

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

PRODUKCIA EMBRYÍ IN VITRO

BAKALÁRSKA PRÁCA

2011

Ladislava Legdanová

UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

PRODUKCIA EMBRYÍ IN VITRO

BAKALÁRSKA PRÁCA

Študijný program: Biológia

Školiace pracovisko: Katedra botaniky a genetiky FPV UKF v Nitre

Školiteľ: doc. RNDr. František Strejček, PhD.

Nitra 2011

Ladislava Legdanová



Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre
Fakulta prírodných vied

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Ladislava Legdanová
Študijný program: biológia (Jednoodborové štúdium, bakalársky I. st., denná forma)
Študijný odbor: 4.2.1 biológia
Typ záverečnej práce: Bakalárska práca
Jazyk záverečnej práce: slovenský

Názov: Produkcia embryí in vitro.

Anotácia: V práci sa zameriame na produkciu embryí roznych hospodársky významných živočíšnych druhov v podmienkach in vitro.

Školiteľ: doc. RNDr. František Strejček, PhD.

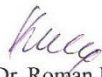
Oponent: Doc. Ing. Ida Petrovičová, PhD.

Katedra: KBG - Katedra botaniky a genetiky

Vedúci katedry: doc. RNDr. Roman Kuna, PhD.

Dátum zadania: 21.10.2009

Dátum schválenia: 05.04.2011


doc. RNDr. Roman Kuna, PhD.
vedúci/a katedry

Prehlásenie

Čestne prehlasujem, že bakalársku prácu som vypracovala sama pod vedením doc.
RNDr. Františka Strejčka, PhD. a s použitím zdrojov, ktoré v plnej miere citujem.
V Snine, 16.4.2011

.....

podpis autora práce

Pod'akovanie

Na tomto mieste chcem srdečne poďakovať môjmu školiteľovi doc. RNDr. Františkovi Strejčekovi, PhD. za odbornú pomoc, ktorú mi poskytol počas vypracovania bakalárskej práce.

ABSTRAKT

LEGDANOVÁ, Ladislava: Produkcia embryí *in vitro*. [Bakalárska práca]. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. Fakulta prírodných vied. Školiteľ: doc. RNDr. František Strejček, PhD. Stupeň odbornej kvalifikácie: Bakalár. Nitra: FPV, 2011. 60 s.

V tejto bakalárskej práci uvádzame prehľad literatúry zahŕňajúcej súčasný stav *in vitro* produkcie embryí (IVP), vymedzenie pojmov ako sú gametogenéza, oplodnenie, jednotlivé vývojové štádiá embryí, ich využitie a genetické mikromanipulácie. IVP je v súčasnosti jednou z najvýznamnejších biotechnológií v chove hospodársky významných živočíšnych druhov s aplikáciou na človeka a liečby infertility. Aj napriek významným pokrokom má táto technológia stále nízku úspešnosť v porovnaní s vývojom *in vivo*. Dôležité je pochopenie molekulárnych mechanizmov prebiehajúcich v procese gametogenézy, vývoj vylepšených kultivačných systémov a technológií. Toto úsilie by malo smerovať k zlepšeniu vývojovej kompetencie a kvality oocytov s cieľom maximalizovať výnosnosť životaschopných embryí.

Kľúčové slová: Gametogenéza. *In vitro* produkcia. Oplodnenie. Embryo. Mikromanipulácie s embryami.

ABSTRACT (v anglickom jazyku)

LEGDANOVÁ, Ladislava: Production of embryos *in vitro*. [Bachelor Thesis]. Constantine the Philosopher University in Nitra. Faculty of Natural Sciences. Supervisor: doc. RNDr. František Strejček, PhD. Degree of Qualification: Bachelor. Nitra : FNS, 2011. 60 p.

In this bachelor work authors present a literature review covering the current situation of *in vitro* embryo production (IVP), definitions such as gametogenesis, fertilization, different developmental stages of embryos, their use and genetic micromanipulation. IVP is currently one of the most important biotechnology in breeding of economically important species, with application to human and infertility treatment. Despite significant progress, this technology has still a low percentage compared with the development *in vivo*. It is important to understand the molecular mechanisms taking place in the process of gametogenesis, development of improved cultivation systems and technologies. These efforts should be directed to improving developmental competence and quality of oocytes to maximize the yield of viable embryos.

Key words: Gametogenesis. *In vitro* production. Fertilization. Embryo. Micromanipulation of embryos.

OBSAH

Zoznam použitých skratiek

Zoznam obrázkov a tabuliek

ÚVOD.....	.11
1 Cieľ práce.....	.12
2 Prehľad literatúry13
2.1 Gametogenéza a oplodnenie.....	.13
2.1.1 Vývoj samičích pohlavných buniek.....	13
2.1.1.1 Folikulogenéza13
2.1.1.2 Oogenéza a preovulačné dozrievanie oocytov16
2.1.2 Vývoj samčích pohlavných buniek.....	.19
2.1.2.1 Spermatogenéza.....	19
2.1.2.2 Morfológia spermie22
2.1.3 Ovuľácia a oplodnenie.....	.24
2.1.3.1 Vývoj prvojadier a charakteristika jednotlivých embryonálnych fáz26
2.2 Produkcia embryí <i>in vitro</i>.....	.28
2.2.1 <i>In vitro</i> maturácia oocytov (IVM).....	28
2.2.2 <i>In vitro</i> oplodnenie (IVF)	32
2.2.2.1 Hodnotenie kvality spermíí a ich uchovávanie	35
2.2.3 <i>In vitro</i> kultivácia embryí (IVC)	39
2.2.3.1 Hodnotenie a klasifikácia embryí.....	39
2.2.3.2 Zmrazovanie embryí a ich prenos	41
2.3 Genetické mikromanipulácie	43
2.3.1 Klonovanie.....	43
2.3.2 Transgénne živočíchy47
Záver53
Zoznam použitej literatúry54

Zoznam použitých skratiek

AMK - aminokyselina

BSA- bovinný serový proteín (bovine serum albumin)

cAMP – cyklický adenzínmonofosfát

COC – kumulus oocytárny komplex

DMSO - dimetylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EC - embryonálne bunky (embryonic cells)

EGF – epidermálny rastový faktor

ESC - embryonálne kmeňové bunky (embryonic stem cells)

ET – embryotransfer

FSH – folikuly stimulujúci hormón

GnRH – uvoľňovacie hormóny gonádotropínov

GV – zárodočný váčok (germinal vesicle)

GVBD - rozpad zárodočného váčika (germinal vesicle breakdown)

