul se liší (Romar et al., 2012).

Wang et al. (1998) také uvedl, že zóna pellucida ovulovaných oocytů byla významně tlustší než u IVM oocytů. Je tedy pravděpodobné, že za selhání bloku proti polyspermické penetraci může být zodpovědná zonální reakce.

Je nutné zohlednit také efekt maternálního věku, kdy bylo zjištěno, že podíl polyspermicky penetrovaných oocytů je nižší u IVM oocytů získaných od dospělých prasnic oproti oocytům izolovaným z prepubertálních prasnic (Marchal et al., 2001).

Experimenty, které se zabývaly otázkou snížení výskytu polyspermické penetrace byly zaměřeny zejména na modifikaci podmínek fertilizace in vitro, které jsou velmi odlišné od prostředí in vivo, kde jsou gamety vystaveny oviduktním a filokulárním faktorům, které regulují a koordinují jejich funkce (Hunter, 1990).

Stupeň polyspermie je také úzce spjat s počtem spermií vyskytujících se u oocyty během fertilizace. Během klasického procesu IVF u prasat jsou oocyty oplozovány v malém množství média, kde neexistují bariéry regulující interakci spermie-oocyt. Nepřítomnost regulujících mechanismů, které se fyziologicky vyskytují při procesu fertilizace in vivo, způsobuje akumulaci velkého množství spermií v místě oplození a penetraci většího počtu spermií do oocytů i navzdory faktu, že oocyty mají vlastní mechanismy k blokování polyspermické penetrace (Funahashi, 2003). Úspěšné oplození vajíčka, které má potenciál vyvinout se v životaschopné embryo, závisí nejen na plně kompetentním oocyty, ale také na plně kompetentní spermii. Proto je v systému IVF maturace spermií in vitro stejně důležitá, jako maturace oocytů (Xu et al., 1996a).

Je známou skutečností, že na úspěšný proces fertilizace má velký vliv výběr vhodného kance, neboť jsou známy velké odchylky nejen mezi jednotlivými kanci, ale dokonce i mezi jednotlivými dávkami ejakulátu stejného jedince (Gil et al., 2008). Xu et al. (1996a) dodávají, že mezi hlavní problémy v IVF systému patří také velká variabilita v kvalitě ejakulátu. Použitím specifických frakcí ejakulátu (sperm-rich frakcí) může být snížena variabilita mezi jednotlivými odběry jednoho kance. Autoři dále uvádí, že jako dlouhodobé řešení se nabízí možnost kryokonzervace ejakulátu, jež by umožnila eliminovat negativní vliv velké variability mezi ejakuláty. Je však nutné optimalizovat IVF protokol tak, aby byla zachována kvalita ejakulátu každé jednotlivé dávky

### **2.5.1 Monospermická penetrace**

Výsledkem kokultivace spermií a oocytů v prostředí fertilizačního média je interakce obou gamet, penetrace spermie do oocyty, dekondezace hlavičky spermie a zformování samčího prvojádra, aktivace druhého meiotického dělení, dekondezace samičího haplomu a vznik samičího prvojádra, syngamie obou prvojader a vznik zygoty (Říha et al., 1999).

Primakoff a Myles (2002) uvádí, že během penetrace musí spermie překonat několik ochranných vrstev oocytu jako je vnější vrstva koronových buněk (corona radiata) a vnější extracelulární matrix – zona pellucida. Autoři dále popisují, že překonání těchto bariér vyžaduje nejen aktivní pohyb spermie, ale také specifickou enzymovou výbavu. Breitbart (2003) k tomu dodává, že savčí spermie nejsou schopny oplození bezprostředně po ejakulaci. Stejně jako v podmínkách *in vivo*, tak i v IVF systému je nutná dostatečně dlouhá doba k tzv. kapacitaci spermií.

Říha et al. (1999) popsali kapacitaci jako komplex biochemických pochodů především na membránách spermie, které jsou nezbytné pro vyvolání akrozomální reakce a hyperaktivního pohybu, který je charakteristický vyšší frekvencí vlnění bičíku a současně větší amplitudou vlnění. Swenson a Dunbar (1982) dodávají, že proces kapacitace je důležitým prostředníkem k rozpoznání a vazbě spermie na oocyt a k úspěšné fertilizaci.

Po průniku spermie do cytoplazmy zralého oocytu dojde k dekonenzaci vysoce kondenzovaného jaderného chromatinu spermie a výměně spermiových protaminů za intenzivní syntézu proteinů histonového typu. Po rekondenzaci chromatinu dochází ke zformování interfázního samčího prvojádra, které je obklopeno nově vzniklou prvojadernou membránou. Ve stejné době je dokončena modifikace maternálního genomu a dochází k integraci se samčím prvojádrem (Gioia et al., 2005).

Ding et al. (1992) uvádí, že penetrace kančí spermie do oocytu začíná 3 hod po provedení inseminace a ke zformování prvojader dojde za 8 hod. Říha et al. (1999) doplňují, že k tvorbě samičích prvojader dochází později než u samčích a doba jejich zformování je 10-12 hod po provedené fertilizaci. Kolektiv autorů dále uvádí, že v této době se většina samičích prvojader v penetrovaných oocytech nachází v různých morfologických stádiích a jejich vývoj pokračuje synchronně se samčími prvojádry až do 16ti hodin po začátku inkubace oocytů se spermií. První dělicí se zygoty lze v podmínkách *in vitro* pozorovat většinou za 28 hodin po oplození.

Ve vhodných *in vitro* podmínkách může podíl penetrovaných IVM oocytů dosahovat až 70 %. Nicméně míra monospermicky penetrovaných oocytů je stále velmi nízká a velký podíl z penetrovaných oocytů tvoří polyspermická penetrce (Xia et al., 2001).

### 2.5.2 Polyspermická penetrace

Polyspermická penetrace je považována za jeden z přetrvávajících a nejobtížnějších problémů, se kterým se v systému IVF a IVP setkáváme a ačkoliv se polyspermicky penetrované oocyty mohou vyvinout až do stádia blastocysty, jejich kvalita je velmi limitována (Han et al., 1999). Han et al. (1999) dále uvádí, že tato schopnost polyspermicky oplozených oocytů, vyvinout se až do stádia blastocysty, je značným problémem při následném výběru vhodného embrya neboť prasečí IVP zygoty obsahující 3 nebo 4 prvojádra mají finálně stejný podíl blastocyst jako ty, co obsahují správný počet dvou prvojader. Z tohoto důvodu není vhodné využívat podíl vzniklých blastocyt jako ukazatele viability embryí a efektivnosti IVP.

Jediná cesta jak prokázat, že zygota byla oplozena normálně, je hodnocení formace prvojader. Nicméně hodnocení prvojader prasečích zygot je velmi obtížné vzhledem k velkému množství cytoplasmatických lipidových kapének, díky kterým se cytoplasma stává neprůhlednou a tmavou (Gruppen, 2014).

Xia et al. (2001) doplňuje, že výskyt polyspermie v in vivo podmínkách dosahuje 30 až 40 %, zatímco v in vitro podmínkách může polyspermie dosahovat i více než 65 % penetrovaných IVM oocytů.

U savců je proces penetrace spermie spouštěcím mechanismem k aktivaci oocytu následovanou exocytózou kortikálních granul, která má za následek spuštění kortikální reakce a polyspermického bloku (Romar et al., 2005; Tahara a Tasaka, 2006; Coy et al., 2008). Zatímco výhodou in vivo podmínek v boji proti polyspermické penetraci jsou dvě skupiny mechanismů: obranné mechanismy vejcovodu a obranné mechanismy oocytu zahrnující změny na membránách a modifikaci zóny pellucidy (Coy a Avilés, 2010), u in vitro fertilizace je v boji proti polyspermické penetraci zapojen pouze vlastní obranný mechanismus oocytu.

Bylo popsáno, že fyziologická polyspermie se vyskytuje u mnoha živočišných druhů včetně hmyzu, plazů a ptáků. Savčí polyspermické oplození však vede k abnormálnímu vývoji embryí a častým spontánním abortům (Liu, 2011).

Důvody výskytu tak vysoké polyspermie u prasat nejsou zatím zcela objasněny, je však již mnoho prací, které se pokouší rozklíčovat a pochopit přesné mechanismy, kterými se oocyt proti polyspermické penetraci brání.

Romar et al. (2012) uvádí, že problém polyspermické penetrace u in vitro oplozených oocytů je spojován s několika možnými příčinami, jako je selhání nebo nedokončení kortikální reakce, nedostatečná distribuce uvolněného obsahu kortikálních granul do perivitelinního prostoru, selhání reakce zony pellucidy nebo nedefinovatelné rozdíly mezi in vitro a in vivo maturovanými oocyty.

## 2.6 Polyspermický blok

Liu (2011) uvádí, že fertilizace u savců je sekvencí koordinovaných událostí zahrnujících mnoho kroků vedoucích ke vzájemnému rozpoznání haploidní samčí a samičí gamety. Savčí oocyty, které jsou po ovulaci oplození schopné, se vyznačují jak přítomností prvního pólového tělíska, tak také přítomností ochranných bariér ve formě extracelulární matrix zony pellucidy a několika vrstev granulózních buněk. Pasážování spermií skrze tyto semi-propustné bariéry obklopující oocyt je naprosto nezbytné pro zahájení procesu oplození. Nicméně průnik více než jedné spermie přes tyto ochranné mechanismy způsobuje polyploidní oplození vedoucí u většiny druhů k zániku embrya. Han et al. (1999) a Xia et al. (2001) dodávají, že cytoplasma některých prasečích oocytů disponuje schopností vyloučit přebytečnou spermii a tyto polyspermicky oplozené oocyty pak mohou dokončit svůj vývoj v blastocystu za předpokladu, že přebytečná spermie nenaruší embryonální genom. Monospermické oplození oocytu však stále zůstává nezbytnou podmínkou pro úspěšné oplození a přežití embrya.

Coy et al. (2010) dodávají, že u savců je mechanismem zajišťujícím oplození oocytu pouze jedinou spermií polyspermický blok. Při prvním kontaktu oocytu se spermií dochází u savců k zapojení obranných mechanismů proti polyspermické penetraci, které zahrnují zapojení zony pellucidy (zona block) a kortikální reakci vyvolanou exocytózou kortikálních granul.



Časová závislost mezi průnikem spermie a ustanovením polyspermického bloku se může významně lišit. Specifická modifikace zony pellucidy vyvolaná kortikální reakcí nebyla ještě zcela objasněna, nicméně je známo, že uvolnění enzymatického obsahu z kortikálních granul indukuje změny zonálních proteinů.

### 2.6.1 Kortikální reakce

Ducibella (1996) popisuje kortikální reakci jako kalcium – dependentní exocytotický proces, jehož spouštěčem je fúze spermie s oolemou oocyty. Vazba spermie na oocyt aktivuje řadu intracelulárních signálních drah, které vyvolají indukci exocytózy kortikálních granul do perivitelliního prostoru oocyty následovanou biochemickou modifikací zóny pellucidy do formy neprostupné bariéry (tzv. zona hardening).

Tyto změny jsou úzce spojeny s přechodným zvýšením koncentrace intracelulárního vápníku, který je vylučován v opakujících se časově definovaných vlnách tzv. oscilace  $Ca^{2+}$  (Fissore et al., 1992; Abbott a Ducibella, 2001).

Oscilace  $Ca^{2+}$  je závislá na hydrolýze fosfatidylinositolu bifosfátu (PIP<sub>2</sub>), za pomoci fosfolipázy C (PLC) a následném vytvoření inositolu 1,4,5 – trifosfátu, známého pod zkratkou IP<sub>3</sub> a diacylglycerolu (DAG) (Berridge, 1993). Specifický izoform fosfolipáza C zeta je přinášena spermií během fúze spermie s oocytem C zeta (Miyazaki et al., 1993; Swann a Yu, 2008).

U savčích oocytů je IP<sub>3</sub> hlavním messengerem zodpovědným za zvýšení intracelulárního vápníku. Možné zapojení messengeru IP<sub>3</sub> do kortikální reakce a exocytózy kortikálních granul bylo sledováno v práci Ducibelly et al. (1993), kteří injektáží IP<sub>3</sub> do oocytů myši, křečka a ovce vyvolali uvolnění obsahu kortikálních granul a modifikaci zony pellucidy. Tyto výsledky ukázaly, že IP<sub>3</sub>, produkovaný fosfolipázou C (PLC), hraje zásadní roli v exocytóze kortikálních granul. Vazba IP<sub>3</sub> na receptory endoplazmatického retikula vyvolá oscilační uvolňování vápníku do ooplasmy a následnou fúzi kortikálních granul s oolemou oocyty.

Diacylglycerol vzniklý hydrolýzou PIP2 fosfolipázou C slouží k aktivaci proteinkinázy C (PKC). Je známo, že PKC hraje důležitou roli v indukci exocytózy kortikálních granul během fertilizace a bylo prokázáno, že spuštění exocytózy je spojeno s translokací PKC k plazmatické membráně (Fan et al., 2002; Sun, 2003). Fan et al. (2002) dále prokázali, že se PKC u prasat vyskytuje v několika izoformách jako PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\gamma$  a jejich subcelulární distribuce je odlišně regulována v průběhu zrání i fertilizace. Intracytoplasmatická injekce izoform-specifických protilátek odhalila, že izoforma PKC $\alpha$  může být v procesu fertilizace nezbytná.

Aktivace PKC pomocí DAG způsobí přestavbu ZP2 proteinu a změnu struktury ZP (Sun et al., 1997; Ducibella et al., 1993).

Během kortikální reakce je do perivitelliního prostoru uvolňován obsah kortikálních granul, jehož enzymatické složení způsobí strukturální změny zóny pellucidy (Coy et al., 2008). Abbott a Ducibella (2001) doplňují, že kortikální granula obsahují řadu enzymů, které biochemicky mění vazebné receptory pro spermie ZP2 a ZP3 proteinů, které pak ztrácí schopnost receptorové aktivity a tudíž vazby dalších spermií (Abbott a Ducibella, 2001).

Je všeobecně akceptováno, že zprostředkování exocytotické membránové fúze zajišťují členové tzv. SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) proteinů, které se účastní mnoha transportních dějů eukaryotických buněk. Weber et al. (1998) doplňují, že důležitou roli v membránových fúzích hrají dvě třídy proteinů známých jako v- a t- SNARE proteiny. Členové v-SNARE proteinů, jako jsou VAMP (vesicle associated membrane protein) a synoptotagmin, jsou nalezeny na membránách váčků, zatímco členové t-SNARE proteinů, jako syntaxin nebo SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa) jsou nalezeny na cílových membránách (Fasshauer et al., 1998; Weber et al., 1998).

Nedávné experimenty na prasečích oocytech odhalily, že t-SNARE protein SNAP - 23 a v-SNARE protein VAMP1 jsou zapojeny v navázání kortikálních granul k oolemě oocytu a interakce mezi těmito proteiny je zodpovědná za zadržení CGs v korové vrstvě oocytu do doby exocytózy (Tsai et al., 2011).

U hlodavců je kortikální reakce popisována jako rychlý děj, jehož dokončení trvá zpravidla pouze několik minut (Tahara et al., 1996). U prasat je stále nedostatek dat o fyziologickém základě a načasování kortikální reakce, ale předpokládá se, že délka kortikální reakce u prasat je odlišná od jiných savců a trvá delší časový úsek než 6 hod (Wang et al., 1997). Srovnání s ostatními autory je stále velice problematické, neboť kortikální reakce u in vitro maturovaných oocytů je ovlivněna nejen použitým zrácím médiem (Coy et al., 2002), ale také podmínkami IVF systému (Li et al., 2003).

### **2.6.1.1 Kortikální granula**

Od objevení kortikálních granul v savčích oocytech, vzniklo mnoho publikací zabývajících se jejich rolí v procesu fertilizace. Jejich role bývá připisována obraně proti polyspermické fertilizaci, vyvolání reakce zony pellucidy a změnám na buněčném povrchu (Wessel et al., 2001).

Literatura popisuje kortikální granula jako membránové sekretorické organely vyskytující se pouze v cytoplazmě nefertilizovaných oocytů, která po vypuštění svého obsahu nejsou již nikdy obnovena (Wang *et al.*, 1997; Wessel et al., 2001; Liu, 2011). Cran a Cheng (1985) ve své ultrastrukturální studii prokázali, že kortikální granula jsou obsažena také v prvním pólovém tělísku a chybí ve druhém pólovém tělísku. Wessel et al. (2001) doplňuje, že kortikální granula jsou podobná sekrečním organelám somatických buněk, jako jsou např. synaptické váčky nervových buněk.

První nález kortikálních granul u savců byl popsán u křečka, v práci Austin (1956), za použití mikroskopu s fázovým kontrastem. Austin (1956) i Gulyas (1979) uvádí, že tyto specifické organely pochází z Golgiho komplexu a tvoří se již v časně fázi růstu oocyty. Nicméně období, kdy se kortikální granula v oocyty poprvé objevují se různí v závislosti na živočišném druhu.

Během časného folikulárního vývoje dochází k hypertrofické a proliferační činnosti Golgiho komplexů a dochází k formování kortikálních granul (Gulyas, 1979; Guraya, 1982). Řada autorů se shoduje na tom, že produkce kortikálních granul u savců je kontinuální proces a nově vzniklá kortikální granula migrují cytoplasmou ke korové vrstvě

oocyty do doby, než dojde k ovulaci (Cran a Cheng, 1985; Ducibella et al., 1994; Wang et al., 1997).

### **Funkce kortikálních granul**

Funkcí kortikálních granul je modifikace zóny pellucidy do formy bariéry neprostopupné pro spermie – tzv. zona hardening (Romar et al., 2005; Rath et al., 2005; Tahara a Tasaka, 2006; Coy et al., 2008). Tato bariéra zabrání penetraci přebytečných spermií zvýšením rezistence zóny pellucidy proti proteolytickému štěpení.

Obecně známou skutečností je proces migrace kortikálních granul cytoplazmou savčích oocytů, a to nejen v podmínkách in vivo, ale také v podmínkách in vitro (Coy a Avilés, 2010; Gulyas, 1980). Společným rysem migrace kortikálních granul u hospodářských zvířat se jeví odstředivá migrace během pozdní fáze zrání oocytů (Cran et al., 1980; Cran a Cheng, 1985).

