

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Zrání bovinních oocytů in vitro  
Bakalářská práce**

**Autor práce: Kristýna Tuťálková**

**Obor studia: Speciální chovy**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Zrání bovinních oocytů in vitro" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.4.2018 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtaři, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, ochotu a podnětnou kritiku, kterou mi poskytl při jejím zpracování.

# Zrání bovinních oocytů in vitro

## Souhrn

Oocyty se vyvíjejí v procesu nazývaném oogeneze. Začíná již v prenatalním období embrya, kdy se diferencují na primární a sekundární oocyty pomocí meiotického dělení. Oocyty se nacházejí v klidové fázi. V období dospívání dochází k působení hormonů, které umožní zrání oocytů.

Oocyty odebírají z živého či mrtvého zvířete. U živých zvířat se používá metoda transvaginální ultrazvuková aspirace, kdy je do krávy zavedeno transvaginální zařízení, které z folikulu na vaječnku odsaje oocyty a množství folikulární tekutiny. Z jatečných zvířat se do laboratoře přivezou pouze celé vaječníky, ze kterých jsou poté odsáty oocyty a folikulární tekutina.

Při laboratorním hodnocení je důležité vybrat oocyty, které splňují určitá kritéria. Kvalitu oocytů lze určit hodnocením charakteristik struktury kumulo – oocytárního komplexu, cytoplazmy oocytů, zóna pellucida, perivitelinového prostoru, dělicího vřeténka a polárního tělíska. Kultivují se pouze kvalitní oocyty.

Důležité podmínky pro kultivaci oocytů jsou teplota, množství různých plynů v inkubátoru, osmolarita médií, čas inkubace. Tyto podmínky z velké části ovlivňují zrání oocytů. Bovinní oocyty se kultivují 24 h při teplotě 38,5 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vzdušné vlhkosti.

Médium používané pro zrání oocytů in vitro může ovlivnit procesy, které se podílejí na následném vývoji oocytů. Média se skládají z bikarbonátových iontů, aminokyselin, antibiotika, zdrojů energie a různých látek mezi, která patří séra, které umožňují přibližně 80 % nezralých oocytů projít metafází druhého meiotického dělení. Přičemž nejčastější jsou TCM-199 a Ham's F-10. Kromě jejich příznivých vlivů na oocyty mohou způsobit i jejich abnormality.

Významnou roli hrají séra, hormony, antioxidanty, kyselina hyaluronová, které zvýší míru zrání.

**Klíčová slova:** bovinní oocyty, kultivační podmínky, média, in vitro maturace, hodnocení oocytů.

# In vitro maturation of bovine oocytes

## Summary

The oocytes develop in process called oogenesis. It begins already in prenatal period of embryo, when they differentiate in primary and secondary oocytes by meiotic division. The oocytes are in resting phase. At the time of adolescence when hormones work, it occur to mature of oocytes.

The oocytes take from living or slaughter animals. In live animals, the Transvaginal ultrasound-guided aspiration method is used, when transvaginal device is introduced into cow which oocytes and follicular fluid remove from the follicle of the ovary. From slaughter animals into to laboratory, whole ovaries bring from which remove oocytes and follicular fluid.

In the lab, it is important to select oocytes that fulfill certain criteria. The quality of oocytes can be determined evaluation the characteristics of the structure of a cumulo – oocyte complex, oocyte cytoplasm, zona pellucid, periviteline space, dividing spindle and polar body. Only quality oocytes are cultivated.

The important conditions for oocyte cultivation are temperature, number of different gases in the incubator, media osmolarity, incubation time. These conditions can largely affect mature of oocytes. The bovine oocytes are cultured for 24 hours at 38.5 ° C, 5 % CO<sub>2</sub> and 95 % air atmosphere.

The medium is used for in vitro maturation of oocytes, it can affect the processes, which has part in the subsequent development of oocytes. The media consists of bicarbonate ions, amino acids, antibiotics, energy sources and various substances lika are the serums that allow approximately 80 % of the immature oocytes to pass the metaphase of the second meiotic division. The most common are TCM-199 and Ham's F-10. In addition to its favorable conditions, oocytes can cause their abnormalities.

The serums, hormones, antioxidants, hyaluronic acid play an important role in increasing maturation of oocytes.

**Keywords:** an bovine oocytes, culture conditions, media, in vitro maturation, oocyte evaluation

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Oocyt</b> .....	<b>3</b>
3.1.1 Mitotické a meiotické dělení .....	3
3.1.2 Oogeneze .....	7
3.1.3 Folikulogeneze.....	8
3.1.4 Nukleární a cytoplazmatické zrání .....	10
<b>4 In vitro zrání oocytů</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1 Historie IVM</b> .....	<b>13</b>
<b>4.2 In vitro zrání bovinních oocytů</b> .....	<b>13</b>
<b>4.3 Odběr oocytů</b> .....	<b>14</b>
4.3.1 TUGA .....	14
4.3.2 Metoda post-mortem.....	16
<b>4.4 Kultivační podmínky</b> .....	<b>18</b>
4.4.1 Efektivita zrání .....	20
4.4.2 Kultivační média .....	21
<b>4.5 Hodnocení kvality oocytů</b> .....	<b>23</b>
4.5.1 Kumulo-oocytární komplex .....	24
4.5.2 Cytoplazma .....	26
4.5.3 Zóna pellucida .....	26
4.5.4 Periviteliní prostor .....	27
4.5.5 Dělicí vřeténko.....	27
4.5.6 Polární tělísko .....	28
<b>4.6 Faktory ovlivňující zrání oocytů</b> .....	<b>28</b>
4.6.1 Folikulární tekutina .....	29
4.6.2 Kompaktnost granulózniých buněk .....	29
4.6.3 Steroidy.....	30
4.6.4 Androgen .....	32
4.6.5 Velikost folikulu .....	32
4.6.6 Gonadotropiny .....	32
4.6.7 Růstové faktory.....	33
4.6.8 Ostatní.....	33
<b>5 Závěr</b> .....	<b>35</b>
<b>6 Použitá literatura</b> .....	<b>36</b>

<b>7 Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>54</b>
---	-----------

# 1 Úvod

Reprodukční biotechnologie přinesly v průběhu vývoje četné metody, jako jsou embryotransfer, in vitro produkce embryí, umělá inseminace, které se využívají v reprodukci hospodářských zvířat.

Za běžných postupů kráva produkuje v průměru osm telat za život. Přičemž embryotransfer může toto číslo výrazně zvýšit až na 10 a více telat.

Další technologií spojenou s asistovanou reprodukcí je in vitro produkce embryí. Účinnost in vitro produkce embryí je však stále nízká, přičemž pouze 30-40 % oocytů se vyvíjí do fáze blastocysty, pravděpodobně proto, že prostředí in vitro nemůže napodobovat in vivo prostředí.

Proto se využila metoda – in vitro maturace. Která je nyní jedna z nejzajímavějších forem asistované reprodukce. Je to proces, při kterém se získávají nezralé oocyty z vaječníků krávy během estrálního cyklu. Metoda je navržena tak, aby vyhodnocovala a kultivovala oocyty



## **2 Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je sepsat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o in vitro zrání oocytů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Oocyt

Samičí pohlavní buňka patří k největším buňkám v těle. Její velikost u skotu je mezi 135-140  $\mu\text{m}$ . Tvar oocyty je kulovitý a obsah tvoří zrnitá část tzv. ovoplazma s obsahem žloutkových inkluzí. Tyto inkluze slouží vyvíjejícímu se zárodku jako energetický zdroj, ze kterého čerpá energii po dobu svého embryonálního vývoje. Oválné jádro leží mimo střed a obsahuje jadérko. Na blánu oocyty se přikládá *zóna pellucida* (Marvan a kol., 2011).

Oocyt je vybavený jedinečnou schopností kombinovat své vlastní komponenty s komponenty spermie, které směřují k vytvoření funkčního embrya. Oocyt je vysoce diferencovaný, molekulárně komplexní produkt gametogeneze, a to i navzdory vnějšímu prostému morfologickému vzhledu. Oocyt musí mít dva haploidní genomy v jednom embryonálním genomu, které by měli aktivovat transkripci tohoto genomu ve správný čas a aktivovat odpovídající řadu genů, které mají být přepisovány (Jeon, 2008).

Oocyty a pohlavní hormony – estrogeny a progesteron se tvoří v párové pohlavní žláze–vaječnicku. U krávy je vaječník relativně malý, ovoidního tvaru připomínající švestku. Nachází se těsně před vstupem do pánevní dutiny, přibližně uprostřed výšky pánevního vchodu (Marvan a kol., 2011).

#### 3.1.1 Mitotické a meiotické dělení

##### *Mitotické dělení*

Rovnoměrné rozdělení každého duplikovaného chromozomu mateřské buňky do buněk dceřiných je podstatou mitózy. Každý chromozom v mateřské buňce se duplikuje ještě před začátkem mitózy, konkrétně v průběhu S – fáze. Během této doby nelze v buněčném jádře identifikovat jednotlivé chromozomy, neboť jsou příliš dlouhé a příliš tenké. V průběhu mitózy se chromozomy zkracují, kondenzují se a na rozdíl od předchozích fází cyklu je možné jednotlivé chromozomy rozeznat. Období, během něhož, jednotlivé chromozomy nelze rozeznat, se nazývá interfáze. Tato fáze může trvat i velmi dlouho. Je vlastním časovým úsekem mezi jednotlivými po sobě jdoucími mitózami (Snustad et al., 2009).

Na začátku mitózy je již každý z chromozomů v buňce je již duplikován. Tyto duplikáty se nazývají sesterské chromatidy, které zůstávají těsně při sobě a jsou spojeny v oblasti centromery. Rozdělení duplikovaných chromozomů do dceřiných buněk je organizováno a zajišťováno pomocí mikrotubulů, což jsou komponenty cytoskeletu. V průběhu mitózy mikrotubuly vytvářejí složité prostorové uskupení tzv. vřeténko. Na vzniku vřeténka se podílí mikrotubuly organizující centra (MTOC), které se nacházejí v cytoplazmě eukaryotických buněk. V živočišných buňkách jsou MTOC tvořena malými organelami nazvanými centrozomy. Každý centrozom obsahuje dvě centrioly (Snustad et al., 2009).

K charakteristickým znakům prvního stádia mitózy označované jako profáze patří zahájení tvorby vřeténka a kondenzace duplikovaných chromozomů. Rovněž přestává být viditelné jadérko, tedy odlišitelná část uvnitř jádra, v nichž dochází k syntéze rRNA. Mitochondrie nebo chloroplasty, zůstávají během mitózy neporušeny (Snustad et al., 2009).

Centrioly putují k pólům buňky. Mezi nimi se vytváří z mikrotubulů dělicí vřeténko. Dochází k promíchání cytoplazmy a karyoplazmy (Marvan a kol., 2011).

Metafáze je charakterizována rozdělením chromozomů, které se seskupují kolem dělicího vřeténka ve střední rovině a vytvářejí hvězdicovitý útvar – *monaster* (Marvan, 2011).

Chromozomy se shromažďují v ekvatoriální rovině uprostřed buňky. V tomto stádiu dělení je každá z obou sesterských chromatid zdvojeného chromozomu připojena k opačnému pólu pomocí mikrotubulu, který je navázán k jejímu kinetochoru. Tato pozice sesterských chromatid hraje rozhodující roli v procesu rovnoměrné a přesné distribuce genetického materiálu do dceřiných buněk (Snustad et al., 2009).

Nakonec dochází k úplnému oddělení chromatid, a tím se každá chromatida stává samostatným chromozomem (Marvan a kol., 2011).

Sesterské chromatidy zdvojených chromozomů se během anafáze od sebe odlišují. Rozdělení sesterských chromatid je podmíněno zkracováním kinetochorových mikrotubulů a současně degradací proteinů, které drží sesterské chromatidy pohromadě v místě centroméry. Zkracováním mikrotubulů jsou sesterské chromatidy taženy k opačným pólům buňky. Oddělené sesterské chromatidy

se nazývají chromozomy. Jakmile jsou přesunuty k pólům, samotné póly se od sebe vzdalují. Jestliže je toto rozdělení dokončeno, chromozomy se opět dekondenzují do podoby chromatinových vláken a znovu se tvoří organely. Každá sada chromozomů se znovu obaluje jadernou membránou (Snustad et al., 2009).

Dekondenzace chromozomů a obnovení organel jsou charakteristickými znaky telofáze (Marvan a kol., 2011).

Telofáze je poměrně dlouhá fáze, v níž dochází k rekonstrukci dceřiného jádra a jadérka. Prohlubuje se rýha v místě zaškrvení a dochází k oddělení dvou buněk. Dělicí vřeténko zaniká (Marvan a kol., 2011).

Obě dceřiné buňky, které vznikly dělením buňky mateřské, jsou geneticky identické a každá z nich obsahuje stejný počet chromozomů (Snustad et al., 2009).

### *Meiotické dělení*

Meióza je typ dělení, kdy z diploidních ( $2n$ ) zárodečných buněk vznikají haploidní gamety ( $1n$ ). Gamety vznikají po dvou následných děleních: meióze I. a meióze II., mezi kterými je krátká interfáze, ale nedochází k replikaci DNA. Pro meiózu je charakteristické párování homologních chromozomů v profázi I. a jejich rozchod a anafázi I. Meióza je tedy redukční dělení (Otová a Mihalová, 2012).

Meióza je proces, kterým se diploidní stádium redukuje na haploidní, počet chromozomů je tedy poloviční. Proces meiózy v sobě zahrnuje dvě buněčná dělení. K duplikaci chromozomů mechanismem syntézy DNA dochází před prvním z obou dělení (Snustad et al., 2009).

### Meióza I.

První meiotické dělení je relativně složitější. Ve srovnání s meiózou II. trvá delší dobu. Když toto dělení začíná, chromozomy v buňce jsou již duplikované; každý z nich tedy obsahuje dvě sesterské chromatidy. Profáze meiózy I. – nebo prostě profáze I. se skládá z pěti fází, z nich každé se označuje určitým termínem (Snustad et al., 2009).