HA – kyselina hyalurónová (hyaluronic acid)

hCG – ľudský choriónový gonadotropín

ICSI – intra-cytoplazmatická injekcia spermie

IGF – inzulínu podobný rastový faktor (insulin like growth factor)

IVC – *in vitro* kultivácia (*in vitro* cultivation)

IVF – *in vitro* oplodnenie (*in vitro* fertilization)

IVM – *in vitro* maturácia (*in vitro* maturation)

IVP – produkcia embryí *in vitro* (*in vitro* production)

LH – luteinizačný hormón

MI – metafáza I

MII – metafáza II

MPF – faktor podporujúci dozrievanie (maturation promoting factor)

Pb – pólové teliesko

PBS - fosfátový pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)

PI – profáza I

PMSG - sérový gonadotropín gravidných kobýl

PN - prvojadro

PRIFs – primárne folikuly

PROFs – primordiálne folikuly

PVP – perivitelinový priestor

SCNT - somatický nukleárny transfer (somatic cell nuclear transfer)

SOF – synthetic oviductal fluid – syntetická oviduktálna tekutina

SUZI – subzonálna injekcia spermie

TCM – kultivačné médium pre tkanivové kultúry (tissue culture medium)

ZP – *zona pellucida*

Zoznam obrázkov a tabuliek

Obrázok 1 Folikulogenéza (Williams, Erickson, 2008)

Obrázok 2 Oogenéza (Maulia, 2009)

Obrázok 3 Spermatogenéza (Maulia, 2009)

Obrázok 4 Štrukturálna schéma spermie (<http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap12.html>, 2.3.2011)

Obrázok 5 Znázornenie jednotlivých embryonálnych štádií (myš) (Cheng et al., 2005)

Obrázok 6 Oocyty pred a po kultivácii v médiu NCSU-23 (Weng et al., 2007)

Obrázok 7 Morfológické abnormality ľudských oocytov (Rienzi et al., 2011)

Obrázok 8 Intra-cytoplazmatická injekcia spermie (Hinrichs, Choi, 2005)

Obrázok 9 Živé spermie ošípanej farbené metódou CTC (Oh et al., 2010)

Obrázok 10 HMC kozích oocytov (Akshey et al. 2011)

Obrázok 11 Mikroinjekcia cudzej DNA do samčieho prvojadra králičieho embrya (Fan, Watanabe, 2003)

Obrázok 12 Chimerický klonovaný králik (Chrenek, Makarevič, 2009)

Tabuľka 1 Straty oocytov (%) po narodení u jednotlivých druhov živočíchov (van der Hurk, Zhao, 2005)

Tabuľka 2 Štádiá jadrového dozrievania oocytov hovädzieho dobytku a ich časové rozpätie (Strejček et al., 2007)

Tabuľka 3 Chronológia delenia embryí niektorých druhov zvierat (Chrenek, 2008a)

Tabuľka 4 Efektivita tvorby klonovaných jedincov prenosom jadra somatickej bunky (Chrenek, Makarevič, 2009)

ÚVOD

Obdobie posledných desaťročí je charakteristické rozpracovaním nových biotechnologických postupov, zameraných na riadenie a kontrolu reprodukcie cicavcov. Ich aplikácia umožňuje intenzívnejšie využitie pohlavných buniek a zvyšovanie reprodukčného potenciálu živočíchov. Medzi najdôležitejšie biotechnologické postupy v súčasnosti možno zaradiť produkciu embryí *in vitro*.

V dôsledku zvyšujúceho sa počtu neplodných párov sa zdokonaľovanie metód asistovanej reprodukcie stalo základnou úlohou klinickej reprodukčnej biológie. Metódy asistovanej reprodukcie pomáhajú tisíckam párov, ktoré z dôvodu infertility, či už muža alebo ženy, nemôžu mať vlastných potomkov. Pre výskum a vývoj nových typov hormónov, kultivačných systémov a techník, nemožno zo zrejmých dôvodov použiť človeka a priamo ich na neho aplikovať. Nevyhnutný je teda výskum na zvieracích modeloch. Štúdie a poznávanie mechanizmov dozrievania pohlavných buniek, poznanie ich morfológicko-funkčného stavu, procesu interakcie oocyty so spermiami a vývoja raných embryí zvierat umožňuje úspešne prepracovať metódy či už superovulácie, kultivácie, oplodnenia *in vitro* a mikromanipulácií s embryami. Dokonalé zvládnutie týchto procesov samozrejme neslúži len na liečbu ľudskej neplodnosti.

Kľúčovú úlohu produkcia embryí *in vitro* zohráva aj v produkcii dobytku, vzhľadom na možnosť genetického zlepšenia chovov, využitím samíc vysokej genetickej hodnoty a rozmnožovanie importovaných plemien so špičkovým genofondom. Významná je tvorba embryí pre účely genetických mikromanipulácií, ako tvorba transgénnych zvierat a klonovanie. Využitie transgénnych jedincov v poľnohospodárstve sa orientuje na zlepšenie ich reprodukčných vlastností, kvality mlieka a mäsa, rezistenciu voči chorobám. Dôležitý je aj význam transgénnych jedincov vo farmaceutickom priemysle, kde sa živočíchy ako „bioreaktory“ využívajú na produkciu biologicky aktívnych látok, predovšetkým humánnych liečiv ako laktoferín, hemoglobín, faktory zrážania a iné. V súčasnosti využitie klonovania embryí smerujú k zachovaniu ohrozených či vyhynutých živočíchov.

Rozvoj biologických vied vedie k zlepšeniu vývojovej kompetencie a kvality embryí. Zvyšuje sa efektívnosť a prínos vďaka tisíckam výskumných tímov po celom svete a aj vďaka novým technológiám a prístrojovému vybaveniu moderných laboratórií.

1 Cieľ práce

V bakalárskej práci sme si vytýčili cieľ - získať, preštudovať a zhromaždiť literatúru týkajúcu sa:

- gametogenézy, ovulácie, oplodnenia
- produkcie embryí *in vitro* (*in vitro* maturácia, oplodnenie a kultivácia)
- hodnotenia kvality spermií a získaných embryí
- využitia získaných embryí a ich uchovávanie
- klonovania a produkcie transgénnych zvierat
- ich využitia a významu

2 Prehľad literatúry

2.1 Gametogenéza a oplodnenie

Vlastnému vývoju organizmu predchádza vývoj pohlavných buniek, splynutím ktorých vzniká nový jedinec. Túto fázu vývoja označujeme ako progenéza (proontogenéza) a zahŕňa vývoj pohlavných buniek (gametogenéza) a vlastný proces oplodnenia, t.j. splynutie samčích a samičích pohlavných buniek, po ktorom vzniká zygota – oplodnené vajíčko (Maretta, 2000).