Yoshida et al. (1993) uvedl, že ačkoliv kortikální granula u prasat uvolňují svůj obsah po navázání spermie jak in vivo, tak i v systému in vitro, dochází v in vivo podmínkách k mnohem rychlejší a kompletnější exocytóze než během penetrace in vitro. S tímto zjištěním se shoduje také Wang et al. (1997), který pozoroval neúplnou exocytózu u oocytů, které zrály a byly inseminovány in vitro. Tito autoři se shodují, že neúplná a pomalá exocytóza může být jednou z hlavních příčin vysoké polyspermické penetrace u oocytů oplozovaných a maturovaných v in vitro systému

### **Obsah kortikálních granul**

Ačkoliv je obsah kortikálních granul u nižších obratlovců poměrně dobře prozkoumán, je poměrně málo dostupných informací o složení obsahu kortikálních granul u savců.

Pomocí cytochemických a biochemických metod byly u myších kortikálních granul objeveny 3 hlavní molekuly, které zahrnovaly ovoperoxidázu (Gulyas and Schmell, 1980), glykoprotein o velikosti 75 Kd známý jako p75 (Pierce et al., 1990) a  $\beta$ -n-acetylglukosaminidázu (Miller et al, 1993). Savčí kortikální granula mohou obsahovat

také heparin vázající placentální protein a proteinázy (Gwatkin et al., 1973) zahrnující tkáňový plasminogen aktivátor (Zhang et al., 1992).

Je známo, že komponenty obsažené v kortikálních granulích podléhají glykosylačním procesům (Hoodboy a Talbot, 2001). Bylo popsáno, že kortikální granula myší, křečků a koček jsou spojována se specifickým lektinem LCA, který je specifický pro  $\alpha$ -D-manosu, ale vizualizace prasečích kortikálních granul pomocí tohoto lektinu selhává. Tento jev je pravděpodobně zapříčiněn rozdílným chemickým složením obsahu prasečích kortikálních granul. Rozdíl je způsoben přítomností specifických glykokonjugátů, mezi které je zahrnuté také sacharidové reziduum  $\beta$ -D-galactosyl (1,-3)-D-N-acetylgalactosaminem, pro nějž je typické napojení na specifický lektin PNA, který se se sacharidovým reziduem váže (Ducibella et al., 1988,1990; Yoshida et al., 1993; Wang et al., 1997). Miller a Ax (1990) dodávají, že glykokonjugáty hrají důležitou roli při kapacitaci spermií, vazbě spermie na extracelulární matrix a vitelinní membránu oocyty a při indukci akrozomální reakce během procesu fertilizace.

#### **2.6.1.2 *Zonna pellucida***

Zona pellucida je známá jako extracelulární matrix obklopující nejen rostoucí a vyvíjející se oocyt, ale také embryo před implantací (Hasegawa a Koyama, 2007).

Složení zony pellucidy u prasat bylo několik let diskutováno a nebyla jasně stanovena klasifikace zonálních proteinů. Na základě fylogenetických analýz byl vytvořen aktualizovaný seznam zonálních genů a pseudogenů kódující glykoproteiny zony pellucidy podle nichž byly stavební glykoproteiny pojmenovány.

Podle Goudeta et al. (2008) se prasečí zona pellucida skládá ze 3 vysoce specifických glykoproteinů označovaných jako ZP2, ZP3 a ZP4, které jsou podrobovány mnoha posttranslačním modifikacím. Rath et al. (2005) dodávají, že glykoproteiny obsahují sacharidové zbytky, které se skládají z velkého množství neutrálních N- a O-glykanů. Tyto oligosacharidy jsou pak zodpovědné za napojení a vazbu spermií na povrch ZP a účastní se vyvolání kortikální reakce a následné penetrace.

Hoodboy a Dean (2004) dodávají, že zonna pellucida je třírozměrná síť sulfatovaných glykoproteinů uspořádaných do vláknité struktury. Pomocí elektronového mikroskopu bylo pozorováno, že několik vláken je uspořádáno do cylindrických svazků rozmístěných v soustředných vrstvách.

Morfologie ZP je během období růstu a časného embryonálního vývoje neustále modifikována a na jejích změnách se podílí nejen období zrání (in vitro i in vivo), ale také složení použitých medií v in vitro systému nebo fáze embryonálního vývoje, ve kterém se ZP nachází. (Ducibella et al., 1995; Rath et al., 2005). Rath et al. (2005) také uvedl, že struktura zony pellucidy se liší mezi oocyty, které zrály v in vivo podmínkách a oocyty, které podstoupily zrání v in vitro systému.

Rozličné typy glykoproteinů, které zonální matrix obsahuje, hrají rozdílné role v procesu oplození. Zonální glykoproteiny jsou odpovědné nejen za zprostředkování a udržení vazby mezi spermií a oocytem, ale jsou zodpovědné také za indukci akrozomální reakce a modifikaci zony pellucidy během zona hardeningu (Hasegawa et al., 2006). Yonezawa et al. (2012) doplňuje, že za vazebnou aktivitu mezi spermií a oocytem nesou zodpovědnost glykoproteiny ZP3 i ZP4, jejichž vazebná činnost se však projeví teprve v heterokomplexu.

Töpfer-Petersen et al. (2008) upřesňují, že rozpoznání gamet je zprostředkováno pomocí  $\beta$ -galaktosylových zbytků N-glykanů. Dále uvádí, že ZP2 protein je největším glykoproteinem v prasečí ZP a jeho proteolytické štěpení se aktivně účastní zejména v procesu zona hardeningu, jenž má zabránit průniku další spermie do oocyty.

### **2.6.2 Zonna hardening**

U většiny zvířat je zodpovědná za mechanickou bariéru a obranu proti spermiím a mikroorganismům extracelulární matrix zonna pellucida, jejíž obranná role je aktivována kortikální reakcí a uvolněním strukturálních proteinů a enzymů, které způsobí změny nazývané jako zona hardening (Kurasawa et al., 1989; Ducibella et al., 1990). Tento proces je charakteristický zvýšením rezistence zony pellucidy proti proteolytickému štěpení (Gulyas a Yuan, 1985).

Přestože ZP hardening je u většiny savčích oocytů po fertilizaci běžnou událostí, předchozí studie odhalily, že u prasečích oocytů, které podstoupily maturaci v in vitro systému, k ZP hardeningu nedochází (Coy et al., 2002; Coy et al., 2005). Je tedy pravděpodobné, že se na ZP hardeningu a obraně vůči polyspermické penetraci u prsatek podílí i jiné mechanismy, jako je např. vejcovod (Coy a Avilés, 2010). Faktory obsažené v ovidukální tekutině (ovidukální glycoproteiny) mohou zlepšit rozličné funkce ZP. Je pravděpodobné, že asociace těchto specifických ovidukálních glykoproteinů se zonnou pellucidou a jejich lokalizace v perivitelliním prostoru hraje důležitou roli v procesu maturace zonny pellucidy. K tomuto tvrzení se přiklání ve své publikaci také Wang et al. (1998), kteří uvádí, že byly nalezeny důkazy, že polyspermická penetrace in vitro nenastává v důsledku selhání nebo nedostatečné kortikální reakci, ale spíše vlivem selhání reakce zóny pellucidy.

Existuje mnoho publikací popisujících ZP hardening jako post-fertilizační událost, která je způsobená exocytózou kortikálních granul po fúzi spermie s oolemou oocytu (Gulyas a Yuan, 1985; Sun, 2003; Wong a Wessel, 2006). Avšak existují také data o prefertilizačním hardeningu způsobeném předčasnou exocytózou kortikálních granul způsobenou stárnutím oocytu (Katska et al., 1999; Kolbe a Holz, 2005).

Massimiliano et al. (2010) uvádí, že je sice prokazatelný vliv kortikální reakce na změnu struktury zonny pellucidy při procesu zonna hardening, ale je důležité lépe specifikovat, co termín zonna hardening znamená. Autoři uvádí, že zonna hardening se objevuje ve spojitosti se změnami fyzikálních vlastností zonny pellucidy, kdy dochází k vyztužení zonální matrice. Zona hardening je ale také běžněji spojován se zvýšenou odolností zonny pellucidy vůči proteolytickému štěpení. Tyto dva faktory by neměly být spojovány, neboť existují určité důkazy, že zvýšení odolnosti ZP vůči proteolytickému štěpení není vždy doprovázeno zvýšením mechanické tuhosti.

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V rámci disertační práce byly stanoveny následující cíle:

- 1) Charakterizovat distribuci kortikálních granul u nezralých prasečích oocytů izolovaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu.
- 2) Charakterizovat migraci kortikálních granul u prasečích oocytů izolovaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu na konci meiotického zrání.
- 3) Charakterizovat vztah mezi účinností kortikální reakce a fertilizace u prasečích oocytů izolovaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu.

Pro tyto cíle pak byly stanoveny odpovídající výzkumné hypotézy:

- 1) Prasečí oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí se navzájem liší ve stupni zralosti cytoplazmy v době jejich izolace.
- 2) Oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí se liší v distribuci kortikálních granul po dokončení meiotického zrání.
- 3) Fertilizace oocytů s nižší meiotickou kompetencí je doprovázena vyšším výskytem polyspermicky oplozených oocytů v důsledku méně efektivní kortikální reakce.

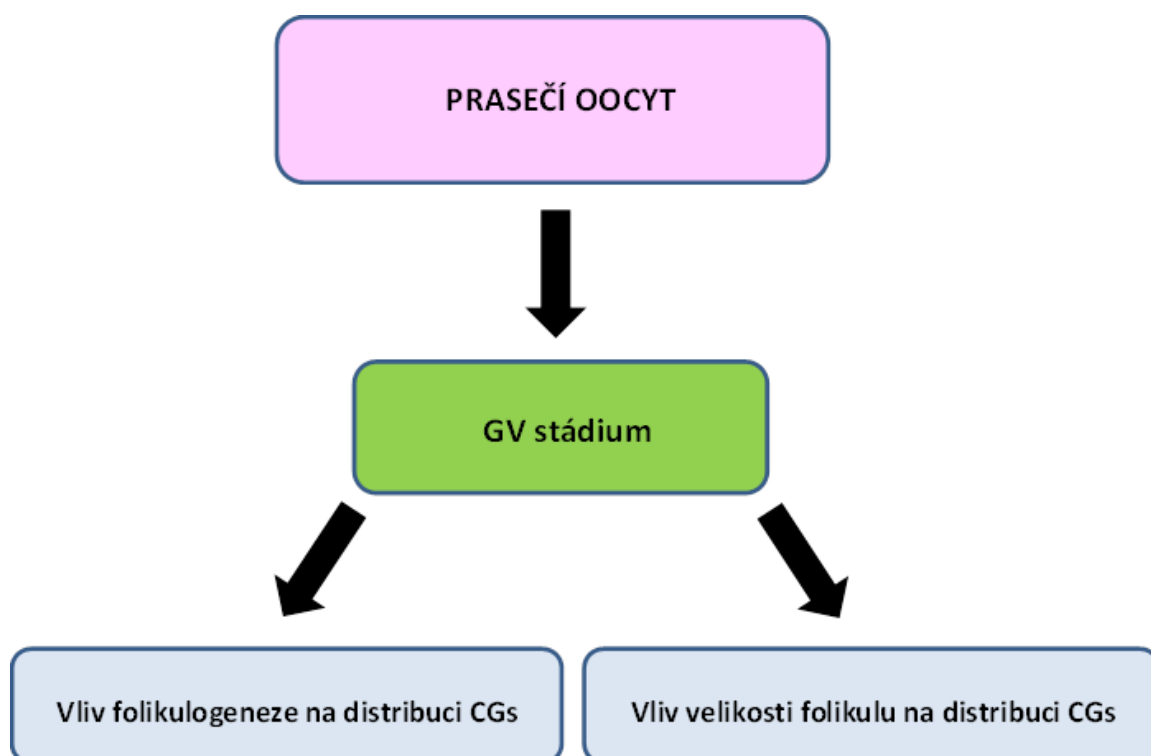


## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Experiment 1

Cílem **Experimentu 1** bylo prokázat vliv velikosti folikulů a fáze estrálního cyklu na lokalizaci kortikálních granul v cytoplasmě nezralých prasečích oocytů.

Základní experimentální schéma:



#### 4.1.1 Materiál a metodika

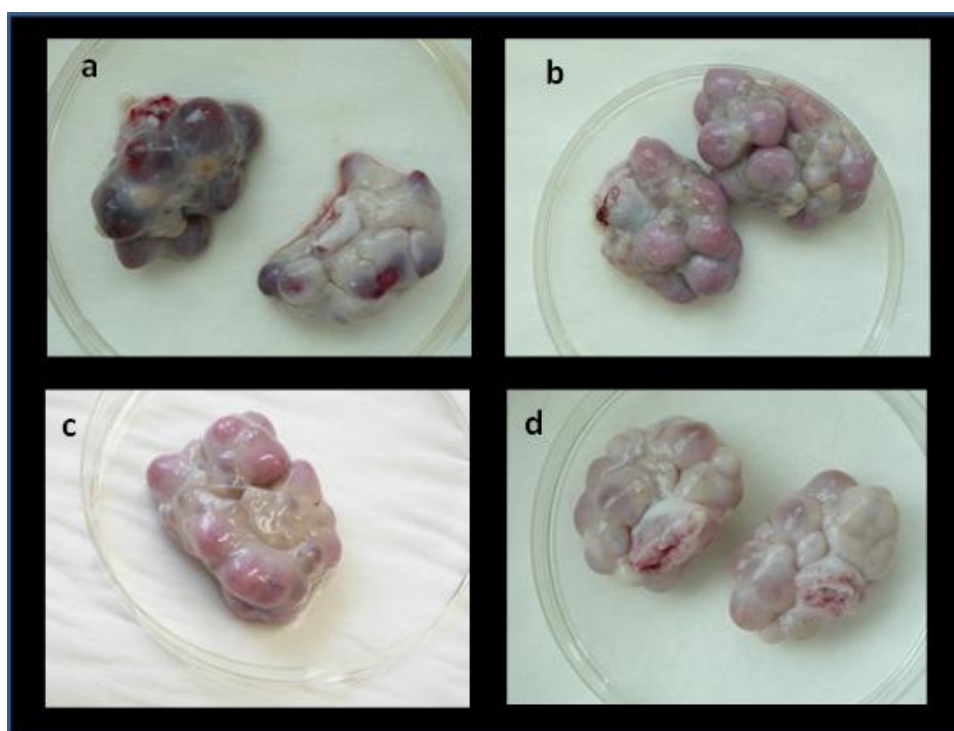
##### Donorky oocytů

Pro experiment byla vybrána ovária z pohlavně dospělých cyklujících prasnic, hybridní kombinace plemen Landrace x České bílé ušlechtilé. Zvířata byla porážena na experi-

mentálních jatkách. Ovária byla transportována do laboratoře nejpozději do 2 hodin od porážky zvířat při kontrolované teplotě 31-33 °C

### Selekce ovárií

Do experimentu byla vybrána pouze ovária s odpovídajícím morfologickým statusem folikulů a žlutých tělísek. Ovária byla rozdělena podle fáze estrálního cyklu na časnou (1-5 den cyklu), střední (6-10 den cyklu) a pozdní (11-14 den cyklu) luteální fázi a časnou (15-16 den cyklu) folikulární fázi (**Obr.1**).

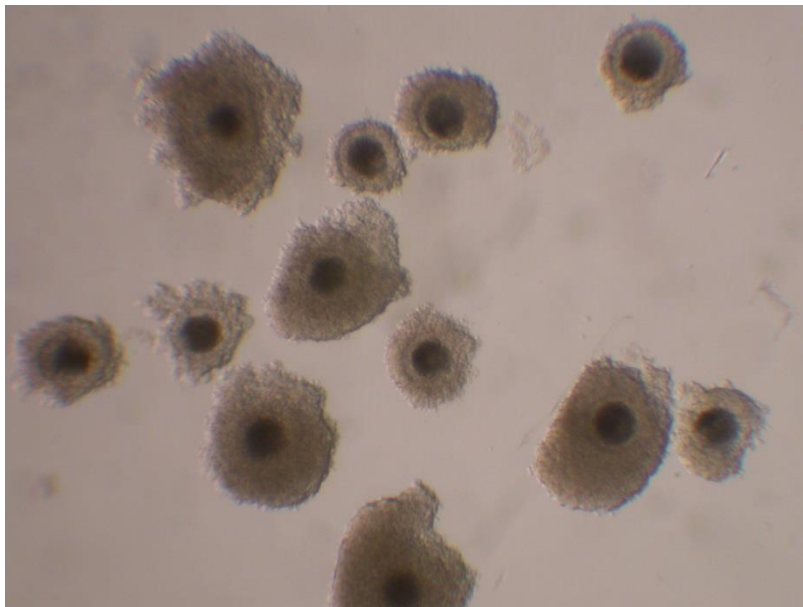


**Obr. 1:** Ovária s odpovídajícím morfologickým statusem rozdělená dle fáze estrálního cyklu na a: časnou luteální (1-5 den cyklu), b: střední luteální (6-10 den cyklu), c: pozdní luteální (11-14 den cyklu) a d: časnou folikulární (15-16 den cyklu) fázi.

### Izolace oocytů

K experimentu bylo použito 185 oocytů izolovaných z předem vybraných ovárií rozdělených podle příslušné fáze estrálního cyklu. Izolace oocytů proběhla dvěma způsoby – aspirací a totální disekcí korové vrstvy. Aspirací byly získány oocyty ze středně velkých folikulů (5-9 mm) a následně byly totální disekcí korové vrstvy získány oocyty z malých folikulů ( $\leq 5$ mm). K experimentu byly použity pouze oocyty s kompaktním

zdravým kumulem čítajícím nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk s tmavou nebo lehce granulovanou cytoplasmou (**Obr.2**).