*Leptotene*, kde se chromozomy stávají viditelnými, ale není ještě možné rozlišit jejich sesterské chromatidy (Otová a Mihalová, 2012). Předpokládá se, že počáteční asociace homologních chromozomů je zprostředkována párováním bází mezi komplementárními řetězci DNA v průběhu leptotene předtím, než se chromatin stává vysoce kondenzovaným (Cooper, 2000).

S pokračující kondenzací chromozomů se přechází do *zygotene*. Během *zygotene* se párují homologické chromozomy (Otová a Mihalová, 2012). Tento proces párování homologických chromozomů se označuje jako *synapse* (Cooper, 2000). U některých druhů začíná *synapse* na koncích chromozomů a pokračuje směrem ke středu. *Synapse* je doprovázena zvláštní strukturou párujících se chromozomů. Během tohoto stádia se na délce párovaných chromozomů vytváří struktura podobná zipům nazývaná *synaptonemální komplex* (Cooper, 2000). Úlohou tohoto komplexu v procesu párování chromozomů a následných fází *meiózy* není zcela objasněna (Snustad et al., 2009).

Během pokračující *synapse* se zdvojené chromozomy kondenzují do stále menšího objemu. Výsledné zesílení chromozomů je charakteristické pro *pachytene*. V průběhu *pachytene* jsou spárované chromozomy snadno pozorovatelné. Každý se skládá ze dvou zdvojených chromozomů, z nichž každý je tvořen dvěma sesterskými chromatidami. Dříve či později si spárované chromozomy mohou vyměňovat svůj genetický materiál pomocí *crossing overu*. Na tomto místě stačí říci, že v sesterských chromatidách může během *pachytene* docházet ke zlomům a části chromatid mohou být následně v *tetrádách* vyměněny (Snustad et al., 2009).

Skutečnost, že k těmto typům výměn došlo, může být zjevná během další fáze *meiózy* I., *diplojene*, při níž se spárované chromozomy od sebe trochu oddělují, nicméně zůstávají v těsném kontaktu v místech, kde došlo k překřížení. Při podrobném zkoumání *chiazmat* se ukazuje, že každá z nich obsahuje pouze dvě ze čtyř chromatid v *tetrádě*. Ke konci *profáze* I. se chromozomy dále kondenzují, jaderná membrána se rozpadá a vytváří se dělicí vřeténko (Snustad et al., 2009).

Mikrotubuly vřeténka pronikají do prostoru jádra a připojují se na *kinetochory* chromozomů. Chromozomy se pohybují směrem do ekvatoriální roviny (Snustad et al., 2009). *Diakineze*, finální fáze *profáze* I., představuje přechod k *metafázi*, během níž se chromozomy plně kondenzují (Cooper, 2000).

V průběhu *metafáze* I. jsou spárované chromozomy orientovány k opačným pólům dělicího vřeténka. Na konci *profáze* I. a během *metafáze* I. se *chiazmata*, která drží *bivalenty* pohromadě, posouvají směrem od *centromery* ke koncům chromozomů. Chromozomy se od sebe definitivně oddělují během *anafáze* I. Jakmile se rozdělené chromozomy shromáždí u opačných pólů, první *meiotické* dělení se blíží k závěru. Další stádium je označováno jako *telofáze* I., kde se dělicí vřeténko

rozpadá, dceřiné buňky jsou ode sebe odděleny svými plazmatickými membránami, chromozomy dekondenzují a kolem chromozomů v každé z obou dceřiných buněk je obnoven jaderný obal (Snustad et al., 2009).

Buňky vzniklé meiózou I. obsahují haploidní počet chromozomů, které se stále ještě skládá ze dvou sesterských chromatid. Tyto chromatidy nemusí být geneticky identické, protože mohlo dojít k výměně materiálu s homologickým partnerem během profáze I. (Snustad et al., 2009).

Meióza II. je zahájena bezprostředně po cytokinezi, obvykle před tím, než jsou chromozomy zcela dekondenzovány. Na rozdíl od meiózy I., meióza II. připomíná normální mitózu (Cooper, 2000).

Během meiózy II. se chromozomy opět kondenzují a připojují se k novému dělicímu vřeténku (profáze II.). Poté se přesouvají do ekvatoriální roviny (metafáze II.) a jejich centroméry se oddělují, aby se sesterské chromatidy mohly pohybovat k opačným pólům buňky (anafáze II.) - tento jev se nazývá rozdělení chromatid. V průběhu telofáze II. se oddělené chromatidy, nyní jako chromozomy – shromažďují u pólů a následným vytvořením jaderných obalů vznikají nová dceřiná jádra. Každé z dceřiných jader obsahuje haploidní sadu chromozomů (Snustad et al., 2009).

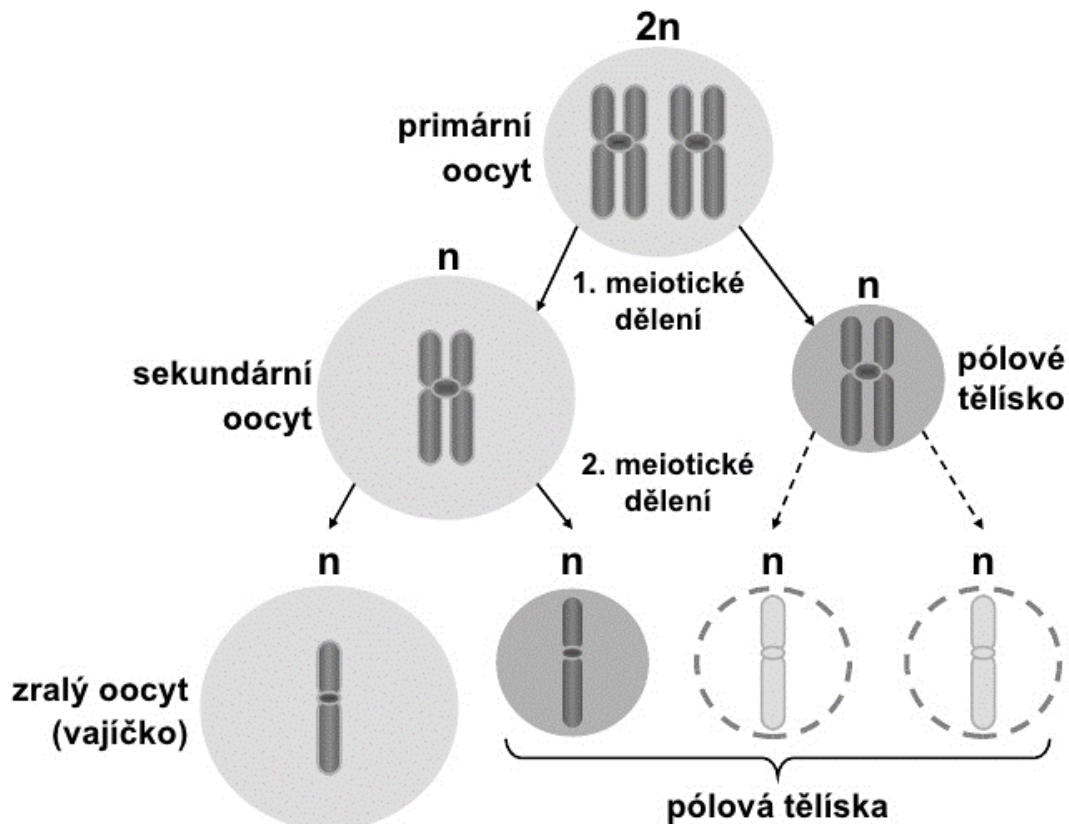
### **3.1.2 Oogeneze**

Oocyty se začínají vyvíjet ze zárodečných kmenových buněk – oogonií. Tyto buňky se mitoticky dělí. V růstové fázi dochází u nich ke zmnožení žloutku a k jejich následné přeměně na oocyty prvního řádu (Marvan a kol, 2011).

Opakovanými mitózami zárodečných diploidních oogonií ve folikulech vaječníků vznikají oocyty I. řádu. Tyto oocyty se během meiózy I. mění na oocyty II. řádu, které mají haploidní počet chromozomů. Druhá buňka, která má jen nepatrné množství cytoplazmy je označována jako pólové tělísko (pólocyt I.). Obě haploidní buňky prochází meiózou II. (Hruban a Majzlík, 2000).

Z plnohodnotného oocytu II. řádu vznikne rozdělením jedna zralá haploidní gameta a odštěpí se další pólové tělísko (pólocyt II.). První pólocyt projde dalším dělením. Z jedné oogonie ( $2n$ ) vznikne jeden oocyt oplození-schopný a tři rudimentální pólocyty, které již zaniknou (Obr. 1) (Hruban a Majzlík, 2000).

Z jednoho primárního oocytu vznikne po redukčním dělení pouze jedno vajíčko (Marvan a kol., 2011).



Obrázek 1: Oogeneze, vznik oocytu a pólových tělísek <https://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-cytogenetika-i>

### 3.1.3 Folikulogeneze

Vaječník savců je samičí reprodukční orgán, jejichž hlavními funkcemi jsou formování, diferenciace zárodečných buněk a produkce steroidních hormonů (Edson et al., 2009).

Vývoj folikulů od primární fáze až po preovulační folikul se mění u savců podle druhu (Paulini et al., 2014).

Proces folikulogeneze lze rozdělit na tři vývojové fáze. A to preantrální folikulární růst: až primární přechod folikul a tvorba a růst sekundárních folikulů; bazální antrální růst folikulů: antrum a vývoj časných antrálních folikulů na gonadotropin-dependentní fáze; a terminální antrální folikulární růst: vývoj antrálu na preovulační folikul (Silva et al., 2009).

Během fáze se objevuje několik prvotních folikulů, které jsou aktivovány z jejich klidového stavu a jsou obklopeny granulózními buňkami. Které jsou považovány

za primární folikuly, tj. granulózní buňky proliferují a obklopují folikuly ve větším počtu vrstev. Přidáním dalšího somatického prostředí buněk, theca buněk, signalizuje postup do sekundární fáze. Vzhledem k tomu, že okolní somatické buňky dále proliferují, granulóza a theca buňky produkují folikulární tekutinu, čímž vzniká antrum. Dalším zdrojem tvorby folikulární tekutiny je přenos plazmatických složek přes krevní folikulární bariéru (Revelli et al., 2009).

Přítomnost této antrální dutiny označuje přechod do terciárního stupně. V závislosti na druhu, může tento proces dokončit různý počet folikulů v růstu a dozrávání, aby proběhla ovulace (preovulační), může tento proces růstu a dozrávání dokončit různý počet folikulů v závislosti na druhu, zatímco zbývající folikuly v kohortě podstoupí atrezii (podřízené folikuly) (Woodruff et al., 2007).

Folikuly v ovariální kůře jsou v různých stádiích vývoje nebo regrese. Tvorba folikulů začíná folikulogenezí, která může být definována jako proces, kdy primordiální folikul, který se skládá z malého zárodku buněk a vrstev plochých granulózních buněk. Tento folikul roste a rozlišuje se do vysoce diferencovaného antrálního folikulu, tzv. preovulační folikul, který dozrává a ovuluje in vivo po nárůstu LH. Takový to preovulační folikul obsahuje plně rozvinutý oocyt, v závislosti na druhu obsahuje tisíce až milióny buněk granulózy a antrum, které je obklopeno theca buňkami (jak vnitřní, tak i vnější část) (Silva et al., 2009).

#### *Primární a sekundární oocyt*

Zatímco všechny oogonie v jednom shluku jsou pravděpodobně odvozeny z jediné buňky, známé jako folikulární buňky, pocházející z povrchu epitel-pokrývající vaječníky. Většina oogonií se dále rozděluje mitózou, ale některé z nich zastaví své buněčné dělení v profázi meiózy I. a tvoří primární oocyty. V příštích několika měsících se počty oogonií rychle zvyšují a s nástupem pátého měsíce prenatálního vývoje. Celkový počet zárodečných buněk ve vaječníku dosahuje svého maxima odhadovaného na 7 milionů (Sadler and Langman, 2004).

Primární oocyt spolu s epiteliální buňkou, je znám jako primordiální folikul. V době narození začnou všechny primární oocyty v profázi meiózy I., vstupovat do diploidní fáze a klidové fáze během profáze, která je charakterizována sítí chromatinu (Sadler and Langman, 2004).



Během tohoto zastavení v profázi se hromadí a skladuje žloutek a proteiny potřebné pro vývoj embrya v časně fázi po oplodnění. Oocyt tak nabývá na velikosti. Při sexuální zralosti jedince je několik oocytů stimulováno periodicky působením hormonů estrálního cyklu, což vede k dokončení meiózy I. Projeví se to asymetrickým dělením, při němž většina žloutkové cytoplazmy zůstane ve vyvinutém oocytu, který se nyní nazývá sekundární oocyt. Druhá polovina chromozomů je vypuzena z oocytu, vytvářející zbytkové struktury – polární tělíška. Proces se zastaví v metafázi. (Masopust a kol., 2003).