2.1.1 Vývoj samičích pohlavných buniek

Zakladateľ modernej embryológie Karl Ernest von Baer v roku 1827 ako prvý objavil cicavčie vajíčko - oocyt. Vo svojom spise „*De ovi mammalium hominis genesi*“ z roku 1828 opisuje vajíčko a rané vývojové štádia embryí, vrátane blastocysty rôznych cicavcov (Pivko, 1995).

Samičie pohlavné bunky sa vyvíjajú z oogónií, ktoré sa v ranom embryonálnom období nachádzajú v stene žltkového vaku. Odtiaľ migrujú do základu pohlavných žliaz, do genitálnej lišty. Vo svojom vývoji prejdú tromi štádiami, a to obdobím množenia (mitotické delenie buniek), obdobím rastu (zväčšovanie buniek) a obdobím zrenia (meiotické delenie buniek). Výsledkom týchto procesov sú vysokošpecializované samičie pohlavné bunky – vajíčka (oocyty) (Kulíšek et al., 1996).

2.1.1.1 Folikulogenéza

Reprodukcia samíc spočíva nielen v produkcii zárodočných pohlavných buniek (oocytov), ale taktiež poskytuje prostredie pre vývoj zárodka a pri cicavcoch aj výživu pre narodené mláďatá. Reprodukčné orgány samice tvoria párové vaječníky a vajcovody, maternica, pošva, vulva a mliečna žľaza. Vaječníky (lat. *ovarium*, gréc. *oophoron*) majú na povrchu epitelovú vrstvu, pod ňou belavý obal (*tunica albuginea*) a pod touto je kôrová vrstva obsahujúca veľký počet folikulov, v rôznom vývojovom štádiu (Hell et al., 2006). Folikuly sú v kôrovej časti vaječníka rozdelené tak, že na povrchu sa nachádzajú malé (v štádiu pokoja) a v hlbších vrstvách väčšie (dozrievajúce) folikuly. Podľa stupňa vývoja

rozoznávame: primordiálne, primárne, sekundárne a terciárne (Graafove) folikuly (Kováčik et al., 1996).

Folikulárny vývoj zahŕňa rast folikulov, delenie buniek a ich diferenciáciu. Tento proces je pod kontrolou endokrinných faktorov – hlavne gonádotropínov produkovaných adenohipofýzou. Na rast a dozrievanie folikulov má vplyv aj celý rad iných faktorov (napr. inzulínu podobné rastové faktory – IGF, epidermálny rastový faktor - EGF, transformujúci rastový faktor TGF- α resp. β) a hormónov (androgény, estrogény, inzulín a pod.) (Strejček et al., 2007).

Ako sme už uviedli, primordiálne pohlavné bunky môžeme prvýkrát identifikovať v stene žltkového vaku, kde počet týchto premeiotických pohlavných buniek (oogónií) narastá mitotickým delením. Krátko po narodení je určený konečný počet oocytov vstupujúcich do reprodukčného života. Tieto oocyty (primárne oocyty) pozastavujú svoj vývoj v profáze prvého meiotického delenia (PI) až do ovulácie. Začínajú sa obklopovať plochými folikulárnymi bunkami, čím vznikajú primordiálne folikuly (PROFs). Tieto vstupujú buď do rastovej fázy, prípadne podliehajú atrezii (degradácii) (Laurinčík et al., 2005). Van der Hurk a Zhao (2005) uvádzajú, že po degradácii mnohých oocytov počas ich počiatkovej meiotickej činnosti sa počet uzavretých PROFs zníži, napr. u kráv až o 95 %, čo udáva tabuľka 1.

Tabuľka 1 Straty oocytov (%) po narodení u jednotlivých druhov živočíchov (van der Hurk, Zhao, 2005)

druh	max. počet oocytov	počet oocytov po narodení	straty oocytov (%)
hlodavce	50,000-75000	10,000–15,000	80
ovce	900	82	91
prasnice	1,200,000	500	58
kravy	2,700,000	135	95

Postupne začínajú prvé PROFs vstupovať do rastového obdobia, objavujú sa jednovrstvové kubické folikulárne bunky a vznikajú primárne folikuly (PRIFs). PRIFs pozostávajú z centrálne uloženého oocytu I. radu s veľkým, svetlým a excentricky uloženým jadrom a veľkým jadriekom (Strejček et al., 2007).

Van der Hurk a Zhao (2005) tiež udávajú, že GDF-9 (rastový diferenciačný faktor 9), KL (faktor kmeňových buniek), FGF-2 (rastúci faktor fibroblastov-2), LIF (leukemický inhibičný faktor) a NGF (nervový rastový faktor) môžu pozitívne ovplyvniť prechod PROFs do PRIFs. Bolo taktiež dokázané, že EGF podporuje tvorbu PRIFs v *in vitro* experimentoch s hovädzím dobytkom.

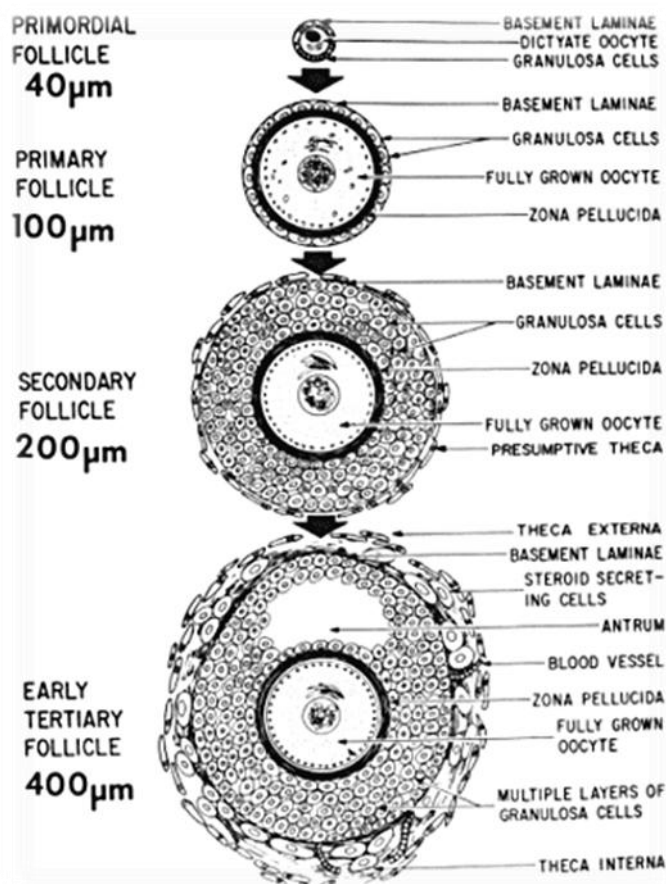
Oocyt zväčšujúci svoj objem vstupuje do štádia sekundárneho (rastúceho) folikulu. Množiace sa folikulárne bunky vytvárajú okolo oocytu epitelový obal *stratum granulosum*, ktorý je od okolitého väziva oddelený bazálnou membránou (*membrana basalis*), nazývanou tiež Slavjanského membrána. Okolité väzivo sa postupne diferencuje do dvoch vrstiev, a to na vnútornú *theca folliculi interna* a vonkajšiu *theca folliculi externa* (Strejček et al., 2007). Objavuje sa *zona pellucida* (ZP), obal pozostávajúci z dvoch vrstiev kyslých a neutrálnych mukopolysacharidov. Spočiatku sa javí ako ostrovček fibrilárneho materiálu medzi cytoplazmatickou membránou a granulóznymi bunkami. Otázka skutočného miesta syntézy ZP nie je doteraz jednoznačne uzavretá (Chrenek, 2008a).