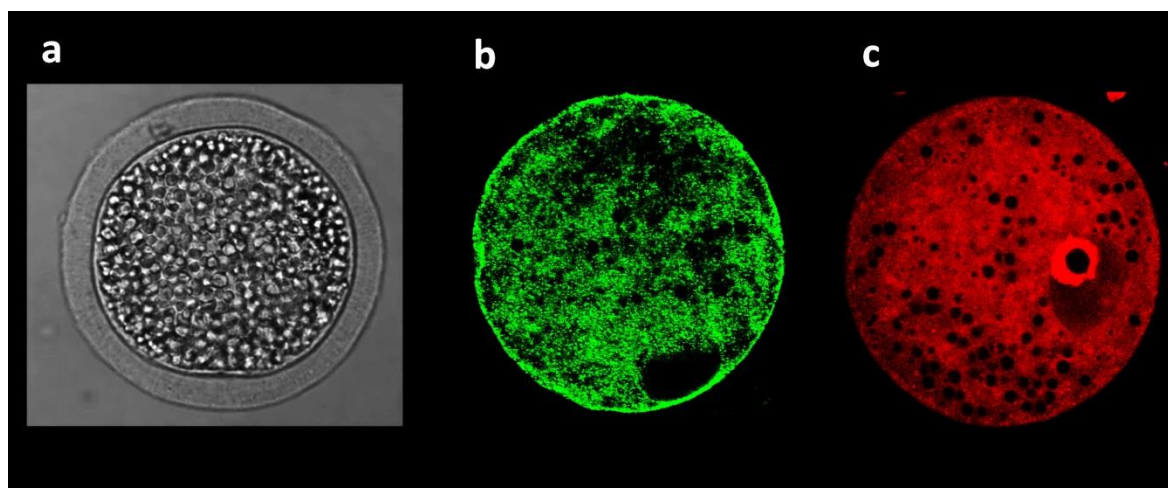


**Obr. 2:** Vyselektované oocyty s kompaktním kumulem a tmavou homogenní cytoplasmou.

### **Barvení kortikálních granul**

K barvení kortikálních granul byla použita metodika popsaná v práci Yoshidy et al. (1993) s několika úpravami dle Wang et al. (1997). Po denudaci kumulárních buněk, za pomoci vortexu, byly oocyty fixovány 3,7 % paraformaldehydem po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po fixaci byly oocyty 3krát promyty v proplachovacím médiu PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma) po dobu 10 minut (každé promytí). Po oplachu byly oocyty permeabilizovány 1 % Tritonem X-100 (Sigma) v PBS po dobu 60 minut. Po permeabilizaci byly oocyty znovu promyty v PBS obsahujícím 0,4 % BSA 3krát 10 minut. Po vyjmutí z proplachovacího média byly oocyty barveny pomocí specifického lektinu PNA (peanut agglutinin) (Sigma) konjugovaného s fluorescenční sondou fluorescein isothiocyanate (FITC) v PBS po dobu 30 minut ve tmě. Po obarvení byly oocyty promyty v proplachovacím médiu (PBS + 0,4 % BSA) 3krát po dobu 10 minut. Jáderný chromatin byl obarven pomocí fluorescenční sondy SYTOX Orange (Vectashield medium, Vector Lab, Burlingame, CA) obsahující 1 $\mu$ M DNA barvivo (SYTOX Orange,

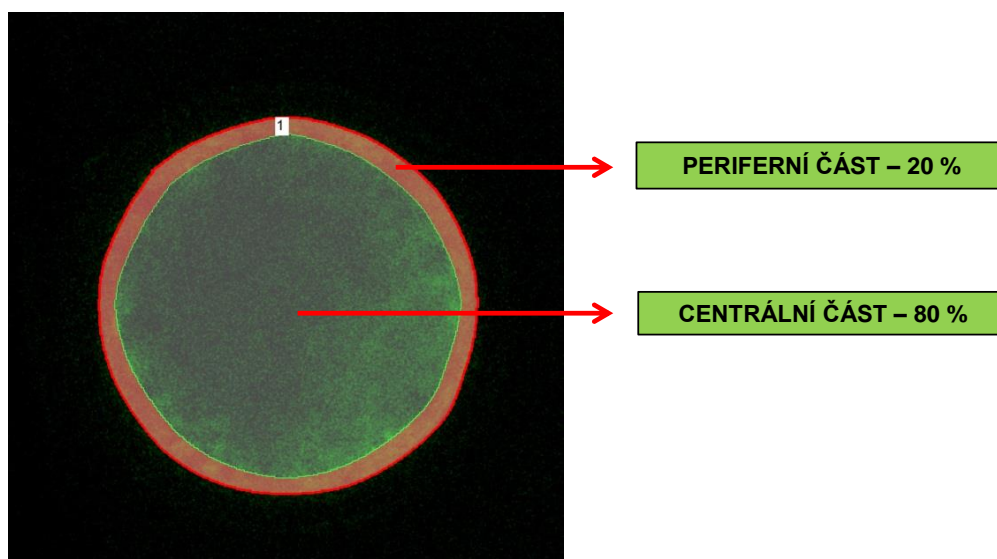
Invitrogen). Po finálním barvení byly obarvené oocyty jednotlivě umístěny na teflonové podložní sklíčko a pozorovány pod konfokálním mikroskopem (**Obr. 3**).



**Obr. 3:** Optické řezy z konfokálního mikroskopu zachycující **a:** nativní oocyt, **b:** kortikální granula po obarvení oocyty fluorescenční sondou FITC-PNA, **c:** jaderný chromatin po obarvení fluorescenční sondou SYTOX Orange.

### Vizualizace a hodnocení distribuce kortikálních granul u nezralých oocytů

K vizualizaci obarvených kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP 2 (Leica TCS SP2 AOBS; Leica, Heidelberg, Germany). K hodnocení lokalizace kortikálních granul byly použity získané optické řezy (**Obr. 3**), které byly následně hodnoceny pomocí zobrazovacího softwaru NIS Elements AR 3.00 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Za pomoci analýzy obrazu bylo vyhodnoceno zastoupení kortikálních granul v centrální a periferní části (**Obr. 4**). Během analýzy obrazu byla plocha optického řezu rozdělena na dvě oblasti. První se nacházela na periférii těsně pod cytoplazmatickou membránou a představovala 20 % plochy řezu. Zbylá část optického řezu byla nazvána jako centrální část a zaujímala 80 % plochy řezu.



**Obr. 4:** Hodnocení zastoupení kortikálních granul v centrální a periferní části nezralého oocyty.

Podílem průměrné intenzity signálu, získaného z periferní části a signálu získaného z centrální části, byl vypočítán index distribuce kortikálních granul ( $I_{dkg}$ ), který vypovídá o přesunu kortikálních granul z centrální do periferní části.

$$I_{dkg} = \frac{\text{průměrná intenzita fluorescenčního signálu v periferní části cytoplazmy}^1}{\text{průměrná intenzita fluorescenčního signálu v centrální části cytoplazmy}^2}$$

- (1)  $\sum$  intenzit fluorescenčního signálu/ 20 % plochy oocyty v ekvatoriální rovině
- (2)  $\sum$  intenzit fluorescenčního signálu/ 80 % plochy oocyty v ekvatoriální rovině

#### 4.1.2 Statistické vyhodnocení

Všechna získaná data byla podrobena statistickému vyhodnocení jednofaktorovou analýzou ANOVA verze (StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA, data analysis software system, version 10.) a Fisherově (LSD) testu. Rozdíly na hladině významnosti  $P < 0.05$  byly považovány za statisticky průkazné. Průměrná data v tabulkách byla uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka výběru.

### 4.1.3 Výsledky

Nezralé oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu, vykazovaly statisticky průkazné rozdíly v lokalizaci kortikálních granul v cytoplazmě. Získané indexy distribuce kortikálních granul byly vzájemně porovnány s ohledem na velikost folikulů, ze kterých byly oocyty izolovány, a rovněž s ohledem na fázi estrálního cyklu.

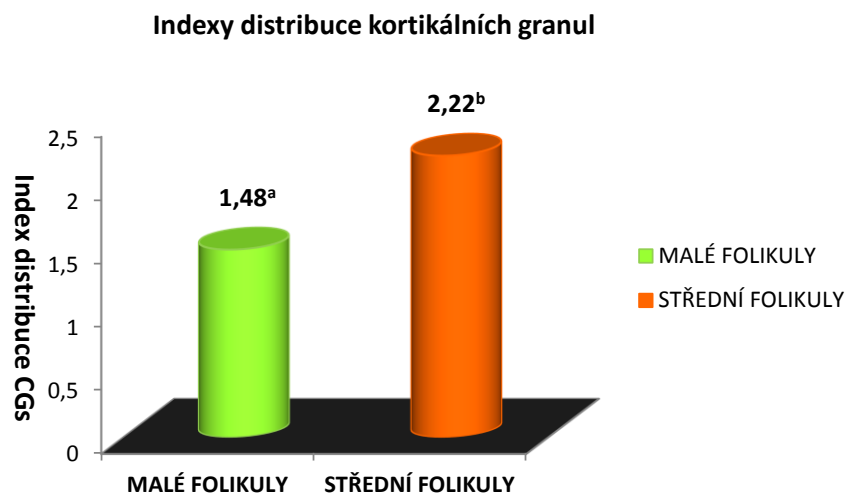
#### Efekt velikosti folikulu

Hodnoty indexů distribuce kortikálních granul ( $I_{dkg}$ ) u oocytů získaných z malých a středních folikulů, bez ohledu na fázi estrálního cyklu, jsou uvedeny v tabulce 1 a přehledně znázorněny v grafu 1.

**Tab. 1:** Distribuce kortikálních granul u nezralých prasečích oocytů získaných z malých a středních folikulů

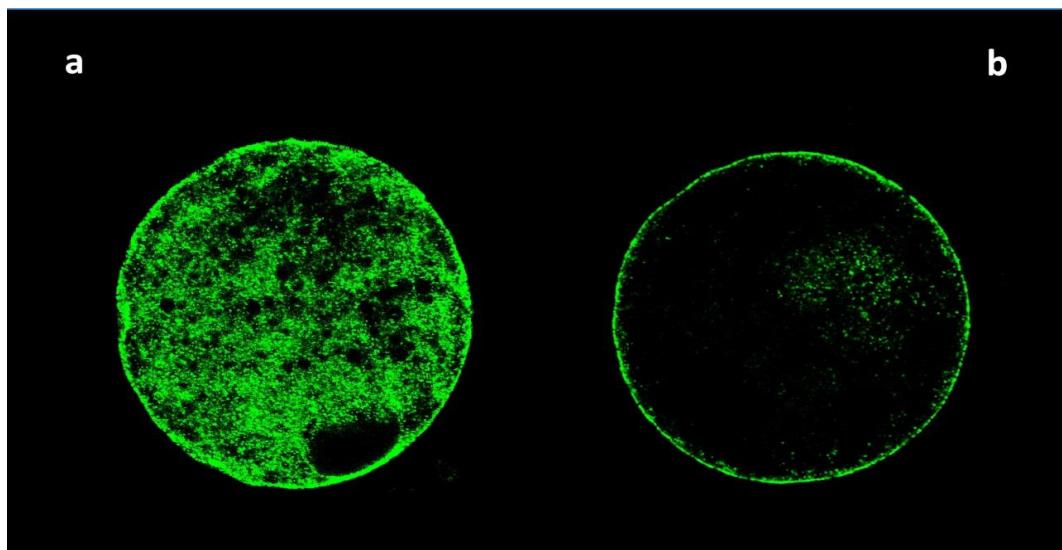
Velikost folikulů	Oocyty ve stádiu GV	
	počet vyšetřených oocytů	Index distribuce kortikálních granul $I_{dkg}$ (mean $\pm$ SD)
Malé	134	1,48 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31
Střední	51	2,22 <sup>b</sup> $\pm$ 0,49

a,b – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$



**Graf 1:** Srovnání indexu distribuce kortikálních granul u nezralých oocytů v závislosti na velikosti folikulů.

Rozdíl hodnot  $I_{dkg}$  mezi oocyty s vyšší meiotickou kompetencí ze středních folikulů a s nižší meiotickou kompetencí získaných z malých folikulů byl statisticky významný ( $P < 0,05$ ). Index zjištěný u méně meioticky kompetentních oocytů ( $I_{dkg} = 1,48 \pm 0,31$ ) ukazuje tendenci centrální orientace kortikálních granul v cytoplazmě (**Obr. 5**). Na druhé straně u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí ukázal index téměř dvojnásobně vyšší koncentraci kortikálních granul na periferii korové vrstvy oocytu ( $I_{dkg} = 2,22 \pm 0,49$ ) (**Obr. 5**). Výsledky ukázaly, že k pohybu kortikálních granul směrem k periferní vrstvě oocytu dochází již u nezralých oocytů v průběhu nabývání jejich meiotické kompetence.



**Obr. 5:** Optické řezy z konfokálního mikroskopu zachycující kortikální granula nezralých oocytů získaných z malých folikulů (**a**) a ze středních folikulů (**b**).

### Efekt velikosti folikulu a fáze estrálního cyklu

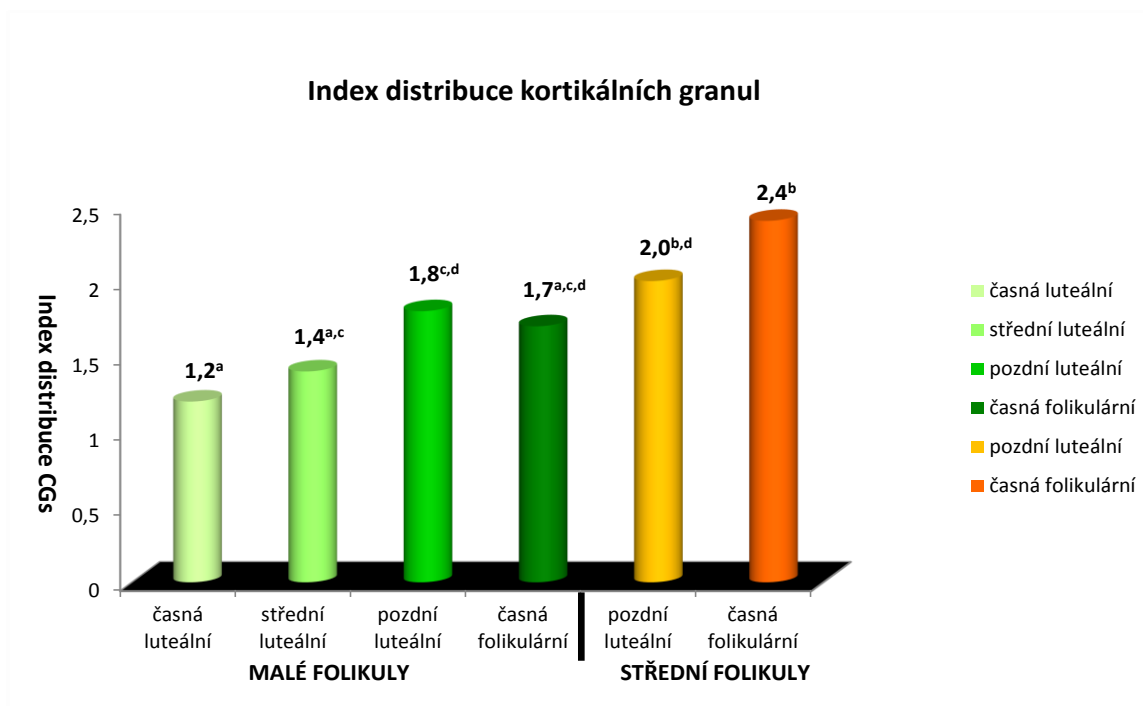
**Tabulka 2** uvádí rozdílné hodnoty indexu distribuce kortikálních granul u oocytů získaných z různě velkých folikulů v odlišné fázi estrálního cyklu. Grafické znázornění (**Graf 2**) vyjadřuje kinetiku změn v distribuci kortikálních granul ( $I_{dkg}$ ) v průběhu estrálního cyklu.

**Tab. 2:** Distribuce kortikálních granul u nezralých prasečích oocytů získaných z malých a středních folikulů s ohledem na fázi estrálního cyklu

Folikulogeneze			Oocyty ve stádiu GV	
Velikost folikulů	Fáze	Stádium	Počet vyšetřených oocytů	Index distribuce kortikálních granul $I_{dkg}$ (mean $\pm$ SD)
Malé	Luteální	časná	51	1,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4
		střední	36	1,4 <sup>a,c</sup> $\pm$ 0,5
		pozdní	31	1,8 <sup>c,d</sup> $\pm$ 0,7
	Folikulární	časná	16	1,7 <sup>a,c,d</sup> $\pm$ 0,4
Střední	Luteální	pozdní	22	2,0 <sup>b,d</sup> $\pm$ 0,7
	Folikulární	časná	29	2,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,6

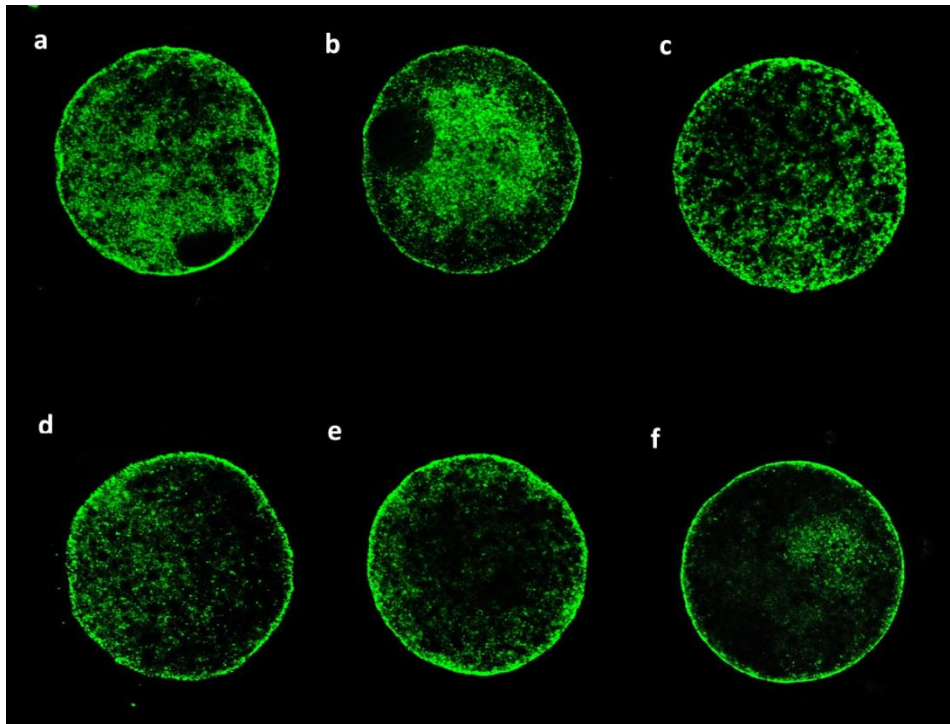
a,b,c,d – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$





**Graf 2:** Znázornění indexu distribuce kortikálních granul u nezralých oocytů v závislosti na velikosti folikulů a fázi estrálního cyklu.