### **3.1.4 Nukleární a cytoplazmatické zrání**

#### *Nukleární zrání*

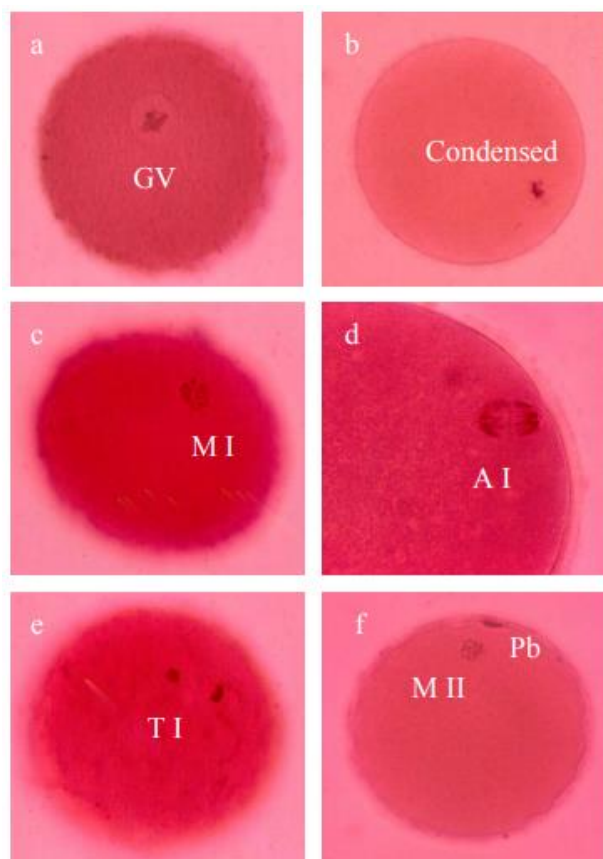
Jaderné zrání se týká progresu jádra oocytů ze zárodečného vezikulu do fáze metafáze II. Jaderné zrání zahrnuje GVBD, kondenzaci chromozómů, tvorbu vřetének metafáze I., separaci homologních chromozómů, vytlačování prvního polárního tělíška a zastavuje se v metafázi II. (Kubelka et al., 1988). Jaderná membrána začíná růst, jaderné póry zmizí a jaderná membrána se rozpadá a rychle mizí (Szollosi et al., 1972). Doba nezbytná pro ukončení nukleárního dozrání bovinního oocytu je 24 hodin (Obr. 2, Tabulka 1) (Sirard et al., 1989).

Jaderné zrání zahrnuje změny v syntéze proteinu (Hunter and Moor, 1987). Schopnost oocytů dokončit meiózu je známá jako meiotická kompetence. Při růstu folikulů se postupně získává meiotická kompetence. Oocyty nejprve získávají schopnost podstoupit GVBD a kondenzaci chromozómů, pak je v dalším vývoji folikulů třeba získat schopnost pokročit do metafáze I. (Tsafriri and Channing, 1975) a poté konečně získávají schopnost dosáhnout metafáze II. (Sorensen and Wassarman, 1976). Schopnost dokončit přechod z meiózy I. do meiózy II. se shoduje s dosažením plné velikosti a s procesem jaderného zhutnění (Motlik et al., 1984).

Rostoucí oocyty mohou být zařazeny jako nekompetentní nebo kompetentní k obnovení meiózy (Szybek, 1972; Arlotto et al., 1996). Nekompetentní bovinní oocyty zůstávají ve fázi GV, protože nemají dostatečné množství cyklinu B pro profázi I. (Levesque and Sirard, 1996).

Bovinní oocyty získávají schopnost dokončit GBVD a meiózu v době, kdy antrální folikul dosahuje průměru 2-3 min (Fair et al., 1995, Lonergan et al., 1994, Motlik and Fulka, 1986). Meiotická kompetence je také spojena s průměrem

oocytů, jelikož hovězí oocyty musí mít průměr 110  $\mu\text{m}$ , aby dokončily nukleární zrání do metafáze II. (Fair et al., 1995; Otoi et al., 1997).



Obrázek 2: Fáze zrání oocyty (Fair et al., 1995).

Obrázek	Nukleární fáze	Čas (h)
a	Germinální vezikul (GV)	0-6,6
	GVBD	6,6-8,0
b	Kondenzované	8,0-10,3
c	Metafáze I (MI)	10,3-15,4
d	Anafáze I (AI)	15,4-16,6
e	Telofáze I (TI)	16,6-18,0
f	Metafáze II (MII) a Polární tělíčko	18,0-24,0

Tabulka 1: Průměrná doba, kterou oocyty vynakládají v každé fázi, je uvedena v následující tabulce. Čas nula představuje počátek *in vitro* zrání (Sirard et al., 1989).

### Cytoplazmatické zrání

Cytoplazmatické zrání oocytů zahrnuje události, které vštěpují schopnost oocyty dokončit jadernou energii zrání, oplodnění a časné embryogeneze,

a tak poskytnout základ pro implantaci, zahájení březosti a normálního vývoje plodu (Brevini-Gandolfi and Gandolfi, 2001; Sirard et al., 2006).

Obecně se jedná o cytoplazmatické zrání oocytů, akumulaci mRNA, proteinů, substrátů a živin, které jsou nezbytné k dosažení kompetence oocytů, která podporuje embryonální vývoj (Brevini-Gandolfi and Gandolfi, 2001; Krisher, 2004; Sirard et al., 2006).

### *Oplození*

Oplození je proces, kdy samčí a samičí gamety, vyskytující se v oblasti děložní trubice splynou. Toto je nejširší část trubice a je blízko vaječníku. Spermie může zůstat životaschopná v samičím reprodukčním ústrojí několik dní. Pohyb spermatu z cervikální děložní trubice nastává svalovou kontrakcí dělohy, děložní tubicí a svým vlastním pohybem. Cesta od děložního čípku až do vejcovodu může trvat 30 minut nebo až 6 dní (Sadler and Langman, 2004).

Spermie nejsou schopné k oplodnění oocytů okamžitě po transportu do samčího genitálního traktu, ale musí se podrobit kapacitě a akrozomové reakci a tím tuto schopnost získat (Sadler and Langman, 2004).

Spojení oocytu a spermie se vyskytuje v několika fázích, které probíhají v pevně daném chronologickém pořadí (Dietl and Rauth, 1989).

Samčí spermie musí strávit čas buď v samičím reprodukčním traktu in vivo anebo v definovaném maturačním médiu in vitro podmínkách, kde získají schopnost vázat se na zóna pellucida a dokončit akrozomální reakci. Tento proces dozrávání samičích spermií se nazývá "kapacita". Tyto změny činí spermie oplození schopné (Wassarman, 2009).

Akrozomová reakce je forma buněčné exocytózy, která se skládá z několika fází mezi spermatickou vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou. Důležité jsou enzymy, které rozruší mezibuněčnou hmotu mezi buňkami *corona radiata* a povrchovými receptory. Ty se vážou na zóna pellucida. Pouze spermie reagující s akrozomem může proniknout přes zóna pellucida (ZP) (Wassarman, 2009).

Po průchodu ZP se spermie přikládá k povrchu oocytu a buněčné membrány. Spermie a oocyt v tomto místě splynou. Do cytoplazmy oocytu pronikne hlavička

a část bičíku. Proniknutí spermie doprovází kortikální reakce, kdy dojde k zabránění průniku dalších spermií do cytoplazmy oocyty. Po proniknutí spermie do oocyty se dokončí druhé zrací dělení (Marvan a kol.,2011).

## **4 In vitro zrání oocytů**

### **4.1 Historie IVM**

V roce 1935, byla in vitro metoda zaznamenána u Pincus and Enzmann, (1935). Metoda byla vyzkoušena na králíkovi, protože ovuluje hned po kopulaci. Oocyty byly aspirovány z velkých folikulů a kultivovány in vitro podmínkách. Kultivační médium se skládalo ze sterilní krevní plazmy králíka, do které bylo přidáno několik kapek fosfátového pufovaného Ringerova roztoku (Pincus and Enzmann, 1935). Oocyty byly kultivovány při teplotě 38 °C, fixována v Bouinově roztoku a připravena pro mikroskopické vyšetření (Pincus and Enzmann, 1935).

Pincus and Enzmann (1935) došli k závěru, že vyjmutím oocytů z organismu vede k typickým jevům zrání, které jsou zjevně nedotčeny přítomností hormonů hypofýzy nebo tyroxinu v kultivačním médiu. Nyní lze získat zralý oocyt izolováním v přirozeném folikulárním prostředí. Přičemž se u oocytů vyskytuje určitá chronologická sekvence událostí v oocytech a folikulech po maturaci (Pincus and Enzmann, 1935).

### **4.2 In vitro zrání bovinních oocytů**

Maturace oocytů je fyziologická událost, která je vyžadována pro úspěšné oplození a vývoj embrya (Lonergan and Fair, 2015). In vitro zrání (IVM) oocytů se stává zajímavou alternativou klasické asistované reprodukce (Ali et al., 2006).

Tato metoda má potenciál zachytit obrovskou zásobu oocytů uvnitř vaječníku a umožňuje vytvářet zralé oocyty. IVM je důležitou technologickou základnou pro umělý chov, klonování a transgenní produkci zvířat (Gilchrist and Thompson, 2007).

IVM zahrnuje umělé odstranění oocyto-kumulárního komplexu (COCs) z antrálních folikulů a kultivovat je ve standardní buněčné kultuře. Kultivace u skotu trvá 24 hodin, dokud nedosáhnou do metafáze II. (Lonergan and Fair, 2015).

Bovinní oocyty dosáhnou svého plného rozsahu, když je velikost folikulu v průměru přibližně 3 mm (Lonergan and Fair, 2015).

Účelem zrání oocytů in vitro je produkce zralých oocytů, které by mohly podpořit budoucí vývoj. Za účelem o zlepšení vývoje byla vyvíjena o zlepšení schopnosti vývoje oocytů tím, že se vyvinuly optimální kultivační podmínky pro dozrání oocytů (Nikmard et al., 2017).

IVM představuje cenný a téměř neomezený zdroj surovin oocytů a po IVF embryí. Pro základní výzkumné studie má relativně malou nabídku, pokud jde o genetické zlepšení (Carter et al., 2002, Kruij et al., 1991).

### **4.3 Odběr oocytů**

V následujících letech se široce využívá ovum pick up (OPU) s využitím in vitro fertilizace (IVF). Pomocí výzkumu prováděných u lidí pro posouzení dopadu různých typů jehel, velikosti jehel a podtlaků na sběr oocytů se zjistilo, že velikost jehly a podtlaku ovlivňuje úspěšnou aspiraci oocytů ze zralých folikulů (Boni, 2012).

Zejména chovatelé dobytka chtějí získat co nejvíce potomků z jejich geneticky nadřazených nebo důležitých chovných zvířat. Mnohonásobnou ovulací a přenos embrya je možný opakovat asi 4x ročně u skotu. Nicméně výnos z přeneseného embrya je velmi variabilní (Hashimoto, 2009).

#### **4.3.1 TUGA**

Technika transvaginální ultrazuková aspirace (TUGA) je metoda pro odběr oocytů. Jde o neinvazivní postup pro získání oocytů z antrálních folikulů v živých zvířatech (Pieterse et al., 1988), která nemá již vliv na fertilitu zvířete (Gordon, 2003).

Tato metoda byla vyvinuta za účelem pomoci v boji proti lidské neplodnosti. Jakmile si lidé uvědomili došlo k uplatnění této technologie u skotu. Spolu s in vitro fertilizací oocytů byla technika OPU považována za nejflexibilnější a nejopakovatelnější techniku produkce embryí od kteréhokoli živého dárce. OPU nezasahuje do reprodukce a estrálního cyklu dárce. Přestože mezi dárci existují velké rozdíly, je možné díky ní produkovat více než 50 telat na dárcovskou krávu za rok (Pieterse et al., 1988).

Technika OPU u krav byla vyvinuta tak, aby opakovaně navracela oocyty z předchozího vybraného živého skotu s vysokou genetickou hodnotou (Kruip et al., 1983) k chovu velkého počtu telat s vědomím produkčních rysů Pieterse et al. (1988) uváděli, že konečným cílem bylo produkovat více embryí.

Systém OPU se skládá ze 3 částí: ultrazonálního snímače se sektorem, převodníku, aspiračního čerpadla a jehlového naváděcího systému připojeného k nádobě pro sběr oocytů. Pro tento účel je vhodný jakýkoli ultrasonograf, schopný produkovat obraz s vysokým rozlišením (Ligtvoet et al., 1989).

U skotu, který se používá k získání oocytů je důležité co nejdříve podat sedativa dle tělesné hmotnosti (Pieterse et al., 1988).

Vulva a perineum jsou důkladně vyčištěny a dezinfikovány předtím, než je do vagíny vloženo zařízení OPU, které obsahuje převodník sektorů a systém pro zavedení jehel. Zařízení má rukojeť, aby s ním mohlo být manipulováno jednou rukou mimo krávu. Hlava měniče je fixována kranio-dorsálně na levé nebo pravé straně vnější osy děložního čípku v závislosti na tom, který vaječník je vybrán (Van Soom et al., 1992).

Pomocí druhé ruky na konečníku operátor fixuje vaječník tak, aby byl umístěn proti hlavě snímače. Tímto způsobem jsou vaječníky a jejich folikuly jasně viditelné na obrazovce ultrasonografu. Vzhledem k tomu, že jehlový naváděcí systém je umístěn vedle snímače, lze vidět vstupující jehlu do naskenovaného sektoru a propíchnutí folikulů, jejichž obsah je aspirován při jejich splasknutí (Van Soom et al., 1992).

Linie punkce, která udává, kde má být folikul umístěn pro úspěšné propíchnutí, je naprogramována tak, že se v softwaru, který ovládá obraz ultrazvuku ho zobrazí na obrazovce (Van Soom et al., 1992).

Druhý operátor pohybuje jehlou pomalu dopředu, dokud není vaginální stěna propíchnuta a jehla nasměrována do folikulu. Jehlový naváděcí systém je spojen se sacím čerpadlem, který odsává folikulární obsah (Van Soom et al., 1992).

Folikulová tekutina a oocyt jsou shromažďovány v nádobě obsahujícím sběrné médium pro oocyty. Oocyty jsou identifikovány pomocí stereomikroskopu, zachyceny ve skleněné trubici a umístěny do maturačního média (Van Soom et al., 1992).

Proplachovací médium používané pro tento postup je fosfátově pufovaný fyziologický roztok (PBS) s 10 % bovinního séra, antibiotiky a heparinem. Při této metodě odsávání činí 60 až 70 %. Střední až velké folikuly, které jsou propíchnuty, vedou k získání oocytů. Získá se průměrně 3 až 10 oocytů na samici, která nebyla stimulována (Carter et al, 2002).

Dnes míra návratu oocytů transvaginální aspirací od živých krav je téměř stejná jako aspirace vaječníků z poražených krav. Používají se stříkačky při kombinaci aspirační jehly s průměrem 18 s aspiračním tlakem 40 mm Hg se sondou 7,5 MHz (Hashimoto, 2009).