Dominantné preovulačné alebo antrálne terciálne folikuly sú výsledkom procesu dominancie v terciálnej fáze selekcie folikulov vaječníka. Tieto na jednej strane zasahujú do kôry, na druhej strane prominujú na jej povrch (Antal et al., 2005). Toto vyklenuté miesto sa nazýva *stigma ovarii* a napr. u kravy a kobyly dosahuje veľkosť 1 - 1,5 cm. (Strejček et al, 2007).

Charakteristické pre toto štádium je tvorba tekutiny *liquor folliculi*, ktorá je dôležitým zdrojom regulačných a modulačných látok, pochádzajúcich z krvi alebo folikulárnych buniek, napr. gonadotropínov, steroidov, rastových faktorov, enzýmov a lipoproteínov (van der Hurk, Zhao, 2005).

Oocyt v excentrickej polohe vyčnieva do dutiny v podobe vyvýšeného miesta – *cumulus oophorus*. ZP je obklopená z vonkajšej strany jednou vrstvou folikulárnych buniek – *corona radiata* (Pivko, 1995).

Na začiatku vývoja folikulov v cicavčích vaječníkoch je spojenie medzi oocytom a granulóznymi bunkami a medzi granulóznymi bunkami navzájom sprostredkované pomocou *gap junction*. Toto medzibunkové spojenie umožňuje transport malých (menej ako 1 kD) molekúl medzi bunkami a zároveň poskytuje granulóznym bunkám kontrolu nad pokračovaním meiózy. *Gap junction* pozostáva z bielkovín konexínov, pričom u konexínov Cx37 a Cx43 bolo jednoznačne preukázané, že zohrávajú kľúčovú úlohu v procese oogenézy (Kidder, Vanderhyden, 2010).



Obrázok 1 Folikulogenéza (Williams, Erickson, 2008)

2.1.1.2 Oogenéza a preovulačné dozrievanie oocytov

Oogenéza je proces vývoja a rastu pohlavných buniek - gamét vo vaječníku. Pozostáva zo štádia rozmnožovania, rastu a meiózy – zrenia.

V štádiu rozmnožovania vpučia zo zárodočného epitelu do tkaniva vaječníka pásy buniek – gonocyty. Ich mnohonásobným mitotickým delením vznikajú oogónie. Posledná generácia oogónií rastie a mení sa na oocyt I. radu. Štádium rastu pokračuje až v období pohlavnej dospelosti, kedy v jadre oocytu I. radu prebiehajú zmeny totožné so zmenami v profáze I. meiotického delenia (PI) (Chreněk, 2008a).

Aby mohla byť pohlavná bunka po ovulácii oplodnená, musí mať celkový diploidný počet chromozómov zmenšený na polovicu, teda haploidný. Dovtedy sú všetky chromozómy oocytu v postnatálnom období, v pokojovom diktyoténnom štádiu meiózy (Pivko, 1995).

Oocyt nachádzajúci sa v preovulačnom folikule je v štádiu PI. Preovulačným vrcholom LH (LH peak) je zahájené dozrievanie oocytu, ktoré zahŕňa dva procesy: 1. dozrievanie jadra - zo štádia zárodočného vajíčka (GV) do štádia metafázy II (MII) a 2. dozrievanie cytoplazmy – štrukturálne a molekulárne zmeny zabezpečujúce postfertilizačný a embryonálny vývoj jedinca. K najvýznamnejším cytoplazmatickým substanciam z tohto pohľadu patria proteíny faktora podporujúceho dozrievanie oocytov - MPF (Strejček et al., 2007). Ide o komplex tvorený p34^{cdc2} kinázou a cyklínom B. K jeho aktivácii dochádza defosforyláciou p34^{cdc2} na tyrozín a fosforyláciou cyklínu B na treonín. Aktivovaný MPF umožňuje prechod oocytu do MII fázy, dokončenie II. meiotického delenia a zároveň vypudenie druhého pólového telieska (Pb) (Petrovičová, 2010).

Aby mohlo dôjsť k dozretiu oocytov, musí byť diktyoténny meiotický blok prerušený. Dôležitý je účinok gonadotropínov, ktoré uvoľnia oocyt spod vplyvu inhibítorov produkovaných najmä bunkami granulózy. Takýmto primárnym inhibítorom meiotického dozrievania je pravdepodobne cyklický adenosín monofosfát (cAMP). Ak dôjde k prerušeniu komunikácie medzi granulóznymi bunkami a oocytom, preruší sa zásobovanie oocytu cAMP. Po LH vrchole menia folikulárne bunky svoj inhibičný vplyv na podporný, o čom svedčí prítomnosť MAS (meiózu aktivujúceho sterolu) vo folikulárnej tekutine, ktorý indukuje spustenie meiózy (Laurinčík et al., 2005).