Zjištěné indexy ukazují, že s jednotlivými fázemi cyklu se mění centrální lokalizace kortikálních granul, která se se zvyšující meiotickou kompetencí oocyty mění na lokalizaci periferní. U oocytů získaných z malých folikulů byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly mezi  $I_{dkg}$  časně luteální fáze ( $I_{dkg} = 1,2 \pm 0,4$ ) a pozdní luteální fáze ( $I_{dkg} = 1,8 \pm 0,7$ ). Mezi ostatními fázemi nebyl statisticky průkazný rozdíl nalezen. U oocytů získaných ze středních folikulů nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi pozdní luteální a časnou folikulární fází, byl však nalezen statisticky průkazný rozdíl mezi oocyty získanými ze středních folikulů v časně folikulární fázi ( $I_{dkg} = 2,4 \pm 0,6$ ) a všemi fázemi cyklu u oocytů získaných z malých folikulů (časná luteální ( $I_{dkg} = 1,2 \pm 0,4$ ); střední luteální ( $I_{dkg} = 1,4 \pm 0,5$ ); pozdní luteální ( $I_{dkg} = 1,8 \pm 0,7$ ); časná folikulární fáze ( $I_{dkg} = 1,7 \pm 0,4$ )). Statisticky průkazný rozdíl byl také nalezen mezi pozdní luteální fází u oocytů získaných ze středních folikulů ( $I_{dkg} = 2,0 \pm 0,7$ ) a mezi časnou a střední luteální fází ( $I_{dkg} = 1,2 \pm 0,4$ ;  $I_{dkg} = 1,4 \pm 0,5$ ) oocytů získaných z malých folikulů. Tyto výsledky potvrdily, že se migrace kortikálních granul spouští již u nezralých oocytů s nabýváním jejich meiotické kompetence a s průběhem folikulogeneze dochází k jejich přesunu na periferii oocyty (**Obr. 6**).

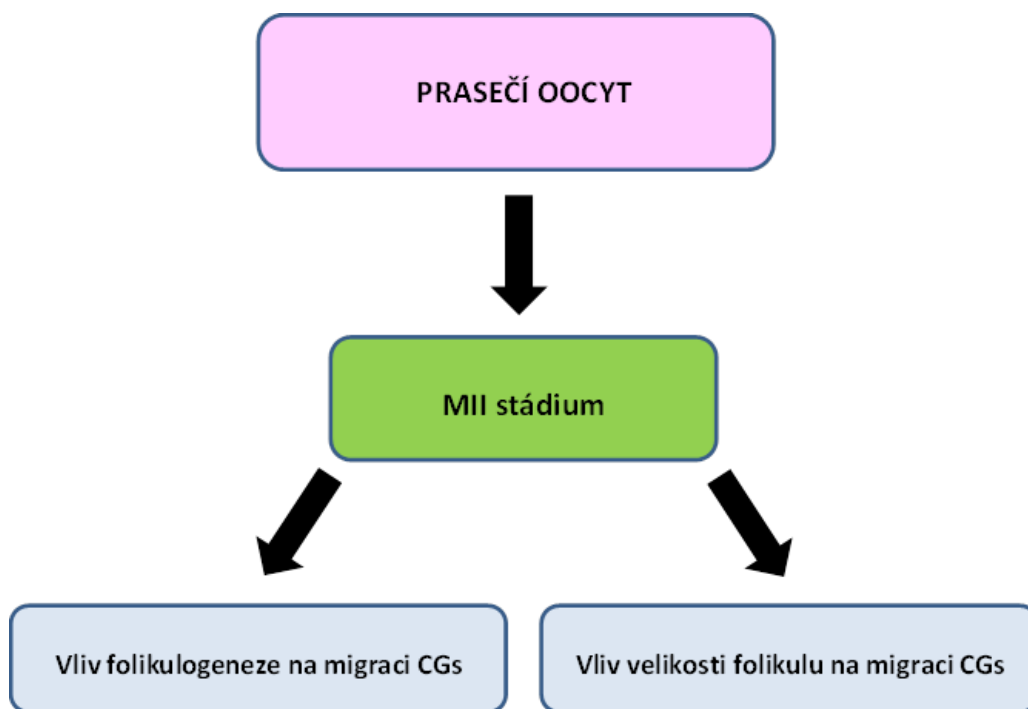


**Obr. 6:** Optické řezy z konfokálního mikroskopu zachycující kortikální granula oocytů v jednotlivých fázích estrálního cyklu (**a**: časná luteální fáze 1-5 den cyklu; **b**: střední luteální fáze 6-10 den cyklu; **c**: pozdní luteální fáze 11-14 den cyklu; **d**: časná folikulární fáze 15-16 den cyklu; **e**: pozdní luteální fáze středního folikulu 11 – 14 den cyklu; **f**: časná folikulární fáze středního folikulu 15 – 16 den cyklu).

## 4.2 Experiment 2

Cílem **Experimentu 2** bylo prokázat vliv velikosti folikulů a fáze estrálního cyklu na distribuci kortikálních granul v cytoplasmě zralých prasečích oocytů.

Základní experimentální schéma:



### 4.2.1 Materiál a metodika

#### Donorky oocytů

Do experimentu byla zařazena ovária z pohlavně dospělých cyklujících prasnic, hybridní kombinace plemen Landrace x České bílé ušlechtilé, které byly poráženy na experimentálních jatkách. Ovária byla transportována do laboratoře nejpozději do 2 hodin od porážky zvířat při kontrolované teplotě 31- 33 °C.

### **Selekce ovárií**

Do experimentu byla vybrána pouze ovária s odpovídajícím morfolo­gickým stá­tem folikulů a žlutých tělísek (**Obr.1**). Ovária byla rozdělena podle fáze estrálního cyklu na časnou (1-5 den cyklu), střední (6-10 den cyklu) a pozdní (11-14 den cyklu) luteální fázi a časnou (15-16 den cyklu) folikulární fázi.

### **Izolace oocytů**

V experimentu bylo vyšetřeno 186 oocytů získaných z předem vybraných ovárií rozdělených podle příslušné fáze estrálního cyklu. Izolace oocytů proběhla stejně jako v případě Experimentu 1. K experimentu byly použity pouze oocyty s kompaktním zdravým kumulem čítajícím nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk s tmavou nebo lehce granulovanou cytoplasmou (**Obr.2**).

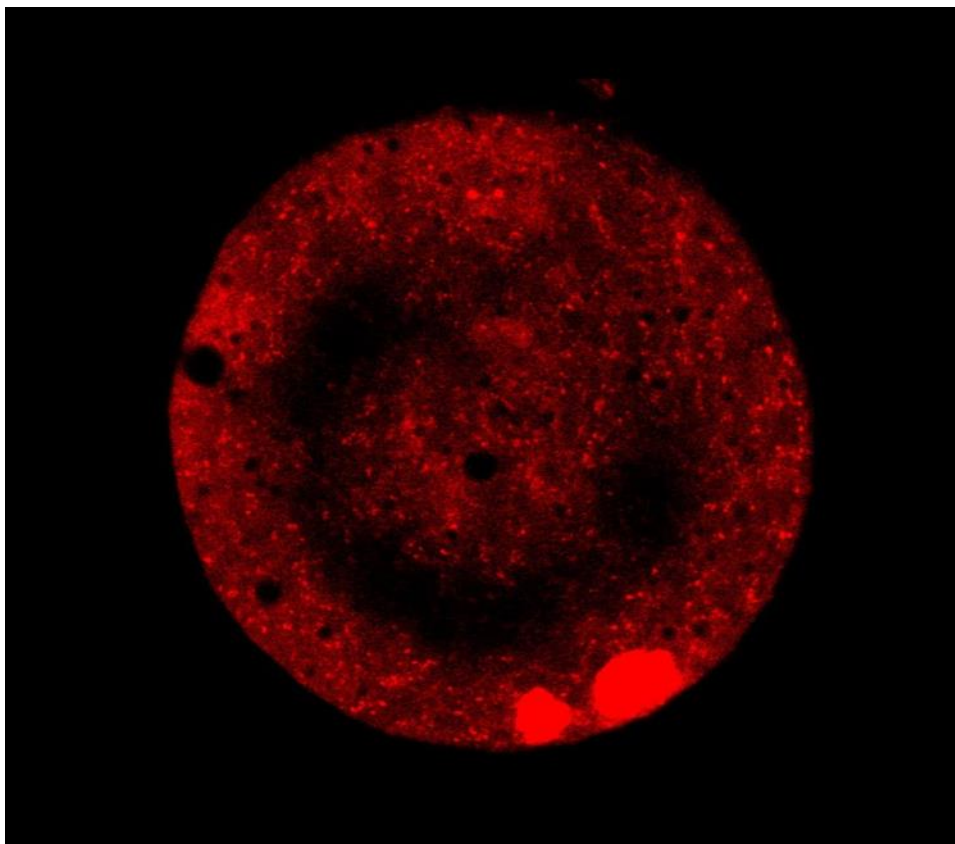
### **Zrání oocytů**

Všechny chemikálie použité v tomto experimentu byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Praha, Česká republika), pokud není uvedeno jinak. Zrání oocytů probíhalo ve skupinách 25 – 30 oocytů, s odpovídajícím morfolo­gickým stá­tem v 500  $\mu$ l zráního média sestaveného z komerčního média TCM-199 médium (Earle's salts). Médium bylo obohaceno o 0,20 mM pyruvát sodný, 0,57 mM cysteamin, 50 IU  $\text{ml}^{-1}$  penicillin, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycin, 10 % BFS (bovinní fetální sérum), a o gonadotropiny (P.G.600 15 IU  $\text{ml}^{-1}$ , Intervet, Holland). Zrání probíhalo ve čtyřjamkových mikroplo­tnách Nunc (Nunc, Intermed, Denmark) po dobu 44 h při 39  $^{\circ}\text{C}$  ve zvlhčené atmosféře s 5 %  $\text{CO}_2$ . Průměrná úspěšnost zrání byla 85 %.

### **Barvení kortikálních granul**

K obarvení kortikálních granul byla použita metodika popsaná v práci Yoshidy et al. (1993) a Wang et al. (1997). Dílčími experimenty bylo zjištěno, že pro úspěšný průběh finálního experimentu byla nutná modifikace převzaté metodiky. Tato úprava spočívala ve zkrácení doby promývání obarvených oocytů v proplachovém médiu PBS obsahujícím 0,4 % BSA pouze na 3krát 2 min. Tato úprava byla nutná pro zachování dostatečného množství fluorescenčního barviva vázaného na kortikální granula. Denudované oocyty byly fixovány 3,7 % paraformaldehydem po dobu 60 minut při laboratorní teplo-

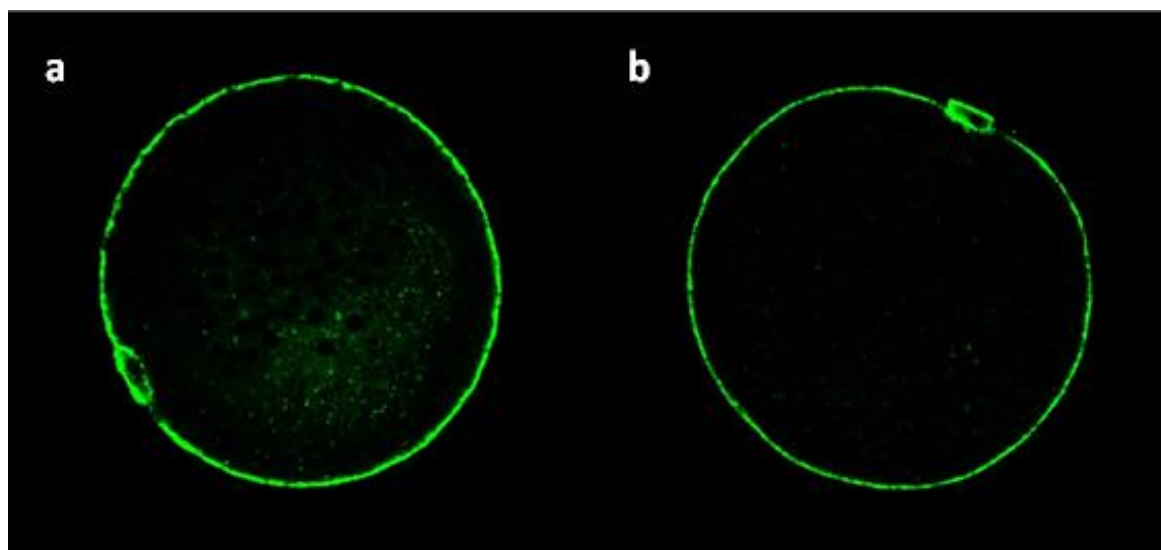
tě a následně 3krát promyty v PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma) po dobu 10 minut (každé promytí). Po oplachu byly oocyty permeabilizovány 1% Tritonem X-100 (Sigma) v PBS po dobu 60 minut a znovu promyty v PBS, obsahujícím 0,4 % BSA, 3krát 10 minut. Po vyjmutí z proplachovacího média byly oocyty barveny pomocí specifického lektinu PNA (peanut agglutinin) (Sigma) konjugovaného s fluorescenční sondou fluorescein isothiocyanate (FITC) v PBS po dobu 30 minut ve tmě. Po obarvení byly oocyty propláchnuty v proplachovacím médiu (PBS + 0,4 % BSA) 3krát 2 minut. Jaderný chromatin byl obarven pomocí fluorescenční sondy SYTOX Orange (Vectashield medium (Vector Lab, Burlingame, CA) obsahující 1 $\mu$ M DNA barvivo (SYTOX Orange, Invitrogen). Po finálním barvení byly obarvené oocyty jednotlivě umístěny na teflonové podložní sklíčko a pozorovány pod konfokálním mikroskopem. Do tohoto experimentu byly zařazeny pouze oocyty, u kterých bylo prokázáno, že se nachází ve stádiu MII (**Obr.7**).



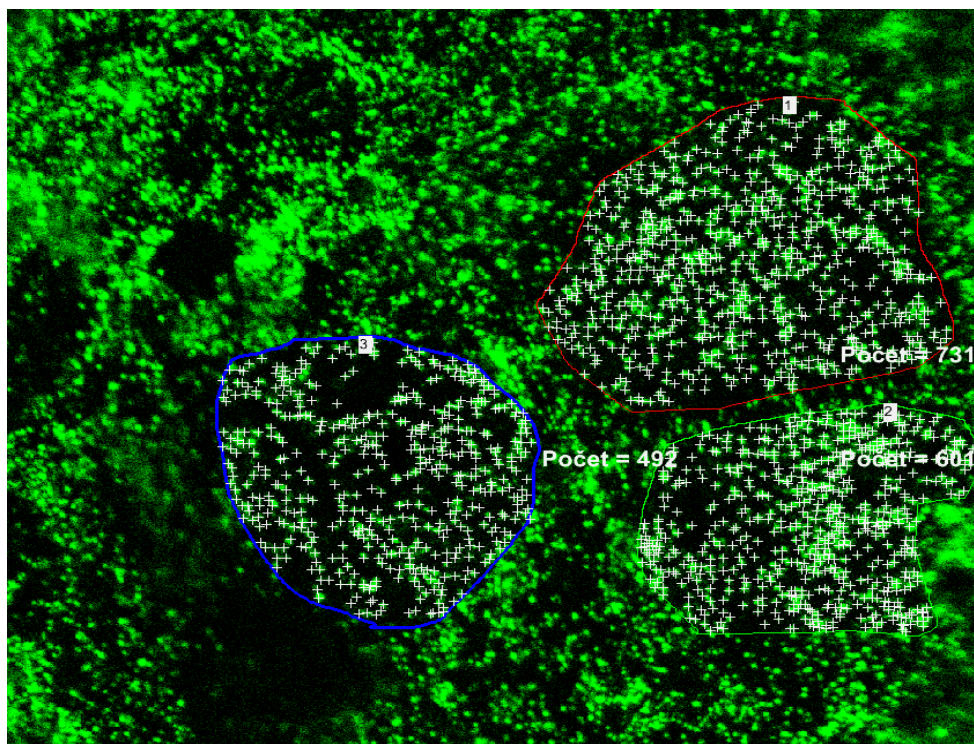
**Obr.7:** Jaderný chromatin zralého oocyty (MII stádium) obarvený pomocí fluorescenční sondy SYTOX Orange.

### Vizualizace a hodnocení distribuce kortikálních granul u zralých oocytů

K vizualizaci kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP 2 (Leica TCS SP2 AOBS; Leica, Heidelberg, Germany). Vzhledem ke skutečnosti, že u zralých oocytů jsou již všechna kortikální lokalizována v periferní části oocytu (**Obr. 8**), byla distribuce kortikálních granul vyjádřena jejich denzitou na apikálním pólu oocytu. Získané optické řezy byly hodnoceny pomocí zobrazovacího softwaru NIS Elements AR 3.00 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic). Analýzou obrazu byla spočítána denzita kortikálních granul ve třech rovnoměrně rozložených oblastech optického řezu o homogenní velikosti pohybující se od  $700 - 1000 \mu\text{m}^2$ , ze kterých se následně vypočetla průměrná hodnota (**Obr. 9**). Získaná hodnota byla převedena na finální hodnotící parametr – **počet kortikálních granul /  $100 \mu\text{m}^2$** .



**Obr. 8:** Reprezentativní snímky z konfokálního mikroskopu zachycující rozložení kortikálních granul prasečího oocytu na periférii **a:** zralého oocytu získaného z malého folikulu a **b:** zralého oocytu získaného ze středního folikulu.



**Obr.9:** Optické řezy apikálního pólu oocyty se třemi hodnocenými oblastmi denzity kortikálních granul

#### 4.2.2 Statistické vyhodnocení

Všechna získaná data byla podrobena statistickému vyhodnocení jednofaktorovou analýzou ANOVA verze (StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA, data analysis software system, version 10.) a Fisherově (LSD) testu. Rozdíly na hladině významnosti  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky průkazné. Průměrná data v tabulkách byla uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka výběru.