#### **4.3.2 Metoda post-mortem**

Oocyty získané post mortem mohou být použity nejen jako zdroj oocytů pro kultivaci in vitro, ale i za účelem produkce velkého množství embryí pro výzkumné účely. Může být získáno průměrně 12,2 oocytů z každého jatečného vaječniku v laboratorních podmínkách s vývojem blastocysty v průměru 6,2 na poražené zvíře. Tyto údaje se liší od zdravých dárců pocházejících z jatečného původu. Podmínky, při kterých jsou vaječnický uchovávány během transportu do laboratoře a době po porážce, kdy jsou oocyty aspirovány, mohou ovlivnit vývojovou kompetenci těchto oocytů. Optimální odolnost se dosáhne aspirací středně velkých folikulů o velikosti 2,5 - 8 mm, 4 hodiny po porážce (Elder and Dale, 2000).

Oocyty jsou z vaječniku v laboratoři získávány ze všech viditelných folikulů. Protože tyto oocyty jsou pocházející z folikulů, které nebyly připraveny k ovulaci a jsou nezralé, tak se umístí v kultuře po dobu 24 hodin, aby došlo k dozrání v in vitro podmínkách. (Hinrichs, 2010).

##### *Transport oocytů*

Oocyty skotu se získávají z vaječníků poražené nebo živé krávy, které se staly převládajícím zdrojem postupů pro IVF, klonování a další související reprodukční technologie. Oocyty mají omezený čas, během kterého zůstávají životaschopné a oplození schopné. Proto by měla být vyvinuta technika pro uchování oocytů skotu ve fázi germinálních vezikul (GV). Má to velký dopad na výzkumné a komerční aplikace v procesu rozšíření transvaginální techniky. Úspěšné uchování oocytů ve fázi zárodečných buněk jednoduchým a snadným způsobem umožní přepravu

oocytů shromážděných z krav ultrazvukovou transvaginální aspirací a zvýší dostupnost hovězích oocytů (Hashimoto, 2009).

Při přepravě, kdy je doba menší než 2 hodiny, by vaječníky měly být uchovávány při tělesné teplotě 37 °C. Při delší přepravě, by měly být vaječníky ochlazeny na pokojovou teplotu 20 °C. Vaječníky musí být uchovány tak, aby se minimalizovalo kolísání teploty během přepravy. Pro přepravu autem, mohou být vaječníky umístěny v boxu s polystyrenem se zátěží (láhve nebo pytle s vodou při vhodné teplotě) rozmístěných kolem nich (Hinrichs, 2010).

Hovězí vaječníky jsou získány z jatek a přepraveny do laboratoře do 2 hodin v roztoku 0,9 % NaCl obsahujícím 100 000 IU/l penicilinu, 100 mg/l streptomycinu a 250 mg/l amfotericin B. V laboratoři jsou vaječníky umyty třikrát ve fyziologickém roztoku (Wang et al., 2007).

#### *Laboratorní zpracování oocytů*

Laboratorní manipulace s nezralými oocyty pro IVM je časově náročnější a technicky se liší v porovnání s tradičními IVF oocytů (Hreinsson et al., 2003). Vaječníky jsou několikrát promyty předem zahřátým fyziologickým roztokem, dokud se většina krve nevymyje z vaječnicků. Po promytí jsou vaječníky umístěny do kádinky obsahující čerstvý salinický roztok a uchovávány při teplotě 38,5 °C až do doby sběru oocytů. Množství 100 ml sběrného média pro oocyty se přidá do sterilní 400 ml kádinky (Shahid et al., 2014).

Aby vaječník pevně držel na svém místě, tak se k vaječnicku připojuje hemostat. Přebytečná tkáň je odříznuta (Shahid et al., 2014).

Oocyty jsou odsáty jehlou o velikosti 18 mm z folikulů o průměru 2 až 5 mm a umístí se do kuželové nádoby o objemu 50 ml. Po zpracování vaječnicků se oocyty nechají sedimentovat přibližně 15 minut. Když sediment odpovídá parametrům je dán do Petriho misky 60 x 15 mm. Jsou vybrány pouze oocyty s neporušeným, kompaktním *cumulus oophorus* s rovnoměrnou granulovanou cytoplazmou (Leibfried and First, 1979).

Poté se promyjí v konečném maturačním médiu. Třídy oocytů A a B se umístí maturačního média (50 µl kapky) pokryté 10 ml parafinového oleje (třikrát extrahovaný a sterilizačně sterilizován 0,9 % NaCl) (Teresa et al., 1992) v petriho



misce 60 x 15 mm a inkubují se při teplotě 38,5 °C po dobu 22–24 hodin v řízené plynné atmosféře tvořené 5 % zvlhčeným vzduchem (Neglia et al., 2003).

Zvláštní pozornost by měla být věnována pH a teplotě během několika manipulačních kroků IVM, aby byla zajištěna odpovídající syntéza proteinů a zachování stabilní morfologie dělicího vřeténka (Sun et al., 2004; Edwards and Hansen, 1996; Roth and Hansen, 2005). Změny v těchto parametrech u modelů skotu (Roth and Hansen, 2005) a prasat (Tong et al., 2004) prokázaly, že negativně ovlivňují schopnost oplození oocyty a rozvíjet se.

#### **4.4 Kultivační podmínky**

Vliv média na zranění oocyty závisí na mikroprostředí oocyty. Významnému zlepšení celkové rychlosti dozrávání oocytů a vývoj embryí lze dosáhnout přidáním zralé samičí tekutiny z velkých folikulů v kultivačním médiu. Studie zkoumaly množství kultivačních modifikací založených na fyziologii, které se vyskytují v samičích reprodukčních orgánech (Ali et al., 2006).

Vlastnosti oocytů a morfologie embryí, metabolické a biochemické vlastnosti mohou být změněny v prostředí *in vitro*. Tyto změny se mohou projevit jako chyby, které mohou být slučitelné s časným embryonálním vývojem, ale jsou škodlivé pro životaschopnost (Ali et al., 2006).

##### *Kultivační médium*

Kultivační médium používané u skotu IVM může být široce rozděleno na jednoduché a složité. Jednoduchá média jsou obvykle systémy s pufovanými bikarbonáty obsahující základní fyziologický roztok s přidáním pyruvátu, laktátu a glukózy. Hlavní rozdíly mezi různými formami jednoduchých médií spočívají v rozdílech v jejich iontové koncentraci a úrovni energetických zdrojů (Gordon, 2003).

Média jsou obvykle doplněna sérem nebo albuminem se stopovým množstvím antibiotik (penicilin, streptomycin, gentamycin). Komplexní média obsahují kromě základní složky jednoduchých médií také aminokyseliny, vitamíny, puriny a další látky, v podobných koncentracích jako se nacházejí v séru. Pevný dusík je přítomen jako volná aminokyselina (Gordon, 2003).

Tyto podmínky podporují meiotické zrání přibližně u 90 % oocytů a stanovují podmínky pro vysokou frekvenci oplození a vývoj až do fáze blastocysty (Fa and Farin, 1995; Thompson et al., 1995, Gardner, 1994).

#### *Teplota, čas a plynné prostředí*

Fyzikální podmínky používané pro in vitro zrání jsou obecně dány druhem zvířete (37 °C u primátů a malých hlodavců, 39 °C u domácích zvířat) (Thibault and Levasseur, 2001). Kultivace bovinních oocytů probíhá po dobu 24 hodin při teplotě 38,5 °C při koncentraci 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzdušné atmosféře (Sirard and Coenen, 2006).

#### *Osmolarita a pH*

Pokud jde o osmolaritu, cílem je, aby maturační médium s přírodními tkáňovými tekutinami (např. folikulární tekutina), které jsou v kontaktu s oocytom v živém zvířeti bylo izotonické. Osmolarita je obvykle pohybuje mezi 270 a 285 mos/mol. To je považováno za optimální rozsah (Gordon, 2003).

Médium má mít podobné vlastnosti jako folikulární tekutina (FF). Obvykle se osmotický tlak folikulární tekutiny pohybuje mezi 280 a 320 mOsm/kg a pH mezi 7,3 a 7,4 (Thibault and Levasseur, 2001).

#### *Pufrační systém*

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

#### *Antibiotikum*

Ideální antibiotika pro oocyt by měla mít širokospektrální aktivitu. Použití stopového množství penicilinu (50-100 iu/ml) a streptomycinu (50-100 mg/ml) v proplachovacích tekutinách a kultivačních médiích byla rutinní praxí v transplantaci embryí skotu (ET) po mnoho let. Do maturačního média jsou obvykle antibiotika dodána, aby zabránila růstu a proliferaci mikroorganismů během kultivace (Gordon, 2003).

#### 4.4.1 Efektivita zrání

Pro efektivitu zrání je důležité kultivační médium, které je důležitým faktorem v technologii buněčné kultury. Médium podporuje přežívání a proliferaci buněk a buněčné funkce, což znamená, že kvalita média přímo ovlivňuje výsledky výzkumu, míru biofarmaceutické produkce a výsledky technologie asistované reprodukce (Tatsuma and Asayama, 2017). Médium používané pro zrání oocytů in vitro může ovlivnit procesy, které se podílejí na následném vývoji oocytů (Van de Sandt et al., 1990), jako třeba podmínit úspěšnost zrání oocytů, oplození a později i vývoj embryí (Gliedt et al., 1996).

Je proto nezbytné, aby lidé, kteří pracují s buněčnými kulturami, vybrali médium, které je vhodné pro dosažení správných výsledků (Tatsuma and Asayama, 2017).

Několik komerčně dodávaných médií se běžně používá pro základní IVM kultivační systém; jako jsou tkáňové médium pro kultivaci (TCM-199), Hamovo kultivační médium F-10 (Ham's F-10), Hamovo kultivační médium F-12 (Ham's F-12), Minimální základní médium (MEM) a Dulbeccova modifikace Eaglova média (DMEM) přičemž hrají významnou roli v efektivitě zrání (Ward et al., 2002).

Obecně se kultivační média skládají z bikarbonátových iontů, aminokyselin, zdrojů energie a různých aditiv, které umožňují přibližně 80 % nezralých oocytů projít metafází druhého meiotického dělení (Ward et al., 2002).

Kompletní kultivační médium pro buňky vyžaduje další složky, které nejsou přítomné v bazálním médiu a v séru. Tyto složky, doplňky pomáhají udržovat proliferaci a udržovat normální buněčný metabolismus (Bettger et al., 1981; Bottenstein et al., 1979). Tyto doplňky hrají důležitou roli v procesu zrání, soli, hydrogenuhličitanové ionty, pyruvát sodný (Arlotto et al., 1996), laktát sodný, glutamin (Fukui, 1990), glukóza a  $\text{NaHCO}_3$  (Younis et al., 1989), ethylen glykol bis (2 - aminoethyl ether) tetra acetylová kyselina ( $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ) (Blanco et al, 2000).

Rozdíl mezi Hankovou a Earlovou solí je, že Earlova sůl vyžaduje inkubaci při přítomnosti 5 %  $\text{CO}_2$  a Hankova sůl se používá bez přítomnosti  $\text{CO}_2$ .

Hankova sůl se používá v MEM (Clark et al., 1987), TCM 199 (Sirard and Bilodeau, 1990) a Earlova sůl v MEM (Trounson et al., 1998), DMEM (Van de Sandt et al., 1990), TCM 199 (Fukui et al., 1991).

Sérum je složitá směs albuminů, růstových faktorů a inhibitorů růstu (Lane and Miller., 1976). Sérum je jednou z nejdůležitějších součástí kultivačních médií a slouží jako zdroj aminokyselin, proteinů, vitamínů (zejména vitamínů rozpustných v tucích, jako je A, D, E a K), sacharidů, lipidů, hormonů, růstových faktorů, minerálů a stopových prvků (Arora, 2003).

Séra FBS a FCS se běžně používají k podpoře růstu buněk v kultuře (Von Seefried and Macmotine, 1976). Fetální sérum je bohatým zdrojem růstových faktorů a je vhodné pro klonování buněk a pro růst citlivých buněk (Hornsby et al., 1983). Kultivační médium obsahuje kolem 2 až 10 % séra (Kragh-Hansen, 1981).

Předpokládá se, že sérum obsahuje řadu růstových faktorů a endotoxinů, které se mohou vzájemně prolínat s vývojem dozrávání oocytů (Young and Fairburn, 2000).

#### **4.4.2 Kultivační média**

##### *Tkáňové kultivační médium 199 (TCM 199)*

Nejrozšířenějším médiem pro zrání oocytů je TCM-199; toto médium je tlumeno hydrogenuhličitanem a obsahuje minerální soli; je zdrojem uhlíku, energie (glukóza) a aminokyselin (cystin a cystein). Ty jsou důležité v metabolismu glutationu a glutaminu, které s glukózou a pyruvátem poskytují hlavní zdroj energie oocytů (Mermillod et al., 1992; Steeves and Gardner, 1999).

##### *Hamovo kultivační médium F-10, Hamovo kultivační médium F-12*

Ham F-10 je klasické médium, které podporuje růst myších a lidských diploidních buněk (Yang and Xiong, 2012). Ham's F-12 se experimentálně použil pro růst vaječnicků u čínského křečka bez séra (Voelker and Frazier, 1986).

##### *Minimální esenciální médium*

MEM, nazývané také Eagleovo minimální základní médium, je médium buněčné kultury, který může být použit k udržení buněk v tkáňové kultuře. Obsahuje pouze 12 druhů neesenciálních aminokyselin, glutamin, 8 vitamínů a některé základní anorganické soli (Yang and Xiong, 2012).

##### *Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium*

Varianta média MEM, nazvaný Dulbecco modifikované Eaglovo médium (DMEM), obsahuje přibližně čtyřikrát více vitamínů a aminokyselin přítomné

v původním vzorci. Také obsahuje 2x až 4x více glukózy. DMEM se dále dělí na vysoký obsah glukózy: (glukóza 4500 g / l) a nízký obsah glukózy (1000 g / l glukózy) (Yang and Xiong, 2012).