Jadrové dozrievanie podľa Pivka (1995) prebieha v nasledujúcich štádiách, s malými rozdielmi medzi jednotlivými druhmi zvierat:

- I. štádium - oocyt obklopený početnými kumulárnymi bunkami s periférne uloženým jadrom, s dobre viditeľnou jadrovou membránou a jemne granulovanou nukleoplazmou. Chromatín v okolí jadierka je v tvare kruhu alebo podkovy.
- II. štádium - jadro oocytu je okrúhle s riedko rozptýlenými kondenzovanými chromozómami, periviteliný priestor (PVP) je úzky, kontakty medzi výbežkami kumulárnych buniek a oocytom sú tesné, typu *gap junction*.
- III. štádium - jadrová membrána dobre viditeľná, stráca sa jadierko (ale zostáva po ňom svetlolomná plocha) a jemná granulácia nukleoplazmy. Konečné dozrievanie sa začína zvlnením jadrovej membrány a kondenzáciou chromozómov. PVP sa zväčšuje a vrcholí rozpad kontaktov medzi výbežkami kumulárnych buniek a oocytom.

IV. štádium - menej zreteľná jadrová membrána, jadierko sa úplne stráca, membrána formuje dlhé štíhle výbežky a začína sa jej viditeľný rozpad. V jadre je zreteľná kondenzácia chromozómov.

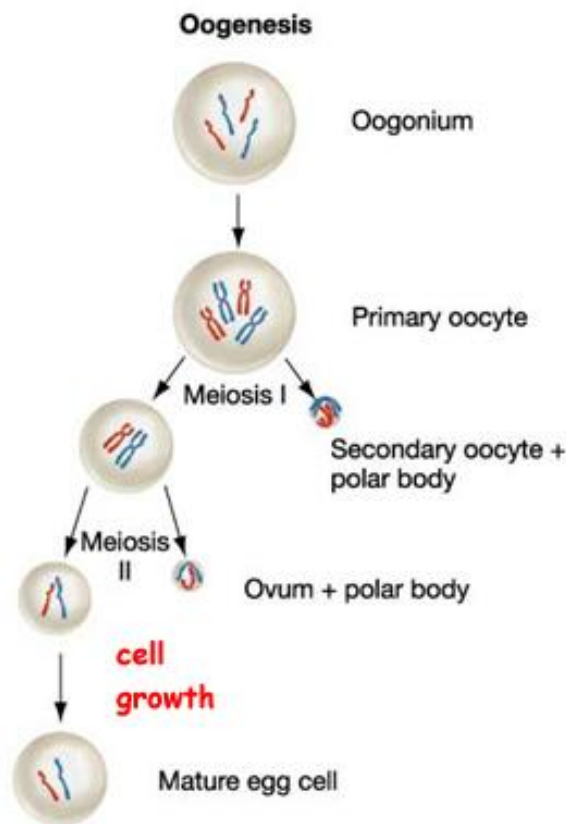
Oocyty, pri ktorých došlo k rozpadu zárodočného vajíčka (GVBD), pokračujú v dozrievaní cez štádium prvého a druhého meiotického delenia. V prvom delení, v metafáze I (MI) nachádzame bivalenty v ekvatoriálnej rovine deliaceho vretienka; v anafáze I (AI) sa chromozómy rozostupujú k pólom deliaceho vretienka, časť sa vylúči do PVP v podobe prvého Pb v telofáze I (TI) a druhá časť sa v metafáze II (MII) pretvára na dyády, ktoré migrujú do kortikálnej zóny oocytu pod oolemu. Týmto sa zaháji druhé meiotické delenie, výsledkom ktorého je vylúčenie druhého Pb do PVP (Laurinčík et al., 2005).

Tabuľka 2 Štádiá jadrového dozrievania oocytov hovädzieho dobytku a ich časové rozpätie (Strejček et al., 2007)

Štádium	čas (h)
Zárodočný vajíček (GV)	0 - 6,6
Rozpad zárodočného vajíčka (GVBD)	6,6 - 8,0
Kondenzácia	8,0 - 10,3
Metafáza I (MI)	10,3 - 15,4
Anafáza I (AI)	15,4 - 16,6
Telofáza I (TI)	16,6 - 18,0
Metafáza II (MII) a pólové teliesko	18,0 - 24,0

Po prvom meiotickom delení teda vznikajú dve nerovnako veľké bunky, jedna so všetkou cytoplazmou a jadrom s kompletnou sadou chromozómov – oocyt II. radu a druhá bunka, označovaná ako prvé Pb. Táto bunka obsahuje jadro s kompletnou sadou chromozómov a nepatrné množstvo cytoplazmy. Počas druhého meiotického delenia sa oocyt rozdelí opäť na dve nerovnako veľké bunky, ale už s polovičným počtom chromozómov (Chrenek, 2008a). V prípade, že nedošlo k degradácii Pb I. radu, toto sa symetricky rozdelí, čím vzniknú dve Pb II. radu. Výsledkom meiózy budú 4 bunky, a to

zrelé vajíčko (*ovum*) a tri Pb II. radu s jednou chromatidou z pôvodného homologického páru chromozómov (Laurinčík et al., 2005).



Obrázok 2 Oogenéza (Maulia, 2009)

2.1.2 Vývoj samčích pohlavných buniek

Samčie pohlavné bunky (j.č. *spermatozoon*, m.č. *spermatozoa*) vznikajú v semenotvorných kanálikoch (*tubuli seminiferi*) procesom, ktorý nazývame spermatogenéza. Spermie objavil v roku 1677 Leeuwenhoekov žiak Ham z Leidenu, ktorý ich považoval za zárodoky parazitujúce v ejakuláte (Lukáč et al., 2007).

Spermia má v procese oplodnenia splniť 3 základné úlohy: aktívne vyhľadať vajíčko, preniknúť do neho a preniesť genetický materiál od otca (Lukáč et al., 2007).

2.1.2.1 Spermatogenéza

Vývoj spermií, ako sme vyššie uviedli prebieha, v semenotvorných kanálikoch, a to nepretržite, čo sa prejavuje tým, že v kanálikoch sa nachádzajú spermiogénne bunky

v rôznom stupni vývoja, a to spermatogónie, spermatocyty, spermatídy a spermie. Všetky tieto typy vyvíjajúcich sa pohlavných buniek majú svoje miesto uloženia v semenotvornom kanáliku. Kým spermatogónie sa nachádzajú uložené na bazálnej membráne, spermatocyty sú uložené nad nimi, bližšie k lúmenu. Spermatídy a dozrievajúce spermie sa nachádzajú v bezprostrednej blízkosti lúmena kanálika (Maretta, 2000).