#### 4.2.3 Výsledky

Zralé oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, získané z malých a středních folikulů v jednotlivých fázích folikulogeneze, ukázaly statisticky průkazné rozdíly v počtu kortikálních granul v cytoplazmě. Získané hodnoty byly vzájemně porovnány s ohledem na velikost folikulů, ze kterých byly oocyty izolovány, a rovněž s ohledem na fázi estrálního cyklu.

### Efekt velikosti folikulu

V tabulce 3 jsou srovnávány počty kortikálních granul na  $100 \mu\text{m}^2$  korové vrstvy u oocytů získaných z malých a středních folikulů po zrání in vitro. Výsledky ukázaly statisticky průkazný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi experimentálními skupinami. Hustota kortikálních granul zaznamenaná u meioticky kompetentnějších oocytů izolovaných ze středních folikulů dosáhla průměrné hodnoty  $59,31 \pm 13,2$  CGs/ $100 \mu\text{m}^2$ , zatímco u oocytů s nižší meiotickou kompetencí izolovaných z malých folikulů vykazovala průměrnou hodnotu hustoty CGs  $73,89 \pm 18,7$  CGs/ $100 \mu\text{m}^2$ . Tyto výsledky prokázaly, že při procesu zrání in vitro dochází se zvyšující se meiotickou kompetencí oocytu k signifikantnímu úbytku počtu CGs na  $100 \mu\text{m}^2$  korové vrstvy ooplasmu. Změny počtu kortikálních granul v korové vrstvě oocytu jsou graficky znázorněny v grafu 3.

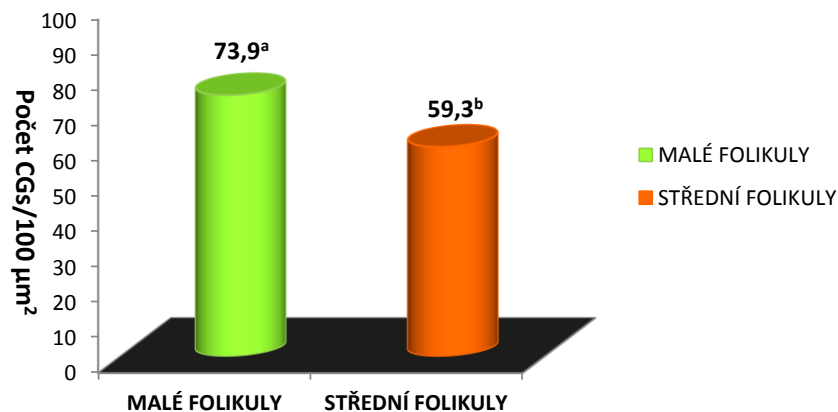
**Tab 3:** Počet kortikálních granul přítomných v periferní části zralých prasečích oocytů získaných z různě velkých folikulů

Velikost folikulů	Oocyty	
	počet vyšetřených oocytů	Počet CGs/ $100 \mu\text{m}^2$ korové vrstvy (mean $\pm$ SD)
Malé	118	$73,9^a \pm 18,8$
Střední	68	$59,3^b \pm 13,3$

a,b – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$



### Denzita kortikálních granul v korové vrstvě zralých oocytů



**Graf 3:** Počet kortikálních granul přítomných na periferii zralých oocytů získaných z malých a velkých folikulů

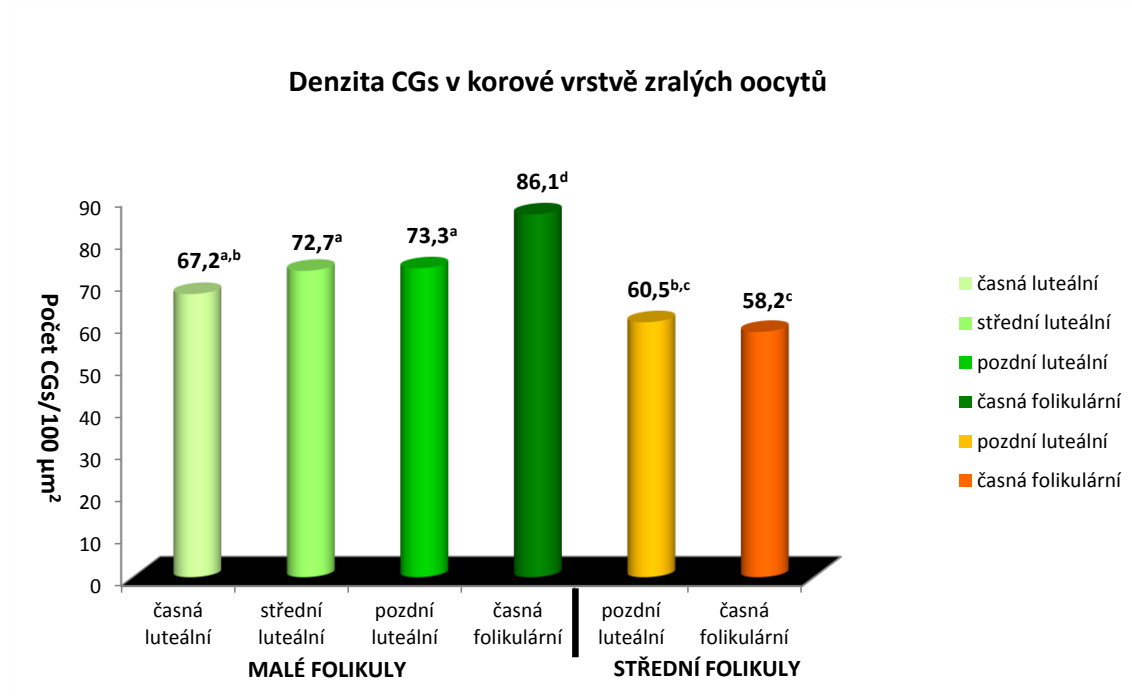
Tabulka 4 reprezentuje hodnoty hustoty kortikálních granul na 100 μm<sup>2</sup> korové vrstvy u oocytů získaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu po maturaci in vitro. Grafické zobrazení denzity kortikálních granul ukázalo pozvolný nárůst hustoty CGs u oocytů z malých folikulů od časně luteální až do pozdní luteální fáze. Toto zvýšení nebylo podloženo statisticky průkaznými rozdíly. Statisticky významné zvýšení hustoty CGs vykazala až skupina oocytů v časně folikulární fázi ( $86,1 \pm 18,6$ ) v porovnání s ostatními skupinami oocytů získaných z malých folikulů ( $P < 0,05$ ). Hustota kortikálních granul se pohybovala u experimentálních skupin oocytů získaných ze středních folikulů v průměrných hodnotách  $60,5 \pm 12,2$  respektive  $58,2 \pm 13,3$  CGs/100 μm<sup>2</sup>. Tyto hodnoty neukázaly ve vzájemném porovnání statisticky průkazný rozdíl, nicméně statisticky významně se lišily od všech hodnot zaznamenaných u experimentálních skupin oocytů z malých folikulů, vyjma skupiny v časně luteální fázi  $67,2 \pm 24,3$  CGs/100 μm<sup>2</sup>.

**Tab. 4:** Počet kortikálních granul přítomných v periferní části zralých prasečích oocytů získaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu

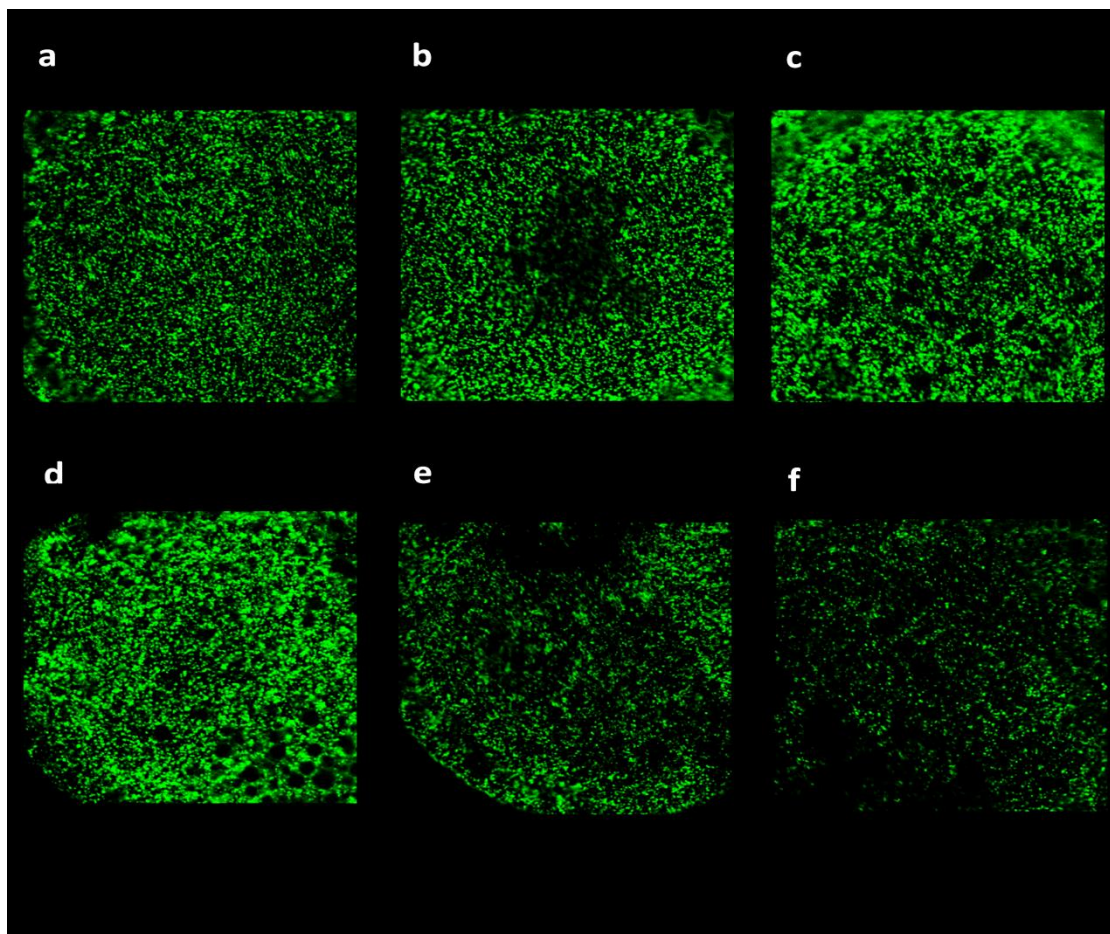
Folikulogeneze			Oocyty	
Velikost folikulů	Fáze	Stádium	Počet vyšetřených oocytů	Počet CGs/100 $\mu\text{m}^2$ korové vrstvy (mean $\pm$ SD)
Malé	Luteální	časná	32	67,2 <sup>a,b</sup> $\pm$ 24,3
		střední	28	72,7 <sup>a</sup> $\pm$ 11,1
		pozdní	36	73,3 <sup>a</sup> $\pm$ 14,8
	Folikulární	časná	22	86,1 <sup>d</sup> $\pm$ 18,6
Střední	Luteální	pozdní	32	60,5 <sup>b,c</sup> $\pm$ 12,2
	Folikulární	časná	36	58,2 <sup>c</sup> $\pm$ 13,3

a,b,c,d – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$

Grafické zobrazení denzity kortikálních granul u zralých oocytů (**Graf 4, Obr. 10**) ukazuje dynamické změny v počtu kortikálních granul během folikulogeneze a zachycuje úbytek kortikálních granul u meioticky vyspělejších oocytů z velkých folikulů.



**Graf 4:** Počet kortikálních granul přítomných v periferní části korové vrstvy zralých prasečích oocytů získaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu

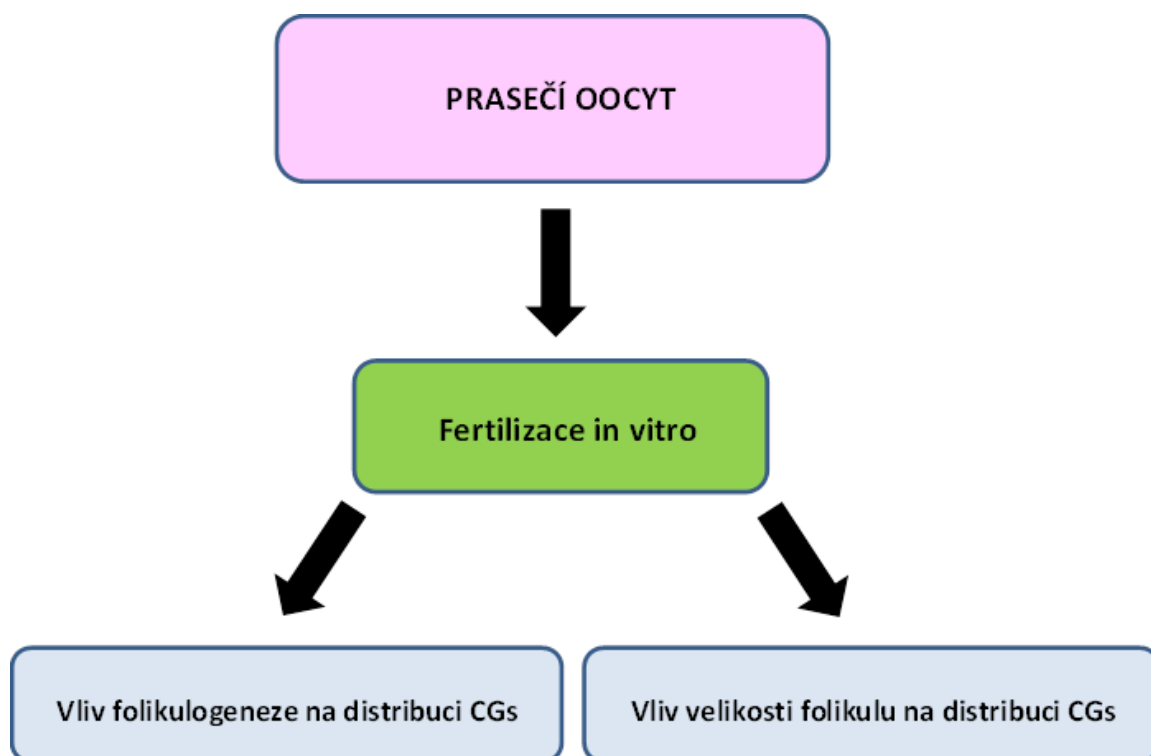


**Obr. 10:** Optické řezy apikálního pólu oocytů zachycující denzitu kortikálních granul na periferii v jednotlivých fázích estrálního cyklu (**a**: časná luteální fáze 1-5 den cyklu; **b**: střední luteální fáze 6-10 den cyklu; **c**: pozdní luteální fáze 11-14 den cyklu; **d**: časná folikulární fáze 15-16 den cyklu; **e**: pozdní luteální fáze středního folikulu 11 – 14 den cyklu; **f**: časná folikulární fáze středního folikulu 15 – 16 den cyklu).

### 4.3 Experiment 3

Cílem **Experimentu 3** bylo ověřit vliv meiotické kompetence oocytů na účinnost kortikální reakce a fertilizace in vitro

Základní experimentální schéma:



#### 4.3.1 Materiál a metodika

##### Donorky oocytů

Do experimentu byla zařazena ovária z pohlavně dospělých cyklujících prasnic, hybridní kombinace plemen Landrace x České bílé ušlechtilé, které byly poráženy na experimentálních jatkách. Ovária byla transportována do laboratoře nejpozději do 2 hodin od porážky zvířat při kontrolované teplotě 31- 33 °C.

### **Selekce ovárií**

Do experimentu byla vybrána pouze ovária s odpovídajícím morfologickým statutem folikulů a žlutých tělísek (**Obr.1**). Ovária byla rozdělena podle fáze estrálního cyklu na časnou (1-5 den cyklu), střední (6-10 den cyklu) a pozdní (11-14 den cyklu) luteální fázi a časnou (15-16 den cyklu) folikulární fázi.

### **Izolace oocytů**

Do experimentu byly zařazeny pouze oocyty získané z ovárií rozdělených podle definovaných fází estrálního cyklu. Izolace oocytů proběhla pomocí aspirace oocytů ze středně velkých folikulů (5 - 9 mm) a totální disekce korové vrstvy, kterou se získaly oocyty z malých folikulů ( $\leq 5$  mm). K experimentu byly použity pouze oocyty s kompaktním zdravým kumulem čítajícím nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk s tmavou nebo lehce granulovanou cytoplasmou (**Obr.2**).

### **Zrání oocytů**

Všechny chemikálie použité v tomto experimentu byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Praha, Česká republika), pokud není uvedeno jinak. Zrání oocytů probíhalo ve skupinách 25 - 30 vyizolovaných oocytů, s odpovídajícím morfologickým statutem, v 500  $\mu$ l zracího média sestaveného z komerčního média TCM-199 médium (Earle's salts). Médium bylo obohaceno o 0,20 mM pyruvát sodný, 0,57 mM cysteamin, 50 IU ml<sup>-1</sup> penicilin, 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin, 10 % BFS (bovinní fetální sérum), and o gonadotropiny (P.G.600 15 IU ml<sup>-1</sup>, Intervet, Holland). Zrání probíhalo ve čtyřjamkových mikroplovných Nunc (Nunc, Intermed, Denmark) po dobu 44 h při 39 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Průměrná úspěšnost zrání byla 85 %.