Médium	Abnormality	Reference
TCM 199	Vytlačování prvního polárního tělíska, horší vliv na kumulaci oocyt komplex	Sosnowski et al., 2003; Gliedt et al., 1996,
TCM 199 + FBS	Degenerace polárního tělíska	Macías-García et al., 2017
TCM 199 + E <sub>2</sub> + FSH	Významně se sníží procento metafáze II., zvýší se procento nukleárních aberací	Beker et al., 2002
Ham's F-12	Nižší nukleární zrání	Smetanina et al, 2000; Leibfried and First.,1979
DMEM + FCS	Uvolněním kumulárních buněk, zvětšení perivitelinového prostoru nebo vytlačování prvního polárního tělíska	Suresh et. al., 2015

Tabulka 1: Abnormality způsobené kultivačními médii a přídatnými látkami při zrání oocytů.

#### *Souhrnné poznatky o médiích a přídatných látkách*

Smetanina et al. (2000) studovali schopnost oocytů skotu, které obnovili meiózu a dosáhli metafáze II. v různých kultivačních médiích bez bílkovin (DMEM, TCM-199, Ham's F-10 a Ham's F-12) (Smetanina et al., 2000).

V jejich experimentální sérii bylo ukázáno, že nejvyšší počet oocytů (76,1%) obnovil meiózu v médiu DMEM. Meióza nebyla obnovena v Hamově F-12. Středně pokročilé výsledky byly získány pro TCM-199 (55,1%), který se běžně používá pro zrání bovinních oocytů in vitro a Ham's F-10 (51,7%). Oocyty dosáhly metafáze II. v DMEM vyšší rychlostí (45,3%) než u TCM-199 nebo Ham's F-10 (29,4 a 8,6%) (Smetanina et al., 2000).

Nejčastěji používané IVM média jsou TCM-199 a Ham's F-10 (Mikkelsen and Lindenberg, 2001; Cha et al., 2000). Oocyty, které zrají v médiu TCM 199 nebo v Hamově médiu mají v podobnou vývojovou kapacitu jako kdyby zrály v MEM (Van de Sandt et al., 1990).

Beker et al. (2002) zjistili, že přidáním 1 µg / ml E2 k TCM 199 významně snížilo procento metafáze II. ve srovnání s kontrolou (56,3 a 74,0%) a zvýšilo procento nukleárních aberací ve srovnání s kontrolou (13,3 a 2,1%). Negativní účinek E2 na nukleární zrání byl silnější, když denudované oocyty dozrály; 25,1 a 60,0 % oocytů dosáhlo stupně metafáze II. Z toho vyplývá, že doplnění 1 µg / ml E2 do maturačního média bez séra negativně ovlivňuje nukleární zrání bovinních oocytů. Přestože jsou tyto účinky oslabeny za přítomnosti FSH, důrazně doporučují vynechání E2 v rutinních maturačních protokolech bovinních oocytů (Beker et al., 2002).

Fukushima and Fukui (1985) studovali bovinní oocyty, které byly získané z folikulů o průměru 2 až 5 mm, poté kultivovány in vitro po dobu 27 hodin v médiu obsahujícím Hams F-12 + 20 % FBS + antibiotikum. Kombinace hormonů přidávaných do média měla vliv na zrání: bez přídatných hormonů (55,4 %); E2 (67,0 %); LH (72,9 %); LH + E2 (62,6 %); FSH + LH + E2 (61,4 %); FSH + LH + E2 + P (74,1 %). Ve svých studiích zjistili, že celkově dozrálo 64,2 % bovinních oocytů.

Výsledky studie Ocaña Quero et al. (1994) ukazují, že FCS do maturačního média in vitro pro preovulační bovinní oocyty mají lepší rychlost dozrávání než ve vlastní folikulární tekutině.

#### **4.5 Hodnocení kvality oocytů**

Před in vitro fertilizací se kvalita oocytu obvykle vyhodnocuje podle struktury kumulo-oocytárního komplexu. Tato metoda je jednoduchá a poskytuje informace o kvalitě oocytů. Kvalitu oocytů lze určit hodnocením charakteristik struktury kumulo-oocytárního komplexu, cytoplazmy oocytů, polárního tělíska, perivitelinového prostoru, zóna pellucida a meiotickým vřeténkem (Tabulka 3) (Wang and Sun, 2007).

Kritéria	Parametry	Reference
COC	Kompaktní	Blondin and Sirard 1995; Warriach and Choban, 2004; Nagano et al., 2006
Cytoplasma	Granulovaná, zbarvená oblast shluku organel	Serhal et al., 1997; Balaban et al., 1998; Kahraman et al., 2000
Zóna pellucida	Tloušťka a struktura	Gabrielsen et al., 2004
Perviteliní prostor	Velikost (normální nebo zvětšený), přítomnost nebo absence zrn,	De Sutter et al., 1996; Hassan-Ali et al., 1998
Dělicí vřeténko	poloha a lom	(Cooke et al.,2003; Silva et al., 1999; Wang et al.,2001)
Polární tělísko	Tvar (kulovitý nebo ovoidní, velikost (malé nebo velké), povrch (hladké a kulaté), cytoplazma (intaktní nebo fragmentovaná)	Ebner et al., 2000; Ciotti et al., 2004

Tabulka 2: Kritéria dle, kterých se vybírají oocyty (Wang and Sun, 2007).

#### 4.5.1 Kumulo-oocytární komplex

Kumulo-oocytární komplexy shromážděné z ovariálních folikulů jsou klasifikovány podle kompaktnosti kumulu a charakteristik cytoplazmy oocytů. Bovinní kumulo – oocytární komplexy jsou například seskupeny do čtyř kategorií kvality (Gordon, 2003; Blondin and Sirard,1995; Mayes and Sirard, 2001).

- Kompaktní vícevrstvá kumulace; homogenní ooplasmu; celkově COC světlá a průhledná (Gordon, 2003).
- Kumulo-oocytární komplex kategorie A. Oocyty obklopené kompaktním kumulem skládajícím se z nejméně pěti vrstev buněk. Cytoplazma oocytů je téměř transparentní, homogenní nebo je na obvodu cytoplazmy vidět tmavý kruh (Blondin and Sirad,1995; Mayes and Sirard, 2001).
- Kumulo-oocytární komplex kategorie B. kumulus je méně kompaktní. Oocyty mají tmavou, mírně granulovanou cytoplazmu (Blondin and Sirard,1995; Mayes and Sirard, 2001).

- Kumulo-oocytární komplex kategorie C. Kumulující buňky jsou expandovány tmavou cytoplazmou. Oocyty mají tmavou, granulovanou cytoplazmu (Blondin and Sirad, 1995; Mayes and Sirard, 2001).

#### *Vyhovující*

Homogenně se objevující ooplasmu a kompaktní buňky těsně přiléhající k zóna pellucida (Gordon, 2003).

#### *Nevyhovující*

Jiné kategorie s nekompletními kumulujícími komplementy a heterogenní ooplasmu (Gordon, 2003).

Někteří vědci uváděli, že oocyty, které se nacházejí v kumulo-oocytárních komplexech kategorie B, vykazují nejvyšší vývojovou kompetenci (De Wit et al., 2000; De Wit and Kruip, 2001; Boni et al., 2002). Po in vitro fertilizaci se více oocytů vyvíjelo z komplexů kumulus-oocytů kategorie B než z komplexů kumulačních a oocytových buněk A a C ( $B > A > C$ ) (De Wit et al., 2000; De Witt and Kruip, 2001; Boni et al., 2002), ale důvody pro tento fenomén nejsou ještě jasné.

Bylo dostatečně zdokumentováno, že IVP pomocí oocytů s neúplným nebo poškozeným kumulem vede k výrazně nižšímu výsledku blastocysty, ve srovnání s kulturou COC s úplným, hustým kumulem; který dosáhl nejvyššího rýhování a produkci embryí (Merton et al., 2003; Shioya et al., 1988). Naproti tomu ostatní zprávy uvádějí, že COC s určitými vlastnostmi jsou spojené s časnými atreziemi. Počáteční expanze ve vnější buňce kumulující vrstvy a shlukované cytoplazmě, vykazují stejné nebo dokonce vyšší rozvojový potenciál než COC s úplnou, kompaktní, vícevrstvou a homogenní cytoplazmou (Hawk and Wall, 1994; Hazeleger, 1995; Blondin and Sirad, 1995).

I když je COC v nejvyšší kvalitě, tak na základě jeho morfologie, můžeme pouze dosáhnout přibližně 30-40 % blastocyst in vitro. Tato skutečnost silně naznačuje, že je zapotřebí další neinvazivní parametr kvality oocytů (Goovaerts et al., 2010).

Jiným významným faktorem při určování kvality oocytů je počet vrstev kumulujících buněk. Blondin and Sirad, (1995); Zeuner et al., (2003); Warriach and



Chohan, (2004); Yuan et al., (2005) uvádějí, že kvalita oocytů je lepší, když jsou oocyty obklopeny více vrstvami buněk.

Světelné mikroskopické hodnocení morfologie COC je nejčastěji používaná metoda k třídění nezralých COC podle kvality (Hawk and Wall, 1994).

Konečný test kvality oocytu je jeho schopnost oplození a vyvinu do fáze blastocysty během březosti, a nakonec produkovat živé tele (Lonergan et al., 2001).

#### **4.5.2 Cytoplazma**

Cytoplazma oocytu je klasifikována podle zbarvení, granulace (velké nebo malé granule; homogenní nebo skupinová distribuce granulí; ve středu nebo na okraji oocytů), velikost perivitelinového prostoru a distribuce organel (vakuoly, endoplazmatické retikulum) (Lasiene et al., 2009).

Morfologie cytoplazmy skutečně souvisí s vývojovým systémem COC kompetence (Boni et al., 2002) a světelné mikroskopické hodnocení. Jeho homogenita je proto velmi snadným a rychlým nástrojem k posouzení kvality oocytů (Borini et al., 2005).

Nagano et al., (2006) studovali vztah mezi cytoplazmatickými rysy a vývojem bovinních oocytů po oplodnění. Zjistili, že tmavá cytoplazma naznačila akumulaci lipidů a dobrou vývojovou tendenci potenciálu oocytů po fertilizaci in vitro. Světle zbarvená cytoplazma označuje nízkou hustotou organel se špatným vývojovým potenciálem.

Černá cytoplazma ukazuje stárnutí a nízkou hladinu pro rozvojový potenciál (Nagano et al., 2006).

#### **4.5.3 Zóna pellucida**

*Zóna pellucida* (ZP) je název pro relativně extracelulární povlak, který je vytvořen a obklopuje bovinní primární oocyt, čímž se oocyty zvětšují v průměrné šířce. ZP obklopuje vitelinní membránu (buněčnou membránu nebo plazmatickou membránu). Ve většině případů variabilní počet granulozních buněk obklopuje oblast a tato vrstva je nazývána *cohorta oophorous*. ZP je považována za produkt nejnvnitřnější vrstvy granulozních buněk. Mikrovilli z vitelinní membrány vajíčka pronikají do oblasti, stejně jako z granulozních buněk. ZP hraje důležitou roli při usnadňování interakce spermií a oocytů v době oplození (Green, 1997).

ZP je glykoproteinová schránka kolem oocytu, která usnadňuje a udržuje vazbu spermií a indukuje akrozomovou reakci (Green, 1997).

Ve struktuře se ZP skládá ze tří glykoproteinů, nazývaných ZP1, ZP2 a ZP3 (Topper et al., 1997).

ZP pomáhá chránit oocyt a má receptorová místa pro připojení spermatozoa během oplození. Specifický protein, ZP3, v oblasti slouží jako vazebné místo pro spermie. Přesná struktura tohoto proteinu se u jednotlivých druhů liší, a tato odchylka je hlavním důvodem, proč spermatozoa pochází z jednoho druhu (Frandsen et al., 2009).

Tloušťka ZP je 1-25 um (Wassarman, 2008). Uvolnění akrosinu dovoluje spermii proniknout přes zónu, čímž přichází do styku s plazmatickou membránou oocytů. Propustnost ZP se mění, když hlavička spermie přichází do kontaktu s povrchem oocytů. Tento kontakt vede k uvolnění lysozomálních enzymů z kortikálních granulí, které obklopují plazmatickou membránu oocytů. Na druhé straně tyto enzymy mění vlastnosti ZP a tím dochází k zabránění proniknutí dalších spermií (Kort and Behr, 2017).

Změny ve struktuře ZP, tloušťka a tuhost vůči oocytové kompetenci ovlivňuje biomechanické vlastnosti oocytů nebo embryí a může být účinnou metodou selekce oocytů nebo embryí (Kort and Behr, 2017).

#### **4.5.4 Periviteliní prostor**

Periviteliní prostor je subcelulární struktura, která se vyskytuje mezi ZP a plazmatickou membránou oocytů. Ta je bohatá na složky extracelulární matrix, které jsou nezbytné pro oplodnění, implantaci a vývoj embryí (Zhou et al., 2014).

#### **4.5.5 Dělicí vřeténko**

Dělicí vřeténko má významný vliv na správné vyrovnání chromozomů v oocytech a jejich segregaci během meiózy. Parametry dělicího vřeténka (poloha a lom) jsou často používány ke stanovení kvality oocytů (Cooke et al., 2003; Silva et al., 1999; Wang et al., 2001).

#### 4.5.6 Polární tělísko

Polární tělísko je vedlejším produktem meiotického dělení. Jedná se o malou buňku, u které normálně dochází k buněčné smrti. Polární tělíška typicky tvoří asymetrickou cytokinezi. Cytosol a organely jsou odsunuty do sekundárního oocyту během meiózy I., a pak do oocyту v meióze II. (Schmerler and Wessel, 2011).

Některá morfologická kritéria polárního tělíška, jako tvar (kulatý nebo vejčitý), velikost (velká nebo malá), povrch (hladké nebo hrubé) a integrita cytoplazmy (neporušené nebo fragmentované) lze použít k odhadu kvality oocyту (Ebner et al., 2000; Ebner et al., 2002).

#### 4.6 Faktory ovlivňující zrání oocyту

I kultivační podmínky mohou nepochybně ovlivnit vývoj, efektivitu a in vitro produkci embryí (IVP). Působením faktorů se projevuje častým selhání až 60 % nezralých oocyту. To téměř jistě souvisí s vnitřní kvalitou oocyту na začátku dozrávání (Tabulka 4.) (Lonergan et al., 2001).