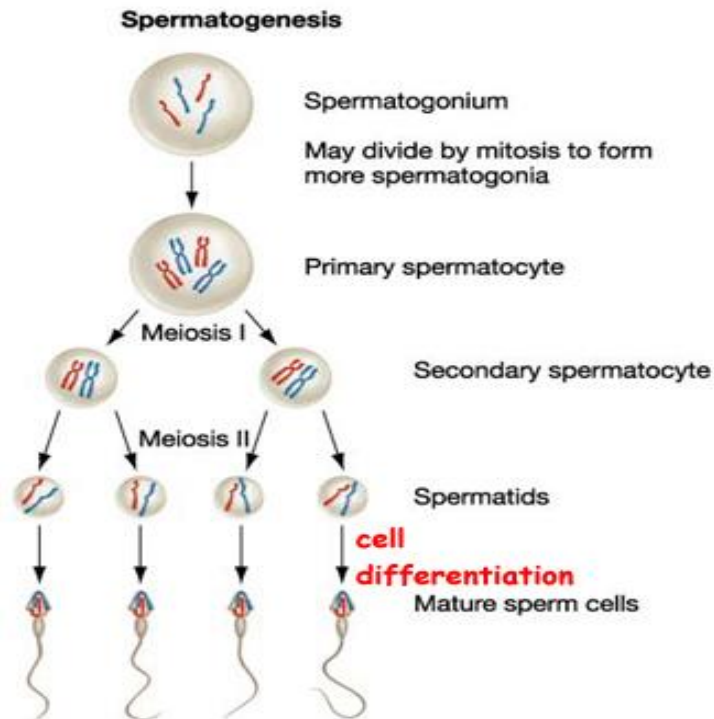
Spermatogenéza je zložitý a dlhý proces, ktorý začína obdobím rozmnožovania, rastu a dozrievania, a ukončuje sa spermiohistogenezou, pri ktorej sa spermie histologicky dotvárajú. Začína v puberte, u býkov už od 7. mesiaca, u žrebcov od 12. a u kancov a baranov od 5. mesiaca života (Miholová, Lipský, 1994).

V procese spermatogenézy sa vyskytujú dva typy delenia buniek, a to mitóza (nové bunky s diploidným počtom chromozómov) a meióza (nové bunky s polovičným, haploidným počtom chromozómov).

Mitóza (fáza množenia) je charakterizovaná opakovaným delením spermatogónií. Ako uvádza Lukáč et al. (2007), u dospelých cicavcov môžeme rozlíšiť tieto typy spermatogónií:

- a) prespermatogónie (A_0 spermatogónie), delením dávajú A_1 spermatogónie alebo A_0 spermatogónie, ktoré však zostávajú ako kmeňové bunky pri bazálnej membráne,
- b) A-spermatogónie, veľké bunky s ovoidným jadrom a homogénnym prachovitým chromatínom, ktoré sa rýchlo mitoticky delia a vznikajú A_1 až A_4 a intermediárne spermatogónie (In spermatogónie),
- c) intermediárne a B-spermatogónie. In spermatogónie sa niekoľkokrát delia a posledným delením vznikajú B-spermatogónie.

Spermatocyty predstavujú produkt druhej etapy spermatogenézy, ktorá pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich zrecích delení (fáza meiózy). Vznikajú spermatocyty I. radu, ktoré vstupujú do PI meiotického delenia, počas ktorej dôjde k párovaniu homológnych chromozómov a medzi ich nesesterskými chromatídami ku *crossing-overu*. Po ukončení I. meiotického delenia vynikajú spermatocyty II. radu, ktoré obsahujú zdvojené autozómy a zdvojený chromozóm X prípadne Y. Tieto dve spermatídy vstupujú do II. meiotického delenia a dávajú vznik štyrom spermatídám s haploidným počtom chromozómov, ktoré sa potom morfológicky diferencujú v zrelé spermie (Strejček et al., 2007).



Obrázok 3 Spermatogenéza (Maulia, 2009)

Spermiohistogenéza je tretím a posledným obdobím vývoja samčích pohlavných buniek pred ich uvoľnením do lúmena semenotvorných kanálikov. Aj keď ide o plynulý proces, môžeme pozorovať podľa Kuliška et al. (1996) a Maretta (2000) niekoľko fáz: Golgiho fáza, fáza akrozómovej čiapky, fáza kaudálnej manžety a fáza zrenia.

- V Golgiho fáze sa vytvára základ pre akrozóm. Golgiho komplex sa zväčšuje, oddeľujú sa z neho malé váčiky, splynutím ktorých vzniká akrozómová vezikula, v ktorej sa vytvorí väčšie akrozómové granulum.
- Fáza akrozómovej čiapky je charakterizovaná priblížením akrozómovej vezikuly k jadru, jej sploštením a preliačením sa po povrchu. V tom istom čase sa vytvára aj základ ďalšej dôležitej štruktúry – bičika, ktorý vyrastá z jedného centriolu uloženého pri cytoplazmatickej membráne, na opačnom konci ako sa vytvára akrozómová čiapka. Vznik oboch štruktúr je sprevádzaný presunom cytoplazmy do oblasti vznikajúceho bičika a uložením jadra do excentrickej polohy.
- Vo fáze kaudálnej manžety sa vytvára dočasná štruktúra pozostávajúca z množstva mikrotubúl v tvare dlhej manžety na zadnom okraji akrozómovej čiapky. Rastie kaudálnym smerom až do prednej časti formujúceho sa bičika

- Pre fázu zrenia je typický zánik kaudálnej manžety a zbavovanie sa prebytočnej cytoplazmy a nepotrebných bunkových organel (Kulišek et al., 1996; Mareta, 2000).

Spermatogenéza u cicavcov si vyžaduje aktivitu peptidov a steroidných hormónov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri normálnej funkcii semenotvorného epitelu. Títo hormonálni poslovia sú dôležití nie len pre reguláciu vývoja samčích zárodočných buniek, ale taktiež pre proliferáciu a funkciu somatických buniek, potrebných pre správny vývoj semenníkov (McLachlan et al., 2002).

Folikuly stimulujúci hormón (FSH) a luteinizačný hormón (LH) sa uvoľňujú z adenohipofýzy, pod vplyvom gonádotropíny uvoľňujúceho hormónu (GnRH). Testosterón je produkovaný Leydigovými bunkami vplyvom LH a je nevyhnutný pre podporu spermatogenézy a rozvoj sekundárnych pohlavných znakov. Primárnou úlohou FSH počas spermatogenézy je stimulácia Sertolihových buniek. Jeho sekrécia je regulovaná negatívnou spätnou väzbou inhibínom B a prostredníctvom testosterónu (Laurinčík et al., 2008).