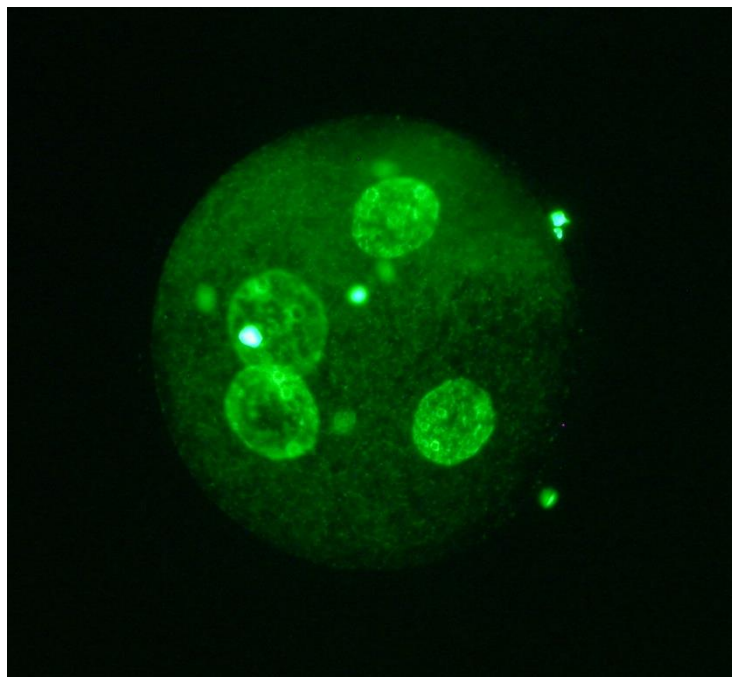
### **Fertilizace oocytů**

Po ukončení IVM byly oocyty za pomoci vortexu denudovány a ve skupinách 25 – 30 oocytů přeneseny do fertilizačního média sestávajícího z modifikovaného Tris buffered média (mTBM) obohaceného o 0,4 % BSA a 1 mM kofein. Pro fertilizaci byl použit kryokonzervovaný ejakulát kance prověřeného v in vitro systému. Inseminační dávka

byla po vytažení z tekutého dusíku ponechána 10 sekund na vzduchu a poté rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Rozmrazený ejakulát byl ekvilibrován 30 min v kultivačním boxu v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub> a teplotě 39 °C. Separace motilních spermií proběhla na gradientu Percollu (45 % Percollu vs. 75 % Percollu) pomocí 8 minutové centrifugace při 520 × g. Sedimentované motilní spermie byly následně 3 minutovou centrifugací promyty v BTS médiu při 250 × g. Získané spermie byly resuspendovány na finální koncentraci 1 × 10<sup>6</sup> spermií/ ml v modifikovaném fertilizačním médiu (mTBM). Spermie byly následně přidány v poměru 10 000 spermií/oocyt. Koinkubace gamet probíhala 3 hodiny při teplotě 39 °C v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Následně byly oocyty krátce promyty a přeneseny do kultivačního média PZM-3 (Porcine zygote medium; Yoshioka et al., 2002), kde byly ponechány po dobu 15 hodin.

### **Hodnocení fertilizace**

Po ukončení kultivace byly oocyty za pomoci vortexování zbaveny zbytků kumulárních buněk a spermií a následně fixovány 3,7 % paraformaldehydem po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Po fixaci byly oocyty krátce promyty v promývacím médiu PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma). Prvojaderný chromatin byl obarven pomocí fluorescenční sondy SYTOX Green (SYTOX Green, Invitrogen) naředěné ve Vectashield médiu (Vector Lab, Burlingame, CA). Obarvené oocyty byly hodnoceny pod epifluorescenčním mikroskopem při 400 násobném zvětšení (**Obr. 11**). Hodnocen byl podíl penetrovaných oocytů, podíl monospermicky oplozených oocytů (přítomnost jednoho samčího a jednoho samičího prvojádra), procentické zastoupení polyspermicky penetrovaných oocytů (přítomnost více než 1 samčího prvojádra) a podíl asynchronního oplození (oocyty s dekondující hlavičkou spermie a samičím prvojádrem nebo oocyty se samčím prvojádrem a metafází II).



**Obr.11:** Polyspermicky oplozený oocyt s jedním samičím a 3 samčími prvojádry

### **Barvení kortikálních granul**

K obarvení kortikálních granul byla použita metoda popsaná v práci Yoshidy et al. (1993) a Wanga et al. (1997) se stejnými modifikacemi jako v případě Experimentu 2. Oocyty po fertilizaci byly krátce vortexovány a následně fixovány 3,7 % paraformaldehydem po dobu 60 minut při laboratorní teplotě a následně 3 krát promyty v PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma) po dobu 10 minut (každé promytí). Po oplachu byly oocyty permeabilizovány 1 % Tritonem X-100 (Sigma) v PBS po dobu 60 minut a znovu promyty v PBS, obsahujícím 0,4 % BSA, 3krát po dobu 10 minut. Po vyjmutí z proplachovacího média byly oocyty barveny pomocí specifického lektinu PNA (peanut agglutinin) (Sigma) konjugovaného s fluorescenční sondou fluorescein isothiocyanate (FITC) v PBS po dobu 30 minut ve tmě. Po obarvení byly oocyty propláchnuty v proplachovacím médiu (PBS + 0,4 % BSA) 3krát po dobu 2 minut. Prvojaderný chromatin byl obarven pomocí fluorescenční sondy SYTOX Orange (Vectashield medium (Vector Lab, Burlingame, CA) obsahující 1 $\mu$ M DNA barvivo (SYTOX Orange, Invitrogen). Po finálním barvení byly obarvené oocyty jednotlivě umístěny na teflonové podložní sklíčko a pozorovány pod konfokálním mikroskopem.

## **Vizualizace a hodnocení distribuce kortikálních granul u oocytů po IVF**

K vizualizaci obarvených kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP 2 (Leica TCS SP2 AOBS; Leica, Heidelberg, Germany). U každého oocytu byla ověřena úspěšnost fertilizace za pomoci vizualizace chromatinu prvojader. Získané optické řezy byly hodnoceny pomocí zobrazovacího softwaru NIS Elements AR 3.00 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic).

### **4.3.2 Statistické vyhodnocení**

Všechna získaná data byla podrobena statistickému vyhodnocení jednofaktorovou analýzou ANOVA verze (StatSoft, Inc. 2011. STATISTICA, data analysis software system, version 10.) a Fisherově (LSD) testu. Rozdíly na hladině významnosti  $P < 0.05$  byly považovány za statisticky průkazné. Průměrná data v tabulkách byla uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka výběru.

### **4.3.3 Výsledky**

#### ***4.3.3.1 Vliv velikosti folikulu na účinnost kortikální reakce***

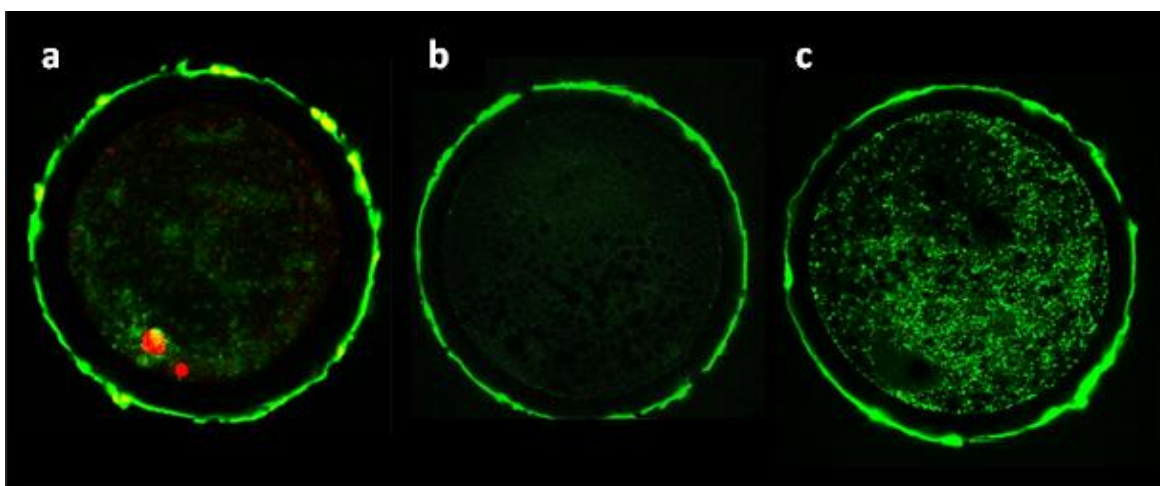
Jak je patrné z tabulky 5 a obrázku 12, výsledky ukázaly, že po fertilizaci se již kortikální granula v cytoplazmě oocytu nachází pouze ojediněle a jejich kvantitativní hodnocení je tak limitováno. Při hodnocení kortikální reakce za 18 hod po inseminaci bylo zjištěno, že po proběhlé fertilizaci (monospermické i polyspermické) všechna kortikální granula podstoupila proces exocytózy s výjimkou kortikálních granul přítomných okolo pólového tělíska. Ověřením tohoto tvrzení byla zjištěná přítomnost kortikálních granul u oocytů, které neúspěšně podstoupily maturaci i fertilizaci in vitro a zůstaly ve stádiu GV.



**Tab. 5:** Distribuce kortikálních granul za 18 h po fertilizaci oocytů získaných z malých a středních folikulů

Velikost folikulů	Fertilizované oocyty	
	Počet vyšetřených oocytů	Počet CGs / 100 $\mu\text{m}^2$ (mean $\pm$ SD)
Malé	20	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
Střední	15	0,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0.4

a,a – označují statisticky neprůkazný rozdíl na hladině významnosti ( $P < 0,05$ )



**Obr. 12:** Reprezentativní snímky z konfokálního mikroskopu zachycující oocyty po proběhlé fertilizaci **a:** oocyt z malého folikulu, **b:** oocyt ze středního folikulu, **c:** nezralý a neoplozený oocyt v GV fázi.

Jak je dále patrné z **tabulky 5**, nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly v distribuci kortikálních granul po inseminaci oocytů s odlišnou meiotickou kompetencí a nebyl zaznamenán ani vliv fáze estrálního cyklu. Zjištěné výsledky naznačily, že hodnocení distribuce kortikálních granul za 18 hod po inseminaci (Wang et al., 1997) není vhodným časovým intervalem pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými subpopulacemi oocytů, neboť u většiny z oplozených oocytů proběhla již kompletní exocytóza. Tuto teorii je však nutné ověřit dalšími pokusy, především experimenty s časovou řadou tak, aby bylo možné porovnat přítomnost kortikálních granul v jednotlivých časových úse-

cích po in vitro fertilizaci. Jako další možnost ověření úspěšnosti kortikální reakce a porovnání jednotlivých populací oocytů se jeví také hodnocení modifikací zonálních proteinů po proběhlé fertilizaci, kterými se nově zabývá laboratoř Reprodukčních biotechnologií na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství.

#### 4.3.3.2 Vliv velikosti folikulu na účinnost fertilizace

Výsledky experimentu získané při porovnání oocytů s nižší a vyšší meiotickou kompetencí ukázaly, že méně kompetentní oocyty pocházející z malých folikulů měly statisticky nižší podíl penetrovaných oocytů (42,1 % vs. 64,2 %) i nižší podíl monospermicky oplozených oocytů (39,1 % vs. 60,8 %) než tomu bylo v případě meioticky kompetentnějších oocytů pocházejících ze středních folikulů (**Tab. 6**). Obě experimentální skupiny se lišily také v procentuálním zastoupení polyspermicky penetrovaných oocytů, kdy statisticky vyšší podíl polyspermicky oplozených oocytů vykazala skupina meioticky méně kompetentních oocytů z malých folikulů (59,4 % vs. 36,9 %).

**Tab. 6:** Hodnocení fertilizace u oocytů pocházejících z malých a středních folikulů

Velikost folikulů	Oocyty				
	inseminované (n)	penetrované (%)	monospermicky (%)	polyspermicky (%)	asynchronně (%)
Malé	152	42,1 <sup>a</sup> ± 15,8	39,1 <sup>a</sup> ± 11,2	59,4 <sup>a</sup> ± 12,3	1,5 ± 0,4
Střední	81	64,2 <sup>b</sup> ± 13,5	60,8 <sup>b</sup> ± 9,2	36,9 <sup>b</sup> ± 11,4	2,3 ± 1,1

a,b – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$

## 5 DISKUZE

Dostatečné množství zralých a oplozeníschopných oocytů s vysokou vývojovou kompetencí je základním předpokladem produkce kvalitních embryí in vitro. Plně zralý oocyt schopný úspěšně podstoupit fertilizaci a embryonální vývoj je výsledkem dlouhého selekčního procesu folikulogeneze, během kterého oocyty rostou a zrají ve folikulárním prostředí (Van den Hurk a Zhao, 2005). Bylo prokázáno, že buněčné a molekulární asociace mezi gametami a somatickými folikulárními buňkami jsou velmi důležité pro správné zrání oocytů, získání meiotické kompetence a vývojového potenciálu (Moor et al., 1990).

Je všeobecně akceptováno, že meiotická kompetence je schopnost oocytu znovuzahájit meiózu a dosáhnout metafáze II (Mermillod et al., 2000). Meiotická kompetence společně s cytoplazmatickým zráním, vyznačujícím se redistribucí organel, dynamikou cytoskeletu a proteosyntetickou aktivitou, jsou nezbytným předpokladem pro dosažení vývojové kompetence oocytu. Přestože studie ukázaly, že plný meiotický potenciál a následná vývojová kompetence jsou získávány během folikulárního vývoje, je také známo, že meiotická progresse a cytoplazmatické zrání závisí na velikosti a stupni atresie folikulů, ze kterých jsou oocyty izolovány (Abeydeera, 2002; Liu et al., 2002, Feng et al., 2007). Marchal et al. (2002), Khatir et al. (2007) a Machatkova et al. (2008) popsali, že oocyty pocházející z velkých a středních folikulů vykazují zvýšený meiotický a vývojový potenciál ve srovnání s oocyty izolovanými z malých folikulů. Schoevers et al. (2007) popsali, že nižší meiotický potenciál, charakteristický pro často používané oocyty izolované z prepubertálních prasniček, je ve vztahu s vyšším výskytem polyspermické penetrace. Nicméně je známo jen málo o schopnosti oocytů pocházejících z folikulů různé velikosti prodělat fertilizaci in vitro. Hulínská et al. (2011) ve své práci uvádí, že prasečí oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, pocházející z různě velkých folikulů, se liší ve schopnosti prodělat normální fertilizaci. Hulínská et al. (2011) dále uvedli, že středně velké folikuly poskytovaly v průběhu experimentu oocyty s vysokou meiotickou kompetencí, u kterých byl výskyt monospermického oplození konstantní a podíl polyspermie nízký. Naproti tomu u méně kompetentních oocytů, pocházejících z malých folikulů, byl podíl polyspermie téměř dvojnásobně vyšší. Srovnatelné výsledky byly dosaženy také během našeho kontrolního experimentu, kdy byl mezi experimentálními

skupinami oocytů s odlišnou meiotickou kompetencí pocházejících z malých a středních folikulů, nalezen statisticky významný rozdíl v podílu polyspermie, přičemž méně kompetentní oocyty z malých folikulů vykazaly podíl polyspermie vyšší ( $60,9 \% \pm 12,3$ ) oproti oocytům pocházejícím ze středních folikulů, kde byl podíl polyspermie  $36,9 \% \pm 11,4$ . Rovněž Marchal et al. (2001) popsal vyšší míru polyspermie u oocytů získaných z prepubertálních prasniček, pro které je typické, že na ováriích mají vysoký počet malých folikulů a oocyty z nich získané se vyznačují mnohem nižší vývojovou i meiotickou kompetencí (Ikeda a Takahashi, 2003; Bagg et al., 2007; Gupta et al., 2008). Problematikou kvality oocytů získaných z folikulů různé velikosti se ve své práci zabývali také Antosik et al. (2009), kteří popsali zvýšení obsahu všech vyšetřovaných RNA messengerů a ZP proteinů u prasečích oocytů izolovaných z velkých a středních folikulů. Jejich výsledky ukázaly, že hladiny transkriptů a proteinů pro vybrané molekuly, které přispívají k fertilizační schopnosti oocytů, jsou u pubertálních prasniček spojeny s folikulární velikostí.

Přestože jsou techniky maturace a fertilizace in vitro již na vysoké úrovni, a podařilo se kultivovat prasečí embrya až do stádia blastocyst (Abeydeera a Day, 1997; Abeydeera et al., 1998), vysoký podíl polyspermie je stále jedním z hlavních nevyřešených problémů provázející IVF program u prasat (Yoshida et al., 1990; Niwa 1993; Abeydeera, 2001). Polyspermická penetrace oocytů se u prasat vyskytuje mnohem častěji než je tomu u jiných živočišných druhů (Hunter, 1990). U savců je proces penetrace spermie spouštěcím mechanismem k aktivaci oocytu následovanou exocytózou kortikálních granul, která má za následek spuštění polyspermického bloku za pomoci biochemických změn na zóně pellucidě (Romar et al., 2005; Tahara a Tasaka, 2006; Coy et al., 2008). Vysoký výskyt polyspermie u prasat vedl k hypotéze, že zrání ooplasmy a organel oocytu není dostačující k vytvoření tzv. „polyspermického bloku“, přestože jaderné zrání bylo úspěšné (Prather a Day, 1998).

Tato úvaha byla využita i při sestavení našich vlastních hypotéz a experimentů. Při IVM tak může docházet k opoždování kortikální reakce nebo selhávání uvolnění obsahu kortikálních granul. Migrace kortikálních granul v cytoplazmě je u savčích oocytů obecně známou skutečností, a to nejen v podmínkách in vivo, ale také v podmínkách in vitro (Gulyas, 1980; Coy a Avilés, 2010). Densita a přesun kortikálních granul je důležitým

cytoplazmatickým indikátorem meiotické zralosti (Cran a Cheng, 1985; Ducibella et al., 1990) a také indikátorem normálního vývoje oocyty.