Faktory ovlivňující zrání oocyту	
Faktory	Reference
Folikulární tekutina	Niwa, 1993; Yoshida et al., 1992; Funahashi and Day., 1997a
Folikulární prostředí média	Mattioli et al., 1988a; Ding and Foxcroft, 1994a
Granulozní buňky	Mattioli et al., 1988b; Ding and Foxcroft, 1992; Liu et al., 1997
Progesteron, estradiol	Thibault et al., 1996; Coskun et al., 1997
Androgen	Petr et al., 1996; Coskun et al., 1997
LH/ FSH	Liu et al., 1997; Illeta et al., 1997
Růstové faktory	Takagi et al. 1991, Lonergan et al, 1996
Antioxidanty	Ali et al, 2006; Blondin et al., 1997; Attaran, 2000
Kyselina hyaluronová	Marei et al., 2012; Yokoo et al.; 2007

Tabulka 4.: Vlivy, které ovlivňují zrání bovinních oocyту (Hunter, 2000).

Vývojová kompetence je získána během folikulogeneze a oogeneze konkrétně během období zrání. Kvalita oocytů ovlivňuje časný embryonální vývoj, udržení březosti, vývoj plodu, a dokonce i nemoci v dospělosti (Krisher, 2004).

#### **4.6.1 Folikulární tekutina**

Folikulární tekutina (FF) poskytuje velmi důležité mikroprostředí pro vývoj oocytů. FF je produkt krevní plazmy, která překročí folikulární bariéry v krvi, sekreční aktivitu granulóznic a theca buněk (Fortune, 1994). FF se získá aspirací spolu s oocytem při metodě OPU (Leroy et al., 2004).

FF je složena částečně ze sekretů z folikulu a exsudátů z plazmy. Její složení odráží změny v sekrečních procesech granulózní vrstvy, theca interna a změny v součástech plazmy způsobené fyziologickými nebo patologickými procesy. Přítomnost FF svědčí o jeho potenciálním významu ve fyziologii vaječníků včetně steroidogeneze, růstu folikulu, ovulace, zrání oocytů a jejich transportu do vejcovodů (Fortune, 1994).

Ve folikulární tekutině se nachází různé druhy aminokyselin, především však kyselina asparagová, threonin, kyselina glutamová, glutamin, glycin, alanin a methionin. Jsou zde v koncentracích podobných plazmě (Gwatkin et al., 1980). FF obsahuje velké množství enzymů jako jsou proteázy, peptidázy a hydrolázy, jejichž koncentrace se může měnit v průběhu zrání folikulu (Astwood and Greep, 1973).

FF slouží jako přenašeč, při kterém je oocyt transportován do vajíčka v době ovulace (Gordon, 2003), k regulaci funkce granulóznic buněk, zahájení růstu folikulů a steroidogeneze, zrání oocytů, ovulaci, transportu oocytu a přípravu folikulů pro tvorbu žlutých tělísek (CL). Stimulační a inhibiční faktory v tekutině regulují cyklus folikulů a objem tekutiny uvolněné při ovulaci. Přitom je velice důležitá společně se sekrety vajíčka v prostředí, kapacitou a časným embryonálním vývojem (Hafez and Hafez.,2000).

Je známo, že tekutina obsahuje mnoho místních látek, které ovlivňují vývoj folikulu a mají dopad i na účinky gonadotropinů (Gordon, 2003).

#### **4.6.2 Kompaktnost granulóznic buněk**

Hlavní populace buněk ve folikulární dutině jsou epiteliální granulózní buňky (Amsterdam et al., 1975). Kromě toho jsou některé granulózní buňky fyzicky spojené

s folikulovou stěnou, jiné s oocytem, některé s jinými granulózními buňkami a další s antralovou tekutinou.

Granulozní buňky, které obklopují oocyty jsou známé jako *cumulus oophorus*. Nejvnitřnější vrstva buněk v kumulu, *corona radiata*, posílá cytoplazmatické procesy přes ZP, aby mohla navázat kontakt s *oolemmou* (Björkman, 1962; Odor, 1960; Sotelo and Portex, 1959; Zamboni, 1974).

Když se granulozní buňky kultivují v přítomnosti oocytů nebo prostředí kultivačního média, chovají se jako kumulativní buňky (Canipari et al., 1995; Eppig et al., 1997).

*Hodnocení vrstev granulózních buněk:*

Stupeň I: Oocyty mající kompaktní COC s více než 4–5 vrstvy kompletních kruhovitých buněk a s homogenní granulární šedou cytoplazmou (Sisodiya, 2008).

Stupeň II: Oocyty, které nemají mnoho komplexů COC s 2–3 vrstvy kumulujících buněk obklopujících zóna pellucida a rovnoměrně zrnité ooplasmu (Sisodiya, 2008).

Stupeň III: Oocyty s 1–2 vrstvou kumulujících buněk, která může být přerušena na několika místech a částečně vyloučena nepravidelnou tmavou ooplasmu (Sisodiya, 2008).

Stupeň IV: Oocyty bez kumulovaných buněk a nepravidelné tmavé ooplasmu a oocyty s mnohem rozšířenými a rozptýlenými kumulujícími buňkami (Sisodiya, 2008).

Po klasifikaci oocytů se používají oocyty kvality I. a II. třídy pro IVM (Sisodiya, 2008).

#### **4.6.3 Steroidy**

U většiny savčích oocytů se podávají do in vitro kultury steroidy a růstové faktory odděleně nebo v kombinaci, mohou stimulovat nebo inhibovat kumulativní expanzi nebo způsobí nukleární a cytoplazmatické zrání. Protože v běžné praxi se tyto doplňky přidávají do kultivačních médií u savců během IVM (Ali et al, 2006).

### *Progesteron (P4)*

Obnova meiózy v oocytech je spuštěna steroidními hormony, konkrétně P4, u některých druhů (Morrison et al., 2000). Obnovení meiózy a její postup do metafázi II. u několika savčích druhů (krávy, ovce a prasata) jsou závislé na steroidech (Moor et al., 1980). Role P4 na vývoji kompetence oocytů skotu byla zkoumána inhibicí P4 produkce kumulujících buněk (Aparicio et al., 2011).

### *Oestradiol (estradiol, estrogen, E2)*

FF savců obsahuje steroidní hormony. V době růstu hladiny LH, preovulační folikuly mají vysokou koncentraci estradiolu (hovězí: přibližně 1 ug / ml) (Dieleman et al., 1983).

Nicméně, 6 hodin po dosažení vrcholné hladiny LH dochází k prudkému poklesu estradiolu, který se shoduje s GVBD. Ačkoli většina in vivo metodě je účinek estradiolu dobře identifikován, ale role estradiolu během IVM je i nadále rozporuplná (Beker Van Woudenberg, 2004).

U hovězího dobytka byl v některých studiích estradiol popsán během IVM, jako hormon ke zvýšení míry zrání (Fukui et al., 1982; Younis et al., 1989). Fukushima and Fukui (1985) uvedli, že přidáním FSH, LH a estradiolu do média zlepšilo oplození bovinních oocytů.

Když byly oocyty kultivovány za přítomnosti nízkých koncentrací estradiolu (10-100 ng / ml) došlo ke snížení vývoje do moruly a blastocysty. Nicméně, když byl estradiol přítomen ve vysokých koncentracích (1000 ng / ml) vývojový potenciál zralých bovinních oocytů na morulu a blastocystu byl zlepšen (Ali and Sirard, 2002).

Naopak přítomnost vysokých koncentrací (> 10 µg / ml) estradiolu během IVM mělo negativní vliv na tvorbu vřetének a vytlačování polárního tělíska (Kruip et al., 1988).

Co se týče vývojových kompetencí oocytů, tak estradiol během IVM neměl žádný vliv na procentuální podíl odštěpených 4–8 buněčných embryí (Younis et al., 1989). Naopak Gliedt et al. (1996) uvádějí negativní účinek estradiolu na kumulativní expanzi bovinních oocytů a snížení rychlosti tvorby blastocysty po in vitro oplodnění.

Rozdíl mezi hlášenými účinky estradiolu na in vitro zrání, kromě rozdílu mezi druhy, je daný především tím, že ve většině z těchto studií bylo kultivační

médium doplněné buď o fetální telecí sérum (FCS), bovinní sérový albumin (BSA) nebo sérum říjících se krav. Tyto sloučeniny obsahují gonadotropiny, růstové faktory, steroidy a peptidy (Keskintepe and Brackett, 1996; Wang et al., 1997), které by mohly ovlivnit účinek přidání estradiolu během IVM. Pro řádné posouzení toho vlivu přidaných složek k médium s oocyty a granulózními buňkami je možné použití jasně definovaného kultivačního média velmi důležité (Beker van Woudenberg, 2004).

Dodatek s rekombinantním lidským FSH (RFSH) a 17 p – estradiolu během IVM bovinních oocytů má pozitivní účinkem na zvýšení počtu embryí po IVF (Ali et al, 2006).

#### **4.6.4 Androgen**

Silva and Knight (2000) studovali účinky androgenů, progesteronu a jejich antagonistů na vývojové způsobilosti in vitro zralých bovinních oocytů. Výsledky této studie ukazují, že přidáním androgenu (testosteronu a dihydrotestosteronu) do maturačního média může stimulovat dozrávání oocytů skotu in vitro, jež se odráží následným zvýšením rychlosti štěpení po IVF (Silva and Knight, 2000).

#### **4.6.5 Velikost folikulu**

Mnoho studií v posledních letech s vaječníky z jatek ukázaly jasný vztah mezi velikostmi folikulu a oocytu, oocytů získané z folikulů > 6 mm v průměru dokazují lepší vývojovou kompetenci než menší folikuly (Lonergan et al., 1994).

Ukázalo se, že velké folikuly (průměr 10 mm) obsahují oocytů s vyšším potenciálem a staly se embryi (Pavlok et al., 1993; Lonergan et al., 1994). Některé studie popisují COCs izolovaných z vaječníků nesoucí folikuly o průměru 2 až 5 mm. Ty vykazovaly nižší rychlosti dozrávání a tvorbu blastocyst než u vaječníků nesoucí folikuly o průměru > 10 mm (Gandolfi et al., 1997; Kubota and Yang, 1998).

#### **4.6.6 Gonadotropiny**

Další aditiva, která ukázala přínos přidáním do maturačního média jsou gonadotropiny (LH a FSH). IVM lze také úspěšně provést bez přidání gonadotropinů do média (Rose-Hellekant et al., 1998), nicméně, mnoho médií používaných v IVM dnes zahrnuje gonadotropiny jako případný zdroj pro vývoj oocytů. U oocytů zralých

v přítomnosti gonadotropinů *in vitro* se zdá, že jejich produkce je vyšší než bez přidání gonadotropinů (Rodriguez and Farin, 2003).

V současnosti se používá luteinizační hormon (LH) nebo folikuly stimulující hormon (FSH), či kombinace obou hormonů (Bevers et al., 1997; Hunter et al., 1972).

Koncentrace gonadotropinů, která se používá u skotu je v rozmezí u FSH (0,05 až 20 pg / ml) a LH (0,5 až 100 pg / ml) (Brackett et al., 1989; Harper and Brackett, 1993; Ju et al., 1999; Keefer et al., 1993; Gliedt et al., 1996; Romero-Arredondo and Seidel, 1996).

### *FSH*

Klíčová role FSH při akvizici oocytové vývojové kompetence v IVM je zavedená od roku 2006. FSH se z velké části používá při mnoha *in vitro* maturačních protokolech, protože se ukázalo, že to zlepšuje oplození, časný embryonální vývoj (Izadyar et al., 1998) a kumulativní expanzi (Calder et al., 2003).

FSH má příznivý účinek v maturovaném médiu *in vitro*, zvyšuje expanzi kumulujících buněk obklopující oocyt, což v podmínkách zvyšuje kapacitu spermií a proces oplodnění (Eyestone and Boer, 1993).

### *LH*

Existuje mnoho studií, které uvádějí přínosné účinky LH na oocytech. Jak ukazuje zvýšení výtěžku embrya po IVF a v *in vitro* kultuře (Younis et al., 1989; Zuelke and Brackett, 1993; Gliedt et al. 1996; Choi et al., 2001).

## **4.6.7 Růstové faktory**

Účinek růstových faktorů na zrání oocytů *in vitro* byl vyzkoušen u skotu několika výzkumníky. Lonergan et al. (1996) prokázali, že přítomnost epidermálního růstového faktoru (EGF) během IVM stimulovala kumulativní expanzi a významně zvýšila podíl oocytů dosažení metafáze II. Na druhou stranu Takagi et al. (1991) použil EGF pro skot IVM bez jakéhokoli zjevného účinku na zrání oocytů.

## **4.6.8 Ostatní**

### *Médium*

Viz podkapitola 4.4.



### *Kyselina hyaluronová*

Kyselina hyaluronová je hlavní složkou COC a je syntetizována a sekretována granulózními buňkami pod vlivem LH a FSH (Eppig, 1982). Nedostatečná interakce hyaluronanu a jeho receptoru CD44 během in vitro zrání může snížit kapacitu oplození a vývoj zralých oocytů in vitro (Yokoo et al., 2007).

Marei et al., (2012) zjistili, že hyaluronová kyselina je důležitou složkou extracelulárního matrixu, hraje důležitou roli nejen v rozšiřování kumulativní expanze, ale také dozrávání oocytů a v dalším vývoji embryí.

Další pozorování u skotu naznačují možnost zařazení kyseliny hyaluronové (HA) s estradiolem v kultivačním médiu. To zvyšuje účinnost in vitro produkce blastocystů IVM (Ali et al., 2006).

### *Somatotropní hormon (GH)*

Velice pozitivní účinek má vliv GH na dozrávání oocytů. Kromě toho je známo, že GH zlepšuje intrafolikulární metabolické děje potřebné pro zrání oocytů. Přidání GH během IVM bylo zjištěno zrychlení jaderného zrání a podpoření dalšího rýhování a embryonálního vývoje (Ali et al., 2006).