2.1.2.2 Morfológia spermie

Spermia je vysoko pohyblivá, aerodynamického tvaru, vhodne uspošobená na rýchly pohyb v samičích pohlavných orgánoch počas procesu oplodnenia. Predstavuje bunku, pohybujúcu sa prostredníctvom bičíka, pričom neobsahuje bunkové organely ako ribozómy, endoplazmatické retikulum alebo Golgiho aparát, pretože nie sú potrebné pre prenos DNA do vajíčka. Na druhej strane obsahuje veľké množstvo mitochondrií umiestnených tam, kde môžu zabezpečiť potrebnú energiu pre bičík (Strejček et al., 2007).

Spermie pozostávajú z dvoch základných častí, a to z hlavičky a bičíka. Hlavička sa skladá z jadra a akrozómu. Zhrubnutie anteriórneho okraja hlavičky predstavuje apikálny hrebeň. V mieste zadného ukončenia akrozómu prechádza hlavičkou spermie viac alebo menej zreteľná línia – postakrozómový okraj. Na povrchu hlavičky rozlišujeme dve hlavné oblasti, a to akrozómová (apikálny segment a hlavný segment, spoločne označované ako *pars anterior*) a postakrozómová oblasť (*pars posterior*) (Massanyi, 1991).

V jadre (*nucleus*) je uložený otcovský genetický materiál. Jeho obsah v zrelej spermii predstavuje kondenzovaný chromátin. Od jadier somatických buniek sa líši polovičným

obsahom DNA a chromatínom, ktorý v ultratenkých rezoch nie je usporiadaný do vláknitej štruktúry, ale tvorí kompaktnú masu. (Lukáč et al., 2007).

Funkciu akrozómu môžeme interpretovať ako vysoko špecializovaný lyzozóm. Obsahuje enzýmy ako hyaluronidáza, akrozím, proakrozín, esterázy a iné. Existujú medzidruhové rozdiely v zložení enzýmov, ktoré však nemajú podstatný fyziologický význam počas fertilizácie (Maretta, 2000).

V bičíku sa nachádza pohybový a energetický aparát spermie, umožňujúci jej pohyb a penetráciu do vajíčka. Môžeme ho rozdeliť podľa rozloženia charakteristických útvarov na centriolový oddiel (tzv. krčok), mitochondriový (stredný) oddiel, hlavný a koncový (terminálny) oddiel (Kulíšek et al., 1996).

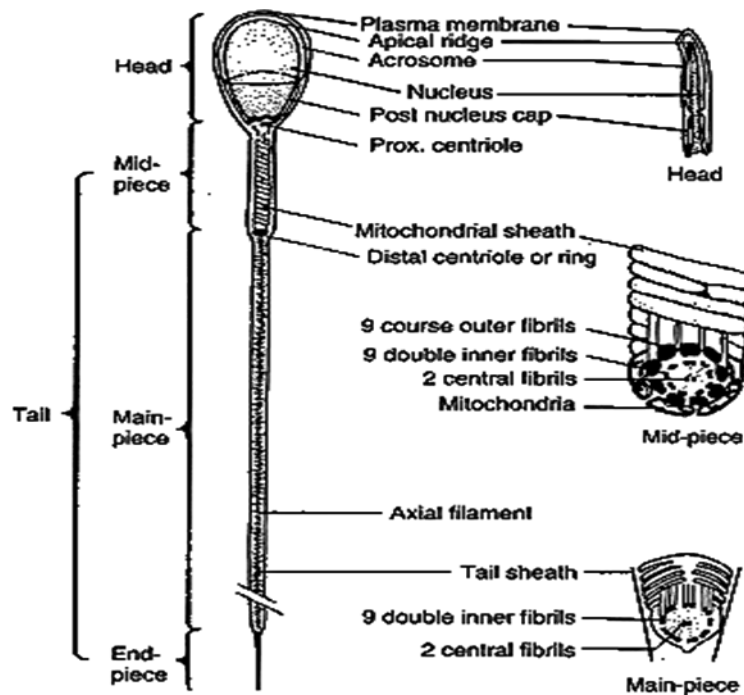
Základ centriolového oddielu tvoria proximálny a distálny centriol, z ktorých sa v zrelej spermii zachováva iba proximálny. Ďalej sú tu segmentované chordy a 1 - 2 mitochondrie. Na tento oddiel nadväzuje mitochondriový, ktorý je charakteristický koncentricky usporiadanými mitochondriami tesne pod cytoplazmatickou membránou, v počte 80 až 120, závitnicovo usporiadané. Mitochondrie považujeme za metabolicko-energetické ústredie bunky. Sú veľmi dôležité z hľadiska pohybu spermie, keďže vytvárajú ATP, pri hydrolýze ktorého vzniká energia, ktorú využívajú určité špecifické proteíny pri pohybe bičíka. Tento oddiel je ukončený anulom (Jensenovým prstencom) (Lukáč et al., 2007).

Podkladom ďalších oddielov je komplex osových vlákien (axonéma). V strede je pár dutých centrálnych mikrotubulov, okolo nich koncentricky usporiadaných 9 dvojíc, tzv. duplety. Každá dvojica pozostáva z plného vlákna A a dutého vlákna B, pričom z vlákna A vystupujú smerom k vláknam B susednej dvojice ramienka (dyneínové ramienka), obsahujúce bielkovinu dyneín, potrebnú pre pohyb spermii. Vonkajší kruh pozostáva taktiež z 9 vlákien, ktoré sú vždy plné a označujú sa ako hladké chordy. Tieto sa na úrovni stredného mitochondriálneho oddielu spájajú so segmentovanými chordami a asi v 3/4 hlavného oddielu zanikajú (Kulíšek et al., 1996).

Cytoplazmová kvapka sa morfológicky prejavuje ako lokálne zhrubnutie na bičíku, buď v oblasti centriolových štruktúr alebo proximálne od anula. Označuje sa ako protoplazmová kvapka, ktorá sa počas prechodu prisemenníkovými kanálkami posúva a v oblasti anula sa vylúči (Lukáč et al., 2007).

Hlavný oddiel predstavuje najdlhšiu časť spermie. Jeho os tvoria vlákna v usporiadaní 2+9+9. Postupne sa vlákna stenčujú a rozdiely v ich hrúbke sa vyrovnávajú. Terminálny

oddiel tvoria len fibrily osového vlákna a celý povrch spermie pokrýva dvojvrstvomá membrána (Strejček et al., 2007).