Změny v distribuci kortikálních granul u prasat byly již dříve prokázány pomocí elektronové mikroskopie (Cran a Cheng, 1985). Použití konfokálního mikroskopu a specifických lektinů pro vizualizaci kortikálních granul bylo popsáno o několik let později v práci Yoshidy et al. (1993), jehož práce byla předlohou pro naši experimentální metodu. Tato studie prokázala specifickou vazbu kortikálních granul a sondy PNA-FITC, díky níž bylo možné detekovat kortikální granula uvnitř prasečího oocytů a pozorovat tak jejich migraci. V podmínkách in vivo stoupá počet kortikálních granul během pozdního stádia zrání oocyty. Cran a Cheng (1985) popsali, že na začátku zrání (méně než 20 h) se pod oolemou oocyty nachází méně než 20 % kortikálních granul. Mezi 30 a 40 h se jejich počet zvýší až na 75 %, přičemž 8 – 10 hod po ovulaci se prakticky všechna granula přesouvají k vytvoření monolayeru. Porozumění mechanismu přesunu kortikálních granul a mechanismu blokování polyspermické penetrace u prasečích oocytů může přispět k redukci výskytu polyspermicky penetrovaných oocytů, a ke zdokonalení metod produkce prasečích embryí in vitro. Z tohoto důvodu byla tato disertační práce navržena tak, aby zhodnotila kvantitativní změny v redistribuci kortikálních granul u subpopulací oocytů s rozdílnou meiotickou kompetencí v průběhu folikulogeneze. Předkládaná studie je první prací, která se zaměřila na lokalizaci kortikálních granul u oocytů izolovaných v různé fázi estrálního cyklu. V předchozích experimentech bylo zjištěno, že u nezralých oocytů jsou kortikální granula homogenně rozmístěna v cytoplazmě oocyty a teprve při procesu maturace dojde k jejich přesunu k periférii a k postupnému vytvoření souvislé vrstvy kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránou (Wang et al., 1997; Sawamukai et al., 1998; Coy et al., 2002, Takano et al., 2002). Provedené experimenty byly realizovány s oocyty získanými z prepubertálních zvířat nebo bez ohledu na fázi pohlavního cyklu poražených zvířat, což vedlo k heterogenní populaci s vyšší či menší mírou atresie.

Výsledky prvního experimentu ukazují změny v distribuci kortikálních granul v cytoplazmě nezralých prasečích oocytů získaných z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu. Výsledky tohoto experimentu potvrdily závěry jiných publikací, že nezralé oocyty s nízkou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých folikulů, mají kortikální granula lokalizována homogenně v celé cytoplazmě oocyty

( $I_{dkg} = 1,48 \pm 0,3$ ). Předložené závěry však ukázaly, že u nezralých oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů, jsou kortikální granula lokalizována především v periferní části oocyty ( $I_{dkg} = 2,22 \pm 0,5$ ). Tento trend podpořily také indexy získané při hodnocení subpopulací oocytů izolovaných v různé fázi estrálního cyklu, které ukázaly, že kortikální granula migrují k cytoplazmatické membráně postupně s jednotlivými fázemi folikulogeneze. Při hodnocení oocytů pocházejících z malých folikulů byl nejvyšší  $I_{dkg}$  nalezen u pozdní luteální ( $I_{dkg} = 1,8 \pm 0,7$ ) a časné folikulární fáze ( $I_{dkg} = 1,7 \pm 0,4$ ). Na počátku folikulogeneze, v časné luteální fázi, velikost  $I_{dkg}$  dosahovala  $1,2 \pm 0,4$ . U oocytů získaných ze středních folikulů byl nejvyšší index nalezen v časné folikulární fázi ( $I_{dkg} = 2,4 \pm 0,6$ ), která představuje 15 - 16 den estrálního cyklu. Výsledky tedy poukazují na to, že s postupným získáváním meiotické kompetence dochází u nezralých oocytů k postupné, ale intenzivní, migraci kortikálních granul cytoplazmou oocyty směrem k jeho periferní části ještě před dokončením jaderného zrání.

Zajímavé srovnání přinesly také výsledky v práci Ducibelly et al. (1994), kteří sledovali množství kortikálních granul v závislosti na velikosti nezralých oocytů během oogeneze u myši. Výsledky jejich práce poukázaly na to, že se zvyšující se velikostí oocytů během oogeneze rostl exponenciálně také počet kortikálních granul v korové vrstvě nezralého oocyty. Tento počet se zdvojnásobil ve finální fázi růstu oocyty. Výše uvedený experiment koresponduje se závěrem této práce, že v průběhu folikulogeneze a oogeneze dochází s nabýváním meiotické kompetence k migraci kortikálních granul již u oocytů v GV stádiu.

Dokončení finálního monolayeru kortikálních granul pod oolemou, který je popisovaný v práci Wanga et al. (1997), ukázaly až výsledky druhého experimentu, který byl zaměřen na kvantitativní zhodnocení distribuce kortikálních granul u oocytů po IVM maturaci. Metodický postup hodnocení přesunu kortikálních granul byl převzatý z práce Yoshidy et al. (1993) a Wanga et al. (1997), kteří použili jako hodnotící parametr počet kortikálních granul na  $100 \mu\text{m}^2$  korové vrstvy oocyty. Hodnocení migrace s pomocí Indexu distribuce kortikálních granul ( $I_{dkg}$ ) vycházející z našeho experimentu nebylo u oocytů po IVM maturaci možné, neboť se v centrální části oocyty již nenacházela téměř žádná kortikální granula. Naměřené hodnoty v experimentu 2 ukázaly, že se zvyšující se meiotickou kompetencí oocyty dochází u zralých oocytů k signifikantnímu úbytku po-

čtu kortikálních granul v korové vrstvě. U méně kompetentních oocytů izolovaných z malých folikulů byl zaznamenán průměrný počet  $73,89 \pm 18,7$  kortikálních granul na  $100 \mu\text{m}^2$ , zatím co u meioticky kompetentnějších oocytů izolovaných ze středních folikulů byl nalezen počet  $59,31 \pm 13,2$  kortikálních granul na  $100 \mu\text{m}^2$ . Výsledky druhé fáze Experimentu 2 ukázaly kinetický přesun kortikálních granul během procesu folikulogeneze. Podle zjištěných hodnot lze usuzovat, že maximální počet granul je pod cytoplazmatickou membránou už v časně folikulární fázi ( $86,1 \pm 18,6$  CGs /  $100 \mu\text{m}^2$ ) méně kompetentních oocytů z malých folikulů.

Výsledky dále naznačily, že s růstem folikulů do střední velikosti a s nabýváním meiotické a vývojové kompetence oocytů nedochází již k navýšení počtu kortikálních granul pod oolemou, ale naopak k jejich signifikantnímu úbytku. Tento závěr podložily hodnoty naměřené u pozdní luteální ( $60,5 \pm 12,2$  CGs /  $100 \mu\text{m}^2$ ) i časně folikulární fáze ( $58,2 \pm 13,3$  CGs /  $100 \mu\text{m}^2$ ) oocytů izolovaných ze středních folikulů. O něco nižší hodnoty naměřili Wang et al. (1997), kteří zjistili průměrný počet  $45,7 \pm 6,2$  CGs /  $100 \mu\text{m}^2$  u oocytů po 46 hodinách IVM. Tento rozdíl v naměřených hodnotách mohl být způsobený použitím rozdílných populací oocytů získaných bez ohledu na fázi estrálního cyklu. Podle studie Crana a Chenga (1985) se u prasečích oocytů maturovaných v in vivo podmínkách vyskytuje pod plazmatickou membránou průměrně 10 CGs na  $10 \mu\text{m}^2$ . Tento závěr se liší od námi naměřených hodnot, ale vlivem in vivo podmínek dochází k odlišné distribuci kortikálních granul.

Zjištěný úbytek kortikálních granul, u nefertilizovaných meioticky vysoce kompetentních oocytů, mohl být zapříčiněn částečnou exocytózou již přesunutých granul. Předpokládáme, že enzymy obsažené v kortikálních granulích mohly mít za následek tzv. pre-fertilization zona hardening, který způsobuje předčasné změny na zoně pellucidě a její větší rezistenci proti polyspermické penetraci. Podobný jev byl v literatuře popsán u postovulačních nefertilizovaných oocytů v in vivo podmínkách, kde byla prokázána zvýšená rezistence zony pellucidy proti štěpení pronázou (Kolbe a Holtz, 2005). Doposud se věřilo, že spouštěcím mechanismem uvolnění obsahu kortikálních granul je moment penetrace oocytu první spermií. Nicméně několik studií uvádí, že část kortikálních granul může podlehnout částečné exocytóze ještě před fertilizací a ovlivnit regulaci časněho embryonálního vývoje (Okada et al., 1993). Tato spontánní exocytóza byla zatím popsána podrobněji pouze u hlodavců. Mechanismus a funkce předčasné exocytózy u

prasad nebyl zatím zcela objasněn. U prasat však byl např. popsán vliv oviduktální tekutiny jako silného induktoru částečného zona hardeningu u nefertilizovaných oocytů, kterým se zabývali Coy et al. (2008). Pomocí specifických cross-linking reagentů vyvolávajících formaci stabilních amidových vazeb mezi NH<sub>2</sub> skupinami v zonálních proteinech prokázali, že pre-fertilization zona hardening indukovaný pomocí cross-linkeru DSP měl pozitivní vliv na podíl monospermicky penetrovaných oocytů.

Řada autorů také analyzovala přítomnost kortikálních granul po fertilizaci oocyty, na kterou byl zaměřen Experiment 3 (Wang et al., 1997; Ghetler et al., 1998; Li et al., 2003, Romar et al., 2005, Romar et al., 2012). Wang et al. (1997) ve svém experimentu popsali přítomnost malého množství kortikálních granul ( $3,5 \pm 4,6$  CGs /  $100 \mu\text{m}^2$ ) 18 hod po inseminaci oocytů, přičemž nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi monospermicky a polyspermicky oplodněnými oocyty. Kompletní exocytózu autoři popsali pouze u 45 % oocytů. S těmito výsledky se částečně shodují i naše závěry z experimentu 3, které potvrdily, že 18 h po inseminaci se kortikální granula v cytoplazmě oocyty nachází pouze ojediněle. Avšak dle našeho názoru není již možné jejich kvantitativní zhodnocení. S tímto názorem korelují také výsledky Takano et al. (2002), kteří zjistili, že 8 hod po inseminaci nejsou v cytoplazmě viditelná již žádná kortikální granula. V našem experimentu nebyly nalezeny žádné rozdíly v přítomnosti kortikálních granul po inseminaci oocytů s odlišnou meiotickou kompetencí v různé fázi estrálního cyklu. Nicméně, jak dokládají výsledky Romara et al. (2012), 18 hod po inseminaci není vhodný časový parametr pro hodnocení rozdílů mezi jednotlivými populacemi oocytů, neboť u většiny z vyšetřených oocytů proběhla téměř kompletní exocytóza. Romar et al. (2012) však našli rozdíly v oblastech obsazených kortikálními granuly po 4 a 5 hod po inseminaci. Zajímavé výsledky přinesl také experiment Li et al. (2003), kteří zjistili, že exocytóza CGs začíná již 3 - 4 hod po inseminaci.

Z výše uvedeného vyplývá, že pro hodnocení kortikálních granul přítomných v cytoplazmě oocyty po inseminaci se jeví jako nejvhodnější doba 5 hod po inseminaci.

Výsledky této práce ukázaly, že migrace kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránu začíná ještě před začátkem maturace in vitro a její intenzita závisí na meiotické kompetenci oocyty i na fázi estrálního cyklu. Výsledky dále ukázaly, že po procesu maturace dochází k dokončení distribuce kortikálních granul pod oolemu oocyty a k pravděpodobné částečné exocytóze kortikálních granul u meioticky vysoce kompetent-



ních oocytů. Experiment 3 neprokázal rozdíl v distribuci kortikálních granul fertilizovaných oocytů, neboť 18 hod po inseminaci nebylo možné kvantitativně hodnotit přítomnost kortikálních granul v cytoplazmě díky kompletní exocytózy.

Z dalších publikovaných výsledků vyplynulo, že se jako nejvhodnější doba pro hodnocení kortikálních granul, u penetrovaných oocytů, jeví 5 hod po inseminaci. Je tedy zapotřebí dalších experimentů, které by odhalily rozdíly mezi oocyty s různou meiotickou kompetencí i v jednotlivých fázích estrálního cyklu po fertilizaci *in vitro*.

Z výše uvedených výsledků lze dospět k závěru, že oocyty izolované ze středních folikulů se vyznačují nejen vysokou meiotickou a vývojovou kompetencí, ale také cytoplazmatickou zralostí. Pro maturaci a fertilizaci oocytů v podmínkách *in vitro* je tedy nejvhodnější použít populaci oocytů izolovaných ze středních folikulů v pozdní luteální a časně folikulární fázi.

## 6 ZÁVĚRY

Předkládaná disertační práce experimentálně zpracovala několik dílčích cílů a výzkumných hypotéz, které byly ověřeny ve třech samostatných experimentech. Dílčí cíle byly zaměřeny na lokalizaci a migraci kortikálních granul u prasečích oocytů izolovaných na počátku meiotického zrání (GV stádium) a na konci meiotického zrání (MII stádium). Oocyty pocházely z malých a středních folikulů v různé fázi estrálního cyklu. Dílčí cíle byly dále zaměřeny na ověření účinnosti *in vitro* fertilizace u oocytů s odlišnou meiotickou kompetencí a v různé fázi estrálního cyklu. Dosažené výsledky naplnily jednotlivé cíle a potvrdily stanovené hypotézy.

Byla potvrzena hypotéza, že se oocyty izolované z různě velkých folikulů v různých fázích estrálního cyklu liší v distribuci kortikálních granul. Dílčími experimenty bylo prokázáno, že migrace kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránu začíná ještě před začátkem maturace *in vitro* a její intenzita závisí na meiotické kompetenci oocytu i na fázi estrálního cyklu. Z uvedených výsledků také vyplývá, že se s jednotlivými fázemi cyklu a zvyšující se meiotickou kompetencí mění centrální lokalizace kortikálních granul u nezralých oocytů na lokalizaci periferní. Naměřené hodnoty také ukázaly, že po procesu IVM jsou již všechna kortikální granula přesunuta na periferii oocytu a se zvyšující se meiotickou kompetencí zralých oocytů dochází k signifikantnímu úbytku počtu kortikálních granul v korové vrstvě. Tento úbytek je s největší pravděpodobností způsoben částečnou exocytózou již přesunutých kortikálních granul.

Výše popsané závěry potvrdily další z hypotéz, že se prasečí oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí navzájem liší ve stupni zralosti cytoplazmy, neboť bylo prokázáno, že denzita a distribuce kortikálních granul jsou důležitým cytoplazmatickým indikátorem meiotické zralosti.

Bylo také prokázáno, že se oocyty s různou meiotickou kompetencí liší ve schopnosti prodělat normální fertilizaci, a že *in vitro* fertilizace oocytů s nižší meiotickou kompetencí je doprovázena vyšším výskytem polyspermicky oplozených oocytů. Nebylo však možné potvrdit, že je tento vyšší výskyt způsoben narušením průběhu kortikální reakce, neboť 18 hod po inseminaci již není možné kvantitativně hodnotit přítomnost kortikálních granul v cytoplazmě díky kompletní exocytóze. Nedostatečná distribuce kortikál-

ních granul na počátku meiotického zrání, může významně ovlivnit efektivitu polyspermického bloku a mohla být jednou z příčin vysoké polyspermie při fertilizaci oocytů izolovaných v časně a střední luteální fázi (Hulínská et al., 2011). Je však zapotřebí ověřit zjištěné informace pomocí další experimentů využívajících in vitro fertilizaci.

Z výše uvedeného lze tedy na závěr konstatovat, že úroveň jaderného a především cytoplazmatického zrání hraje v efektivitě in vitro fertilizaci důležitou roli a úspěšná fertilizace je výsledkem funkčního stavu oocytu a úrovně jeho meiotické a vývojové kompetence. Předkládaná studie je první prací, která se zaměřila na lokalizaci kortikálních granul oocytů izolovaných v různé fázi estrálního cyklu. Předložené výsledky ukázaly, že ve srovnání s ostatními fázemi folikulogeneze, se pozdní luteální a časná folikulární fáze u malých i středních folikulů jeví jako optimální pro získání oocytů vhodných k maturaci i fertilizaci in vitro. Tato populace oocytů je nejen morfologicky kvalitnější, ale také vykazuje vyšší míru meiotické i vývojové kompetence a cytoplazmatické zralosti. Díky těmto poznatkům je tato kvantitativní studie další z prací, které mohou pomoci při zdokonalování postupů in vitro fertilizace a in vitro produkce prasečích embryí, zejména při správné selekci oocytů respektující úroveň folikulogeneze.

## 7 LITERATURA

ABEYDEERA L.R., DAY B.N., 1997: Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 57: 729–734.

ABEYDEERA L.R., WANG W.H., CANTLEY T.C., RIEKE A., PRATHER R.S., DAY B.N., 1998: Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 395–401.

ABEYDEERA L.R., 2001: In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reproduction*, 58: 159–173.

ABEYDEERA L.R., 2002: In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*, 57: 257–273.

ABBOTT A.L., DUCIBELLA T., 2001: Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience*, 6: 792–806.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., WALTER P., 2004: Molecular biology of the cell. Artmed, Portugalsko, 4th ed.

ANTOSIK P., KEMPISTY B., BUKOWSKA D., JACKOWSKA M., WŁODARCZYK R., BUDNA J., BRÜSSOW K.P., LIANERI M., JAGODZINSKI P.P., JASKOWSKI J.M., 2009: Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *Journal of Reproduction and Development*, 55: 588–593.

AUSTIN C.R., 1956: The cortical granules of hamster eggs. *Experimental Cell Research*, 10: 533–540.

BAGG M.A., NOTTLE M.B., ARMSTRONG D.T., GRUPEN C.G., 2007: Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reproduction, Fertility and Development*, 19: 797–803.

BALOMBA D., SIRARD M.A., 2000: Ovulation and follicular growth in gonadotropin-treated gilts followed by in vitro fertilization and development of their oocytes. *Theriogenology*, 53: 1421–1437.

BIELANSKA-OSUCHOWSKA Z., 2006: Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*, 6: 161–193.

BERRIDGE M.J., 1993: Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361: 315–325.

BLACK J.L., ERICKSON B.H., 1986: Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical record*, 161: 45–56.

BREITBART H., 2003: Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cellular and Molecular Biology*, 49: 321–327.

COY P., GADEA J., ROMAR R., MATÁS C., GARCÍA E., 2002: The effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and in vitro development in the pig. *Reproduction*, 124: 279–288.

COY P., ROMAR R., 2002: In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, Fertility, and Development*, 14: 275–286.

COY P., ROMAR R., PAYTON R.R., MCCANN L., SAXTON A.M., EDWARD J.L., 2005: Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction*, 129: 19–26.

COY P., GRULLÓN L., CÁNOVAS S., ROMAR R., MATÁS C., AVILÉS M., 2008: Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, 135: 19–27.

COY P., AVILÉS M., 2010: What Controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. *Biological Reviews*, 85: 593–605.