### *Antioxidanty*

Antioxidanty mohou být prospěšné přísady do syntetického kultivačního media. Na ochranu oocytů z oxidačního stresu při in vitro podmínkách mohou být přidány do kultivačního média (Ali et al., 2006).

Některé studie překvapivě našly pozitivní vztah mezi hladinami FF reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS) a parametry zrání. Bylo zjištěno, že ROS zlepšuje vývojový potenciál hovězího oocytu během zrání in vitro (Blondin et al., 1997) a Attaran (2000) uvádí, že samice, které zabřezly, měly významně vyšší hladiny ROS ve FF než nebřezí samice.

Je pravděpodobné, že optimální rovnováha mezi kyslíkem dostupným pro oocyty a antioxidanty je rozhodující pro umožnění tvorby dělicích vřetének a správnému vyrovnání chromozomů (Hu et al., 2001).

## 5 Závěr

Oocyty odebírají z mrtvého či živého zvířete. Metoda transvaginální ultrazvukové aspirace, kdy jsou folikuly propíchnuty jehlou a oocyty společně s folikulární tekutinou jsou nasáty do sběrného nádoby. Metoda post portem tedy z jatečného zvířete, do laboratoře dovezeny pouze celé vaječníky. V laboratoři jsou oocyty z vaječníků získávány ze všech viditelných folikulů.

Při laboratorním hodnocení je důležité vybrat oocyty, které splňují určitá kritéria. Kvalitu oocytů lze určit hodnocením charakteristik struktury kumulo – oocytárního komplexu, cytoplazmy oocytu, zóna pellucida, polárního tělíska, perivitelinového prostoru a dělicím vřeténkem. Vybírají se pouze kvalitní oocyty.

Kumulo – oocytárního komplex by měl vypadat homogenní s objevující se ooplasmou a kompaktními buňkami těsně přiléhající k zóna pellucida. Kumulo-oocytární komplex kategorie A a B jsou vyhovující. Cytoplazma oocytů je granulovaná a oblast shluku organel je zbarvená. V zásadě nesmí být černá, protože naznačuje stárnutí a nízkou hladinu pro rozvojový potenciál. Zóna pellucida musí mít správnou strukturu, tloušťku a tuhost. Jakékoliv změny v zóna pellucida mohou ovlivnit oocytovou kompetenci a vlastnosti oocytů. Mezi další kritéria se hodnotí polární tělísko, dělicí vřeténko, kde je důležitá poloha, velikost a tvar.

Při kultivaci oocytů je důležité napodobit fyziologické podmínky zvířete, správná teplota, která by měla být 38,5 °C; pH mezi 7,3-7,4; plynné prostředí, kdy CO<sub>2</sub> koncentraci 5 % a 95 % vzdušné vlhkosti; osmolarita je obvykle pohybuje mezi 270 a 285 mos/mol; pufrační systém je závislý na médiu, které je vystavené vzduchu nebo atmosféře obohacené o CO<sub>2</sub> a další. Bez těchto podmínek by nebylo možné kultivovat oocyty.

Kultivace bovinních oocytů probíhá po dobu 24 hodin při teplotě 38,5 °C při koncentraci 5 % oxidu uhličitého a 95 % vzdušné atmosféře

Proto je důležité vybrat vhodné kultivační médium, které zajistí veškeré podmínky pro správný vývoj oocytu. Je vhodné doplnit kultivační média séry, hormony či antioxiandy, které zvýší míru zrání.

## 6 Použitá literatura

Ali, A., Benkhalifa, M., Miron, P. 2006. In-vitro maturation of oocytes: biological aspects. *Reproductive BioMedicine Online*. 13 (3). 437-446.

Ali, A., Sirard, M. A. 2002. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote*. 10 (1). 65-71.

Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. E., Lindner, H. R. 1975. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *The Journal of Cell Biology*. 67 (3). 894-900.

Aparicio, I. M., Garcia-Herreros, M., O'shea, L. C., Hensey, C., Lonergan, P., Fair, T. 2011. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction*. 84 (5). 910-921.

Arlotto, T., Schwartz, J. L., First, N. L., Leibfried Rutledge, M. L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45 (5). 943-956.

Arora, M. 2003. *Cell Culture Media: A Review*. University of Pittsburgh Medical Center. United States. Materials and Methods. 13.

Astwood, E. B., Greep, R. 1973. *Handbook of Physiology Section 7 Endocrinology Volume II Female Reproductive System, Part 2*. American Physiological Society. Washington DC. p. 658. ISBN: 9780195206753.

Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J. M., Miller, K. F., Agarwal, A., Sharma, R. K. 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*. 45 (5). 314–320.

Beker Van Woudenberg, A. R. C. L. 2004. *Fundamental aspects of bovine oocyte maturation: the role of estradiol, VIP and GHRH*. Dissertation. Utrecht University Repository. Netherlands. 142 s.

Beker, A. R., Colenbrander, B., Bevers, M. M. 2002. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 58 (9).1663-1673.

Bettger, W., Boyce, S., Walthall, B., Ham, R. 1981. Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with epidermal growth factor, insulin, and dexamethasone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78 (9). 5588-5592.

Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Van den Hurk, R., Izadyar, F. 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*. 47 (1). 13-22.

Björkman, N. 1962. A study of the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary. *Acta Anatomica* 51 (1-2). 125-147.

Blanco, M. R., Simonetti, L., Palermo, P. (2000). Morphological survival and in vitro maturation of immature bovine oocytes exposed to EGTA with or without cryopreservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 36 (3).

Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M. A. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *Journal of Andrology*. 18 (4). 454–460.

Blondin, P., Sirard, M. A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 41 (1). 54-62.

Boni, R. 2012. Ovum pick-up in cattle: A 25 year retrospective analysis. *Animal Reproduction*. 9 (3) 362–369.

Boni, R., Cuomo, A., Tosti, E. 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*. 66 (3). 836-842.

Borini, A., Lagalla, C., Cattoli, M., Sereni, E., Sciajno, R., Flamigni, C., Coticchio, G. 2005. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reproductive BioMedicine Online*. 10 (5). 653–668.

Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., McClure, D., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G., Wolfe, R., Wu, R. 1979. The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods in Enzymology*. 58. 94-109.

Brackett, B. G., Younis, A. I., Fayrer-Hosken, R. A. 1989. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*. 52 (2). 319-324.

Brevini-Gandolfi, T. A. L., Gandolfi, F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*. 55 (6). 1255–1276.

Calder, M. D., Caveney, A. N., Smith, L. C., Watson, A. J. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reproductive biology and endocrinology*. 1. 14.

Canipari, R., Epifano, O., Siracusa, G., Salustri, A. 1995. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Development Biology*. 167 (1). 371-378.

Carter, J. A., Bellow, S., Meintjes, M., Perez, O., Ferguson, E., Godke, R. A. 2002. Transvaginal ultrasound-guided oocyte aspiration for production of embryos in vitro. *Archiv fur Tierzucht*. 45 (1). 99–108.

Clark, K. E., Squires, E. L., McKinnon, A. O., Seidel, G. E. Jr. 1987. Viability of stored equine embryos. *Journal of Animal Science*. 65 (2). 534-542.

Cooke, S., Tyler, J. P., Driscoll, G. L. 2003. Meiotic spindle location and identification and its effect on embryonic cleavage plane and early development. *Human Reproduction*. 18 (11). 2397-2405.

Cooper, G., M. 2000. *The cell: Molecular approach*. 2nd eds. Sunderland. Boston University.p. 686. ISBN: 10087893106-6.

Coskun, S., Sanbuissho, A., Lin, Y. C., Rikihisa, Y. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*. 36 (3). 485-494.

De Wit, A. A., Kruij, T. A. 2001. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*. 65 (1-2). 51-65.

De Wit, A. A., Wurth, Y. A., Kruij, T. A. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*. 78 (5). 1277-1283.

Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Poortman, J., Van Tol, H. T. 1983. Steroid and pituitary hormone concentrations in the fluid of preovulatory bovine follicles relative to the peak of LH in the peripheral blood. *Journal of Reproduction and Fertility*. 69 (2). 641-649.

Dietl, J. A., Rauth, G. 1989. Molecular aspects of mammalian fertilization. *Human Reproduction*. 4 (8). 869-875.

Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, C., Yaman, C., Pfleger, U., Tews, G. 2002. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Human Reproduction*. 17 (9). 2415–2418.

Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Feichtinger, O., Tews, G. 2000. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 15 (2). 427-430.

Edson, M. A., Nagaraja, K. A., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6). 624-712.

Edwards, J. L., Hansen, P. J. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biology of Reproduction*. 55 (2). 341–346.

Elder, K., Dale, B. 2000. *In Vitro Fertilization*. 2nd ed. Cambridge. Cambridge University Press. Fertility and Sterility. ISBN: 9780511545146.

Eppig, J. J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Developmental Biology*. 89 (1). 268–272.

Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F., Hirao, Y. 1997. Murin oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. 59 (4). 1445-1453.

Eyestone, W. H., Boer, H. A. 1993. FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology*. 39 (1). 216.

Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*. 42 (4). 437-442.

Farin, P. W., Farin, C. E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of Reproduction*. 52 (3). 676–682.

Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50 (2). 225-232.

Frandsen, R. D., Wilke, W. L., Fails, A. D. 2009. *Anatomy and physiology of farm animals*. 7th eds. Wiley-Blackwell. p. 520. ISBN: 9780813813943.

Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 26 (1). 40-46.

Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y., Ono, H. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*. 18 (2). 161-175.

Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R. W., Pugh, P. A., Tervit, H. R. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 92 (1).125-131.

Fukushima, M., Fukui, Y. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in-vitro. *Animal Reproduction Science*. 9 (4). 323-332.

Gandolfi, F., Luciano, A.M., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, P., Armstrong, D.T., Lauria, A. 1997. The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology*. 48 (7). 1153-1160.

Gardner, D. K. 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biology International*. 18 (12). 1163–1179.

Gilchrist, R. B., Thompson, J. G. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 67 (1). 6-15.

Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F. Jr., Rorie, R. W., Munyon, A. L., Pierson, J. N., Miller, G. F., Rakes, J. M. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *Journal of Dairy Science*. 79 (4). 536-542.

Goovaerts, I. G. F., Leroy, J. L. M. R., Jorssen, E. P. A., Bols, P. E. J. 2010. Review: Noninvasive bovine oocyte quality assessment. *Theriogenology*. 74 (9). 1509-1520.

Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd ed. CABI Publishing. Wallingford. p. 548. ISBN: 9780851998480.

Green, D. P. L. 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction*. 2 (3). 147–156.

Gwatkin, R. B. L., Motta, P. M., Hafez, E. S. E. 1980. *Biology of the ovary*. Springer. Netherlands. p. 344. ISBN: 9789024723164.

Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*, 7th ed. Wiley. Philadelphia. p. 509. ISBN: 9780683305777.

Harper, K. M., Brackett, B. G. 1993. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biology of Reproduction*. 48 (2). 409-416.

Hashimoto, S. 2009. Application of In Vitro Maturation to Assisted Reproductive. *Journal of Reproduction and Development*. 55 (1). 1-10.

Hawk, H. W., Wall, R. J. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41. 1571-1583.

Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Stubbings, R. B., Walton, J. S. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 43 (2). 509-522.

Hensleigh, H.C., Hunter, A. G. 1985. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *Journal of Dairy Sciences*. 68 (6). 1456-1462.



Hinrichs, K., 2010. Application of Assisted Reproductive Technologies (ART) to Clinical Practice. Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences. Texas A&M University. 56. 195-206.

Hornsby, P., Sturek, M., Harris, S., Simonian, M. 1983. Serum and growth factor requirements for proliferation of human adrenocortical cells in culture: comparison with bovine adrenocortical cells. *In Vitro*. 19 (11). 863-869.

Hreinsson, J., Rosenlund, B., Friden, B., Levkov, L., Ek, I., Suikkari, A. M., Hovatta, O., Fridström, M. 2003. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Human Reproduction*. 18 (10). 2131–2136.

Hruban, V., Majzlík, I. 2000. *Obecná genetika*. Česká zemědělská univerzita. Praha. 316 s. ISBN: 9788021306004.

Hu, Y., Betzendahl, I., Cortvrindt, R., Smitz, J., Eichenlaub-Ritter, U. 2001. Effects of low O<sub>2</sub> and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Human Reproduction*. 16 (4). 737–748.

Hunter, A. G., Moor. R. M. 1987. Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Journal of Dairy Science*. 70 (8). 1646-1651.

Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 5 (2). 122-130.

Hunter, R. H. F., Lawson, R.A.S., Rowson, L.E.A. 1972. Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *Journal of Reproduction Fertility*. 30 (2). 325-328.

Cha, K. Y., Han, S. Y., Chung, H. M., Choi, D. H., Lim, J. M., Lee, W. S., Ko, J. J., Yoon, T. K. 2000. Pregnancies and deliveries after in-vitro maturation culture followed by in-vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 73 (5). 978-983.

Choi, Y. H., Carnevale, E. M., Seidel, G. E. Jr., Squire, E. L. 2001. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*. 56 (4). 661–670.

Izadyar, F., Zeinstra, E., Bevers, M. M. 1998. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Molecular of Reproduction Development*. 51 (3). 339–345.

Jeon, K. W. (eds). 2008. International review of cell and molecular biology. Academic. London. p.384. ISBN: 9780080922058.

Ju, J. C., Parks, J. E., Yang, X. 1999. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Molecular Reproduction and Development*. 53 (3). 336-340.

Keefer, C. L., Stice, S. L., Dobrinsky, J. 1993. Effect of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during bovine in vitro maturation on development following in vitro fertilization and nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*. 36 (4). 469-474.

Keskintepe, L., Brackett, B. G. 1996. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction*. 55 (2). 333-339.

Kort, J., Behr, B. 2017. Biomechanics and developmental potential of oocytes and embryos. *Fertility and Sterility*. 108 (5). 738-741.

Kragh-Hansen, U. 1981. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 33 (1). 17-53.

Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 82 (Suppl. E). E14–E23.

Kruij, T. A., Pieterse, M. C., Van Beneden, T. H., Vos, P. L., Wurth, Y. A., Taverne M. A. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *The Veterinary Record*. 128 (9). 208–210.

Kruij, T. A., van Bebeden, T. H., Dieleman, S. J., Bevers, M. M. 1988. The effect of oestradiol-17beta on nuclear maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 58 (9). 1663-1673.

Kubelka, M., Motlik, J., Fulka. J. J., Prochazka, R., Rimkevnikova, Z., Fulka, J. 1988. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Research*. 19 (4). 423-431.

Kubota, C., Yang, X. 1998. Cytoplasmic incompetence results in poor development of bovine oocytes derived from small follicles. *Theriogenology*. 49 (1). 183-183.

Lane, B., Miller, S. 1976. Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. I. Effects of serum on establishment in culture. *In Vitro*. 12 (2). 147-154.

Lasiene, K., Vitkus, A., Valanciute, A. 2009. Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina*. 45 (7). 509-515.

Leibfried, L., First, N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of animal science*. 48 (1). 76-86.

Leibfried. L., First, N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*. 48 (1). 76-86.

Leroy, J. L., Vanholder, T., Delanghe, J. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P. E., Dewulf, J., de Kruif, A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 62 (6). 1131-1143.

Levesque, J. T., Sirard, M. A. 1996. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 55 (6). 1427-1436.

Ligtvoet, C. M., Bom N., Gussenhoven W. J. (eds.). 1989. *Technical Principles of Ultrasound*. Springer. Dordrecht. p. 1-9. ISBN: 9789401712491.

Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, O. 1996. Role of epidermal growth factors in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction* 54 (6). 1420-1429.

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, L. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 37 (1). 48-53.

Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M. P. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 41 (5). 427-437.

Macías-García, B., Macedo, S., Rocha, A., González-Fernández, L. 2017. Fetal bovine serum is associated with polar body degeneration after in vitro maturation of bovine oocytes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 68 (3). 279-284.

Marei, W. F., Ghafari, F., Fouladi-Nashta, A. A. 2012. Research article: Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 78 (3). 670-677.

Marvan, F., Hampl, A. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN: 9788021321885.

Masopust, J., Chromý, V. 2003. *Patobiochemie buňky*. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta. Praha. 344 s. ISBN: 9788023910117.

Mayes, M. A., Sirard, M. A. 2001. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*. 55 (4). 911-922.

Mermillod, P., Wils, C., Massip, A., Dessy, F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts in vitro from individual slaughtered cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 96 (2). 717-723.

Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L., Dieleman, S. J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59 (2). 651-674.

Mikkelsen, A. L., Lindenberg, S. 2001. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in-vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction*. 122 (4). 587-592.

Moor, R. M., Polge, C., Willadsen, S. M. 1980. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 56. 319-335.

Morrison, T., Waggoner, L., Whitworth-Langley, L., Stith, B. J. 2000. Nongenomic action of progesterone: activation of *Xenopus* oocyte phospholipase C

through a plasma membrane-associated tyrosine kinase. *Endocrinology*. 141 (6). 2145-2152.

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 (2). 323-328.

Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25 (1). 87-96.

Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*. 14 (1). 53-61.

Nakano, K., Nishio, M., Kobayashi, N., Hiradate, Y., Hoshino, Y., Sato, E., Tanemura, K. 2015. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote*. 24 (2). 172-180.

Neglia, G., Gasparrini, B., Caracciolo di Brienza, V., Di Palo, R., Campanile, G., Giorgio Antonio, P., Zicarelli, L. 2003. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59 (5). 1123-1130.

Nikmard, F., Hosseini, E., Bakhtiyari, M., Ashrafi, M., Aflatoonian, R., Amidi, F. 2017. Effects of melatonin on oocyte maturation in PCOS mouse model. *Animal Science Journal*. 88 (4). 586-592.

Ocaña Quero, J. M., Moreno Millán, M., Valera Córdoba, M., Rodero Franganillo, A. 1994. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*. 41 (2). 405-411.

Odor, L. D. 1960. Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 7. 567-574.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., Suzuki, T. 1997. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*. 48 (5). 769-777.

Otová, B., Mihalová, R. 2012. *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum. Praha. 227 s. ISBN: 9788024621098.

Paulini, F., Silva, R. C., Rôlo J. L., Lucci, C. M. 2014. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*. 7.102.

Pavlok, A., Kopecny, V., Lucas-Hahn, A., Niemann, G. 1993. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8 - cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 35 (3). 233-243.

Pawshe, C. H., Palanisamy, A., Taneja, M., Jain, S. K., Totey, S. M. 1996. Comparison of various maturation treatments on in vitro maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology*. 46 (6). 971-982.

Pieterse, M. C., Kappen, K. A., Kruip, Th. A. M., Taverne, M. A. M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30 (4). 751-762.

Pincus, G., Enzmann, E. V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: i. the activation of ovarian eggs. *The Journal of Experimental Medicine*. 62 (5). 665-675.

Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology*. 7 (40). 1-13.

Rodriguez, K.F., Farin, C. E. 2003. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction Fertility and Development*. 16 (1-2). 55-67.

Romero-Arredondo, A., Seidel, G. E. Jr. 1996. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biology of Reproduction*. 55 (5). 1012-1016.

Rose-Hellekant, T.A., Libersky-Williamson, E. A., Bavister, B. D. 1998. Energy substrates and amino acids provided during in vitro maturation of bovine oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote*. 6 (4). 285-294.

Roth, Z., Hansen, P. J. 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*. 129 (2). 235-244.

Sadler, T. W., Langman, J. 2004. Langman's medical embryology. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. p. 534. ISBN: 9780781743105.

Shahid, B., Jalali, S., Khan, M. I., Shami, S. A. 2014. Different methods of oocytes recovery for in vitro maturation in Nili Ravi Buffalo'S oocytes. APCBEE Procedia. 8. 359-363.

Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S., Hanada, A. 1988. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology. 30 (3). 489–496.

Shirazi, A., Ardali, M. A., Ahmadi, E., Nazari, H., Mamuee, M., Heidari, B. 2012. The Effect of Macromolecule Source and Type of Media During in vitro Maturation of Sheep Oocytes on Subsequent Embryo Development. Journal of reproduction and infertility. 13 (1). 13-19.

Schmerler, S., Wessel, G. M. 2011. Polar bodies-more a lack of understanding than a lack of respect. Molecular Reproduction and Development. 78 (1). 3-8.

Silva, C. P., Kommineni, K., Oldenbourg, R., Keefe, D. L. 1999. The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase 2 meiotic spindle in mammalian oocytes. Fertility and Sterility. 71 (4). 719-721.

Silva, C., Knight, P.G. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. 119 (2). 261-269.

Silva, J. R. V., Figueiredo, J. R., Van den Hurk, R. 2009. Review: Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. Theriogenology. 71 (8). 1193-1208.

Sirard, M. A., Bilodeau, S. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. 89 (2). 459-465.

Sirard, M. A., Coenen, K. 2006. In vitro maturation and embryo production in cattle. Methods in molecular biology. 348. 35-42.

Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L., First, N. L. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biology of Reproduction. 40 (6). 1257-1263.

Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 65 (1). 126–136.

Sisodiya, R. K. 2008. Maturation Potential of Oocytes Obtained by Ultrasound Guided Ovum Pick up Technique from Cows. thesis. Jawaharlal Nehru Krishi Vishwa Vidyalaya. Jabalpur. p. 77.

Smetanina, I. G., Tatarinova, L. V., Krivokharchenko, A. S. 2000. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Ontogenez*. 31 (2). 139-143.

Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Masarykova univerzita. Brno. 874 s. ISBN: 9788021048522.

Sorensen, R. A., Wassarman, P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50 (2). 531-536.

Sosnowski, J., Waroczyk, M., Switonski, M. 2003. Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 60 (3). 571-581.

Sotelo, J. R., Portex, K. R. 1959. An electron microscope study of the rat ovum. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 5 (2). 327-341.

Steeves, T. E., Gardner, D. K. 1999. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development*. 54 (1). 92-101.

Sun, X. F., Wang, W. H., Keefe, D.L. 2004. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. *Zygote*. 12 (1). 65–70.

Suresh, K., Gedam, S., Biswas, R. K., Purkayastha, A., Devi, B., Bharti, P. K., Sdoley, S., Kadirvel, G. 2015. Effect of hormones, follicular fluid, serum and media on in vitro maturation of porcine oocyte. *Indian Journal of Animal Sciences*. 85 (9). 958–961.

Szollosi, D., Calarco, P., Donahue, R. 1972. The nuclear envelope: its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. *The Anatomical Record*. 174 (4). 325–339.

Szybek, K. 1972. In vitro maturation of oocyte from sexually immature mice. *The Journal of Endocrinology*. 54 (3). 527-528.



Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S., Masaki, J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*. 35 (6). 1197-1207.

Tatsuma, Y., Asayama, Y. 2017. Animal-cell Culture Media: History, characteristics and current Issues. *Reproductive Medicine and Biology*. 16 (2) .99–117.

Teresa, A. R., Bavister, B. D. 1992. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 31 (1). 72-77.

Thibault, C., Levasseur, M. C. 2001. Dans La reproduction chez les mammifères et l'homme. Editions Quae. Paris. p. 928. ISBN: 9782729804176.

Thompson, J. G., Gardner, D. K., Pugh, P. A., McMillan, W. H., Tervit, H. R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*. 53 (6). 1385–1391.

Tong, G. Q., Heng, B. C., Chen, N. Q., Yip, W. Y., Ng, S. C. 2004. Effects of elevated temperature in vivo on the maturational and developmental competence of porcine germinal vesicle stage oocytes. *Journal of Animal Science*. 82 (11). 3175–3180.

Topper, E. K., Kruijt, L., Calvete, J., Mann, K., Topfer-Petersen, E., Woelders, H. 1997. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*. 46 (3). 344–350.

Trounson, A., Anderiesz, C., Jones, G. M., Kausche, A., Lolatgis, N., Wood, C. 1998. Oocyte maturation. *Human Reproduction*. 13 (3). 52-62.

Tsafiriri, A., Channing, C. P. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 43 (1). 149-152.

Van de Sandt, J. J., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*. 25 (2). 164-171.

Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H., de Kruif, A. 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*. 38 (5). 905-919.

Voelker, D. R., Frazier, J. L. 1986. Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell line requiring ethanolamine or phosphatidylserine for growth and exhibiting defective phosphatidylserine synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 261 (3). 1002-1008.

Von Seefried, A., Macmorine, H. 1976. The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. *Developments in Biological Standardization*. 37. 83-89.

Wang, Q., Sun, Q. Y. 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*. 19 (1). 1-12.

Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R., Bunch, T. D. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre-and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Animal reproduction science*. *Animal Reproduction Science*. 48 (1). 37-45.

Wang, W. H., Meng, L., Hackett, R. J., Odenbourg, R., Keefe, D. L. 2001. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility*. 75 (2). 348-353.

Wang, Z. G., Yu, S. D., Xu, Z. R. 2007. Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20 (4). 496–500.

Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., Lonergan, P. 2002. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of a co-cubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. 57 (8). 2105-2117.

Warriach, H. M., Chohan, K. R. 2004. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. *Journal of Veterinary Science*. 5 (3). 247-251.

Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (36). 24285-24289.

Wassarman, P. M. 2009. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *BioEssays*. 31 (2). 153–158.

Woodruff, T. K., Shea, L. D., West, E. R. 2007. Engineering the follicle microenvironment. *Seminars in Reproductive Medicine*. 25 (4). 287-299.

Yang, Z., Xiong., H. R. (eds). 2012. Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells. InTech. University of Missouri Libraries. p. 248. ISBN: 9789535107880.

Yokoo, M., Shimizu, T., Kimura, N., Tunjung, W. A., Matsumoto, H., Abe, H., Sasada, H., Rodriguez-Martinez, H., Sato, E. 2007. Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Development*. 53 (2). 263–270.

Young, L. E., Fairbun, H. R. 2000. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*. 53 (2). 627-648.

Younis, A. I., Brackett, B. G., Fayer-Hosken, R. A. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*. 23 (2). 189–201.

Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J. L., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., Peelman, L. J. 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*. 63 (8). 2147-2163.

Zamboni, L. 1974. Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. *Biology of Reproduction*. 10 (2). 125-149.

Zeuner, A., Muller, K., Reguszynski, K., Jewgenow, K. 2003. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology*. 59 (5-6). 1421-1433.

Zhou, H. X., Ma, Y. Z., Liu, Y. L., Chen, Y., Zhou, C. J., Wu, S. N., Shen, J. P., Liang, C. G. 2014. Assessment of mouse germinal vesicle stage oocyte quality by evaluating the cumulus layer, zona pellucida, and perivitelline space. *Public Library of Science One*. 9 (8). e 105812.

Zuelke, K. A., Brackett, B. G. 1993. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*. 48 (4). 815–820.

## 7 Seznam použitých zkratek

BPA	Bisfenol A
BSA	Bovinní sérový albumin
COCs	Kumulo-oocytární komplexy
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
E2	Oestradiol
EGF	Epidermální růstový faktor
ET	Transplantace embryí
FBS	Fetální bovinní sérum
FCS	Fetální telecí sérum
FF	Folikulární tekutina
FSH	Folikulostimulační hormon
GH	Somatotropní hormon
GV	Germinaální vezikul
GVBD	Germinal vesicle breakdown
HA	Kyselina hyaluronová
Ham's F-10	Hamovo kultivační médium F-10
Ham's F-12	Hamovo kultivační médium F-12
HEPES	Organické chemické pufovací činidlo
IVF	In vitro fertilizace
IVM	In vitro maturace
IVP	In vitro produkce
LH	Luteinizační hormon
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MTOC	Mikrotubuly organizující centra
OCM	Oocytové sběrné médium
OPU	Ovum pick up
P4	Progesteron
PBS	Pufrovaný fyziologický roztok
ROS	Reaktivní kyslíkový metabolit
TCM	Tkánové médium pro kultivaci
TUGA	Transvaginální ultrazvuková aspirace
ZP	Zóna pellucida