COY P., LLOYD R., ROMAR R., SATAKE N., MATAS C., GADEA J., HOLT W.V., 2010: Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology*, 74: 632–642.

CRAN D.G., MOOR R.M., HAY M.F., 1980: Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *Journal of reproduction and fertility*, 59: 125–132.

CRAN D.G., CHENG W.T.K., 1985: Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete Research*, 11: 311–319.

CROZET N., KANKA J., MOTLIK J., FULKA J., 1986: Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete Research*, 14: 65–73.

DAY B.N., 2000: Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 161-172.

DING J., CLARKE N., NAGAI T., MOOR R.M., 1992: Protein and nuclear changes in pig eggs at fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 31: 287–296.

DUCIBELLA T., ANDERSON E., ALBERTINI D.F., ALBERG J., RANGARAJAN S., 1988: Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental Biology*, 130: 184–197.

DUCIBELLA T., DUFFY P., REINDOLLAR R., SU B, 1990: Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin – stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biology of Reproduction*, 43: 870–876.

DUCIBELLA T., KURASAWA S., DUFFY P., KOPF G.S., SCHULTZ R.M., 1993: Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biology of Reproduction*, 48: 1251–1257.

DUCIBELLA T., DUFFY P., BUETOW J., 1994: Quantification and Localization of Cortical Granules during Oogenesis in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 50: 467–473.

DUCIBELLA T., DUBEY A., GROSS V., EMMI A., PENZIAS A.S., LAYMAN L., REINDOLLAR R., 1995: A zona biochemical change and spontaneous cortical granule loss in eggs that fail to fertilize in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 64: 1154–1161.

DUCIBELLA T., 1996: The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*, 2: 29–42.

DURANTHON V., RENARD J.P., 2001: The developmental competence of mammalian oocytes: A convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55: 1277–1289.

EPPIG J.J., O'BRIEN M.J., 1996: Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 54: 197–207.

EVANS A.C., 2003: Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 240–246.

FAIR T., 2003: Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 78: 203–216.

FAN H.Y., TONG C., CHEN D.Y., SUN Q.Y., 2002: Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*, 47: 1157–1162.

FASSHAUER D., ELIASON W.K., BRUNGER A.T., JAHN R., 1998: Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*, 37: 10354–10362.

FENG W.G., SUI H.S., HAN Z.B., CHANG Z.L., ZHOU P., LIU D.J., BAO S., TAN J.H., 2007: Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: A study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, 67: 1339–1350.

FERREIRA E.M., VIREQUE A.A., ADONA P.R., MEIRELLES F.V., FERRIANI R.A., NAVARRO P.A., 2009: Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71: 836–848.

FINDLAY J.K., 2003: Endocrine regulation of meiosis – local and systemic hormonal influences. In: TROUNSON A.O., GORDEN S.D. (eds). *Biology and pathology of the oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 113–119.

FISSORE R.A., DOBRINSKY J.R., BALISE J.J., DUBY R.T., ROBL J.M., 1992: Patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in fertilized bovine eggs. *Biology of Reproduction*, 47: 960–969.

FITZHARRIS G., MARANGOS P., CARROLL J., 2007: Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental Biology*, 305: 133–144.



FULKA J., FIRST N.L., MOOR R.M., 1998: Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*, 4: 41–49.

FUNAHASHI H., DAY B.N., 1997: Advances in in vitro production of porcine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52: 271–283.

FUNAHASHI H., 2003: Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 15: 167–177.

GHETLER Y., RAZ T., BEN NUN I., SHALGI R., 1998: Cortical granules reaction after intracytoplasmic sperm injection. *Molecular Human Reproduction*, 4: 289–294.

GIOIA L., BARBONI B., TURRIANI M., CAPACCHIETTI G., PISTILLI M.G., BARRARDINELLI P., MATTIOLI M., 2005: The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction*, 130: 29–39.

GOSDEN R.G., 2002: Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186: 149–153.

GOUDET G., MUGNIER S., CALLEBAUT I., MONGET P., 2008: Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction*, 78: 796–806.

GRUPEN C.G., 2014: The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*, 81: 24–37.

GULYAS B.J., 1979: Cortical granules of mammalian eggs. *International Review of Cytology*, 63: 357–392.

GULYAS B.J., 1980: Cortical granules of mammalian eggs. *International Review of Cytology*, 63: 357–392.

GULYAS B.J., SCHMELL E.D., 1980: Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. Electron microscopic localization. *Gamete Research*, 3: 267–277.

GULYAS B.J., YUAN L.C., 1985: Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *The Journal of Experimental Zoology*, 233: 269–276.

GUPTA M.K., UHM S.J., LEE H.T., 2008: Sexual maturity and reproductive phase of oocyte donor influence the developmental ability and apoptosis of cloned and parthenogenetic porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, 108: 107–121.

GURAYA S.S., 1982: Recent progress in the structure, origin, composition and function of cortical granules in animal eggs. *International Review of Cytology*, 78: 257–360.

GWATKIN R.B.L., WILLIAMS D.T., HARTMANN J.F., KNIAZUK M., 1973: The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *Journal of Reproduction and Fertility*, 32: 259–265.

HAN Y.M., WANG W.H., ABEYDEERA L.R., PETERSEN A.L., KIM J.H., MURPHY C., DAY B.N., 1999: Prather RS: Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biology of Reproduction*, 61: 1340–1346.

HASEGAWA A., KANAZAWA N., SAWAI H., KOMORI S., KOYAMA K., 2006: Pig zona pellucida 2 (pZP2) protein does not participate in zona pellucida formation in transgenic mice. *Reproduction*, 132: 455–464.

HASEGAWA A., KOYAMA K., 2007: Contribution of zona proteins to oocyte growth. *Society for Reproduction and Fertility*, 63: 229–235.

HOODBHOY T., TALBOT P., 2001: Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Molecular Reproduction and Development*, 58: 223–235.

HOODBHOY T., DEAN J., 2004: Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*, 127: 417–422.

HULÍNSKÁ P., MARTEČÍKOVÁ S., JEŠETA M., MACHATKOVÁ M., 2011: Efficiency of in vitro fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. *Animal Reproduction Science*, 124: 112–117.

HUNTER R.H.F., 1990: Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40: 211–226

HUNTER M. G., 2000: Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5: 122–130.

IKEDA K., TAKAHASHI Y., 2003: Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reproduction, Fertility and Development*, 15: 215–221.

KANITZ W., BRUSSOW K., BECKER F., TORNER H., SCHNEIDER F., KUBELKA M., TOMEK W., 2001: Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archiv fur Tierzucht – Archives of Animal Breeding*, 44: 9–23.

KATSKA L., KANIA G., SMORAG Z., WAYDA E., PLUCIENNICZAK G., 1999: Developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes with experimentally induced hardening of the zona pellucida. *Reproduction in Domestic Animals*, 34: 255–259.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ L., 2006: Pig embryo production by in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. A review. *Journal of Animal Feed Sciences*, 15: 525–542.

- KHATIR H., ANOUASSI A., TIBARY A., 2007: Effect of follicular size on in vitro developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*, 99: 413–420.
- KOLBE T., HOLZ W, 2005: Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, 63: 1695–1705.
- KURASAWA S., SCHULTZ R.M., KOPF G.S., 1989: Egg-induced modifications of the zona pellucida of mouse eggs: effects of microinjected inositol 1,4,5-trisphosphate. *Developmental Biology*, 133: 295–304.
- LI Y.H., MA W., LI M., HOU Y., JIAO L.H., WANG W.H., 2003: Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization system: straw IVF. *Biology of Reproduction*, 69: 1580–1585.
- LIU R.H., LI Y.H., JIAO L.H., WANG H., WANG W.H., 2002: Extracellular factors affecting nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes collected from different size of follicles. *Zygote*. 10: 253–260.
- LIU M., 2011: The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 149.
- LONERGAN P., MONAGHAN P., RIZOS D., BOLAND M.P., GORDON I., 1994: Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in-vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 37: 48–53.
- MACHATKOVA M., HULINSKA P., HORAKOVA J., RECKOVA Z., HANZALOVA K., 2008: Oestrous cycle stage influences the morphology and maturation of porcine oocytes in vitro. *Veterinarni Medicina*, 53: 70–76.

MARCHAL R., FEUGANG J.M., PERREAU C., VENTURI E., TERQUI M., MERMILLOD P., 2001: Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology*, 56: 17–29.

MARCHAL R., VIGNERON C., PERREAU C., BALI-PAPP A., MERMILLOD P., 2002: Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 57: 1523–1532.

MARVAN F., HAMPL A., HLOŽÁNKOVÁ E., KRESAN J., MASSANYI L., VERNEROVÁ E., 2003: Morfologie hospodářských zvířat. Nakladatelství Brázda, Praha, 348 s.

MASSIMILIANO P., ROBERTO B., LAKAMY S., TIZIANA P., MAURIZIO M., GIUSEPPE M., MAURO M., GIUSEPPE A., FULVIO U., MARCO D.S., 2010: Mechanical properties of zona pellucida hardening. *European Biophysics Journal*, 39: 987–992.

MATZUK M.M., BURNS K.H., VIVEIROS M.M., EPPIG J.J., 2002: Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296: 2178–2190.

MCGEE, E. A., HSUEH, A. J., 2000: Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21: 200–214.

MEHLMANN L.M., 2005: Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*, 130: 791–799.

MERMILLOD P., TOMANEK M., MARCHAL R., MEIJER L., 2000: High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. *Molecular Reproduction and Development*, 55: 89–95.

- MILLER D.J., AX R.L., 1990: Carbohydrates and fertilization in animals. *Molecular Reproduction and Development*, 26: 184–198.
- MILLER D.J., GONG X., DECKER G., SHUR B.D., 1993: Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *The Journal of Cell Biology*, 123: 1431–1440.
- MIYAZAKI S., SHIRAKAWA H., NAKADA K., HONDA Y., 1993: Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Developmental Biology*, 158: 62–78.
- MOOR R.M., MATTIOLI M., DING J., NAGAI T., 1990: Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 40: 197–210.
- MOTLÍK J., FULKA J., 1976: Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 198: 155–162.
- MOTLIK 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.
- NIEMANN H., WRENZICKI C., LUCAS-HAHN A., BRAMBRINK T., KUES W.A., CARNWATH J.W., 2002: Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells*, 4: 29–38.
- NIWA K., 1993: Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48: 49–590.
- OHASHI Y., HOSHINO Y., TANEMURA K., SATO E., 2013: Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes. *Animal Science Journal*, 84: 15–22.

OKADA A., INOMATA K., NAGAE T., 1993: Spontaneous cortical granule release and alteration of zona pellucida properties during and after meiotic maturation of mouse oocytes. *The Anatomical Record*, 237: 518–526.

OPIELA J., KATSKA-KSIAZKIEWICZ L., 2004: Characterization of mammalian oocytes competence to undergo fertilization and embryonic development. I. Nuclear maturation and molecular aspects of its regulation. *Biotechnologia*, 66: 107–118.

PICTON H.M., GOSDEN R.G., 1998: Oogenesis in mammals. In: KNOBIL E, NEILL J.D. (eds). *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, San Diego, USA, 488–497.

PICTON H.M, BRIGGS D., GOSDEN R., 1998: The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145: 27–37.

PIERCE K.E., SIEBERT M.C., KOPF G.S., SCHULTZ R.M., CALARCO P.G., 1990: Characterization and localization of a mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activation. *Developmental Biology*, 2: 381–392.

PRATHER R. S., DAY B.N., 1998: Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology*, 49: 23–32.

PRIMAKOFF P., MYLES D.G., 2002: Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 296: 2183–2185.

RATH D., TÖPFER-PETERSEN E., MICHELMANN H.W., SCHWARTZ P., EBELING S., 2005: Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*, 63: 352–362.

ROMAR R., COY P., GADEA J., RATH D., 2005: Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 85: 287–300.

ROMAR R., COY P., RATH D., 2012: Maturation conditions and boar affect timing of cortical reaction in porcine oocytes. *Theriogenology*, 78: 1126–1139.

ŘÍHA J., MACHATKOVÁ M., PETELÍKOVÁ J., JAKUBEC V., PYTLOUN J., ŠEREDA L., PAVLOK A., 1999: Biotechnologie v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Asociace chovatel masných plemen, Rapotín, 168 s.

SATO E., MATSUO M., MIYAMOTO H., 1990: Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Journal of Animal Science*, 68: 1182–1187.

SATO D., ITAMI N., TASAKI H., TAKEO S., KUWAYAMA T., IWATA H., 2014: Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One*, 9: 1–8.

SAWAMUKAI K., SUZUKI K., OGAWA H., SHIMIZU H., MORI T., 1998: Distribution of Cortical Granules in Porcine Oocytes Inseminated In Vitro at Various Times of Culture for Maturation In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*, 15: 139–145.

SCHOEVERS E.J., COLENBRANDER B., ROELEN B.A.J., 2007: Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. *Theriogenology*, 67: 1108–1122.

SILVA J.R.V., FIGUEIREDO J.R., VAN DEN HURK R., 2009: Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71: 1193–1208.

SIRARD M.A., 2001: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55: 1241–1254.

SIRARD M.A., RICHARD F., BLONDIN P., ROBERT C., 2006: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65: 126–136.



SMITH G.D., 2001: Control of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. In: WOLF D.P., ZELINSKI-WOOTEN M. (eds.). Contemporary endocrinology: assisted fertilization and nuclear transfer in mammals. Humana Press inc. Totowa, New Jersey, USA, 53–65.

SOYAL S.M., AMLEH A, DEAN J., 2000: Fig  $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127: 4645–4654.

STOJKOVIC M., MOTLIK J., KOLLE S., ZAKHARTCHENKO V., ALBERIO R., SINOWATZ F., WOLF E., 1999: Cell-Cycle control and oocyte maturation. Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals*, 34: 335–342.

STOJKOVIC M., MACHADO S.A., STOJKOVIC P., ZAKHARTCHENKO V., HUTZLER P., GONCALVES P.B., 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.

SUN Q.Y., WANG W.H., HOSOE M., TANIGICHI T., CHEN D.Y., SHIOYA Y., 1997: Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca(2+)-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Development Growth & Differentiation*, 39: 523–529.

SUN Q.Y., WU G.M., LAI L., PARK K.W., CABOT R., CHEONG H.T., DAY B.N., PRATHER R.S., SCHATTEN H., 2001: Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 122: 155–163.

SUN Q.Y., 2003: Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique*, 61: 342–348.

SWANN K., YU Y., 2008: The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *The International Journal of Developmental Biology*, 52: 585–594.

SWENSON C.E., DUNBAR B.S., 1982: Specificity of sperm-zona interaction. *The Journal of experimental zoology*, 219: 97–104.

TAHARA M., TASAKA K., MASUMOTO N., 1996: Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse egg. *Cell Physiology*, 39: C1354–C1361.

TAHARA M., TASAKA K., 2006: Mechanism and Control of Mammalian Cortical Granule Exocytosis. *Journal of Mammalian Ova Research*, 23: 10–20.

TAKANO H., KANDA CH., NIIMURA S., 2002: The Relationship between Nuclear Maturation and Cortical Granule Distribution in Cultured Porcine Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*, 19: 21–25.

TELFER, E.E., 1996: The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, 45: 101–110.

TOMEK W., TORNER H., KANITZ W., 2002: Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 86–91.

TÖPFER-PETERSEN E., EKHLASI-HUNDRIESER M., TSOLOVA M., 2008: Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology*, 52: 717–736.

TORNER H., BRÜSSOW K. P., TOMEK W., ALM H., RATKY J., 1998: Structural and functional changes in porcine cumulus-oocyte-complexes during preovulatory maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, 33: 249–253.

TORNER H., BRUSSOW K.P., ALM H., RATKY J., POHLAND R., TUCHSCHE-  
RER A., KANITZ W., 2004: Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine  
oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-  
ovulatory maturation. *Theriogenology*, 61: 1675–1689.

TSAI P.S., VAN HAEFTEN T., GADELLA B.M., 2011: Preparation of the cortical re-  
action: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to  
the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. *Biology of Re-  
production*, 84: 327–335.

VAN DEN HURK R., ZHAO J., 2005: Formation of ovarian follicles and their growth,  
differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63: 1717–  
1751.

VAN VOORHIS, B. J., 1998: Follicular development. In: KNOBIL E., NEILL J.D. En-  
cyclopedia Reproduction. Academic Press, Vol. 2, 376–389.

WANG W., SUN Q., HOSOE M., SHIOYA Y., DAY B.N., 1997: Quantified Analysis  
of Cortical Granule Distribution and Exocytosis of Porcine Oocytes during Meiotic Ma-  
turation and Activation. *Biology of Reproduction*, 56: 1376–1382.

WANG W.H., ABEYDEERA L.R., PRATHER R.S., DAY B.N., 1998: Morphologic  
comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference  
to polyspermy after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 49:  
308–316.

WASSARMAN P.M., 1988a: The mammalian ovum. In: KNOBIL E., NEILL J.D.  
(eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, USA, 70–102.

WEBER T., ZEMELMAN B.V., MCNEW J.A., WESTERMANN B., GMACHL M.,  
PARLATI F., 1998: Sollner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for  
membrane fusion. *Cell*, 92: 759–772.

WESSEL M.G., BROOKS J.M., GREEN E., HALEY S., VORONINA E., WONG J., ZAYDFUDIM V., CONNER S., 2001: The biology of Cortical Granules. Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry. Brown University, 1–90.

WONG J.L., WESSEL G.M., 2006: Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. *Current Topics in Developmental Biology*, 72: 1–151.

XIA P, WANG Z, YANG Z, TAN J, QIN P., 2001: Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell and Tissue Research*, 303: 271–275.

XU X., DING J., SETH P.C., HARBISON D.S., FOXCROFT G.R., 1996a: In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology*, 45: 745–755.

YONEZAWA N., KANAI-KITAYAMA S., KITAYAMA T., HAMANO A., NAKANONO M., 2012: Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote*, 20: 389–397.

YOSHIDA M., ISHIZAKI 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.

YOSHIDA M., CRAN D.G., PURSEL V.G., 1993: Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 36: 462–468.

YOSHIOKA K., SUZUKI C., TANAKA A., ANAS L.M.K., IWAMURA S., 2002: Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction*, 66: 112–119.

ZHANG X., RUTLEDGE J., KHAMSI F., ARMSTRONG D.T., 1992: Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Molecular Reproduction and Development*, 32: 28–32.