Obrázok 4 Štrukturálna schéma spermie (<http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap12.html>, 2.3.2011)

2.1.3 Ovulácia a oplodnenie

Ovulácia

Vývoj a rast pohlavných buniek je riadený hormonálnym mechanizmom, kde najdôležitejšiu úlohu zohrávajú gonadotropné hormóny (FSH, LH), riadené prostredníctvom GnRH. Hormonálna regulácia pohlavnej činnosti samice je daná interakciou hormónov, vyvolávajúcej ovuláciu a uvoľnenie zrelého oocytu. V tomto cykle rozlišujeme dve hormonálne fázy – folikulárnu a luteálnu. Ide o zložitý proces tvorby a spúšťania gonadotropných, intraovariálnych hormónov, ako aj GnRH, ktorý reguluje sekréciu estrogénu a ten následne sekréciu a uvoľňovanie FSH. Zároveň sa zvyšuje produkcia inhibínu, ktorý negatívnou spätnou väzbou blokuje uvoľňovanie FSH. Poklesom FSH dochádza k preovulačnému vrcholu LH, a tým k ovulácii oocytu (Chrenek, 2008a).

Ďalším procesom potrebným pre úspešnú ovuláciu a vstup oocytu do lievika vajcovodu je tzv. expanzia *cumulus oophorus*, ako reakcia na zvyšovanie hladiny LH. Ukladaním mukopolysacharidov sa zväčšujú medzibunkové priestory kumulárnych buniek,

až dôjde k prerušeniu spojenia medzi kumulárnymi bunkami a *cumulus oophorus*. Významnú úlohu zohrávajú aj oocytom produkované látky ako napr. GDF-9, BMP-15 a iné (Elvin et al., 1999).

Oocyt opúšťa vaječník spolu s vrstvou folikulárných buniek - *corona radiata*. Táto vrstva sa počas pobytu vo vajcovode stráca v procese oplodnenia, ale taktiež trením o steny vajcovodu (Chrenek, 2008a).

Oplodnenie

Oplodnenie u cicavcov zahŕňa migráciu spermii v samičom reprodukčnom trakte, biochemické a morfológické zmeny spermii a interakciu spermii s vajíčkom vo vajíčkovode.

V roku 1951 M. Ch. Chang a C. R. Austin nezávisle na sebe zistili, že spermie cicavcov musia stráviť nejaký čas v reprodukčnom trakte samíc, aby získali schopnosť oplodniť vajíčko. Tento jav je základom aktivácie schopnosti oplodnenia a nazýva sa kapacitácia. Kapacitácia je proces, počas ktorého sú cholesterol a iné steroly odstránené z povrchu spermie a nekovalentne viazané glykoproteíny získané v prisemenníku sú uvoľňované z povrchu spermie (Ikawa et al., 2010).

Ak kapacitovaná spermia prenikla cez obal kumulárných buniek, dôjde k spojeniu so ZP, ktorá sa u cicavcov skladá z troch glykoproteínov (ZP1, ZP2 a ZP3). Glykoproteín ZP3 slúži ako primárny receptor pre spermie a môže vyvolať akrozomálnu reakciu. ZP neslúži len ako receptor pre spermie, ale aj ako medzidruhovú bariéru (Strejček et al., 2007).

Počas akrozomálnej reakcie sa v procese exocytózy uvoľní obsah akrozómu, a to hyaluronidáza a proteázy, ktoré sú potrebné pre penetráciu spermie cez ZP. Taktiež podporujú pôsobenie iných proteínov na povrchu spermie tak, aby pôsobili na ZP2 a pomohli spermii udržať si pevné naviazanie na ZP počas penetrácie (Laurinčík et al., 2005).

Ďalším dôležitým krokom je zabránenie penetrácii viacerých spermii do vajíčka a jeho oplodneniu, čo by viedlo k polyspermii. Takéto polyploidné embryá zvyčajne hynú počas raného vývoja. Na prevenciu polyspermie cicavčie vajíčka využívajú bloky. Fúziou spermie s bunkovou membránou vajíčka sa aktivuje inositol-fosfolipidová signálna bunková cesta vajíčka, ktorá spôsobí vnútrobunkové zvýšenie Ca^{2+} . Toto vnútrobunkové zvýšenie Ca^{2+} šíriace sa vo forme vln aktivuje vajíčko a vyvolá kortikálnu reakciu. Počas

kortikálnej reakcie sa exocytózou uvoľní obsah kortikálnych granúl do PVP a štruktúra ZP sa zmení tak, aby sa neumožnila interakcia ďalších spermíí (Wortzman-Show et al., 2007).

Chrenek (2008a) udáva, že aj napriek snahe výskumných tímov sa doposiaľ nepodarilo jednoznačne objasniť celý mechanizmus aktivácie vajíčka po prechode spermie. Existujú dve teórie snažiace sa vysvetliť princíp tejto aktivácie:

1. preniknutím spermie do cytoplazmy oocyty sa uvoľní proteínový faktor spermie, ktorý aktivuje oocyt,
2. receptory spermie aktivujú membránový G-proteín alebo tyrozín kinázu, následne receptor s fosfoionizidázou C, ktorá stimuluje produkciu inozitol 1,4,5-trifosfátu a ten spúšťa mechanizmus uvoľňujúci Ca^{2+} z kanálikov endoplazmatického retikula, čím sa aktivuje oocyt.

2.1.3.1 Vývoj prvojadier a charakteristika jednotlivých embryonálnych fáz

Po preniknutí spermie a dokončení druhého meiotického delenia, počas ktorého sa vylúčilo pólóvé teliesko II. radu, vzniká zo zrelého vajíčka zygota ($2n$). Z haploidnej sady chromozómov sa formuje materské alebo maternálne prvojadro. Jadro spermie prekonáva výrazne zmeny v cytoplazme oocyty, nastáva jeho dekondezácia, obalí sa membránou vznikajúcou z endoplazmatického retikula a formuje sa v otcovské alebo paternálne prvojadro (Hyttel et al., 2010).

Pivko (1995) delí fyziologický vývoj samčieho a samičieho prvojadra do šiestich štádií, avšak s rôznym časovým trvaním:

PN1 – spermia sa nachádza v ooplazme, bičik je ešte spojený s hlavičkou a začína sa druhé meiotické delenie,

PN2 - začiatok dekondezácie chromozómov, bičik sa oddeľuje od hlavičky a ukončuje sa druhé meiotické delenie vylúčením druhého pólóvého telieska do PVP,

PN3 - pokračuje dekondezácia chromozómov, vytvára sa budúca jadrová membrána prvojadier, druhé pólóvé teliesko je kompletne vylúčené do PVP,

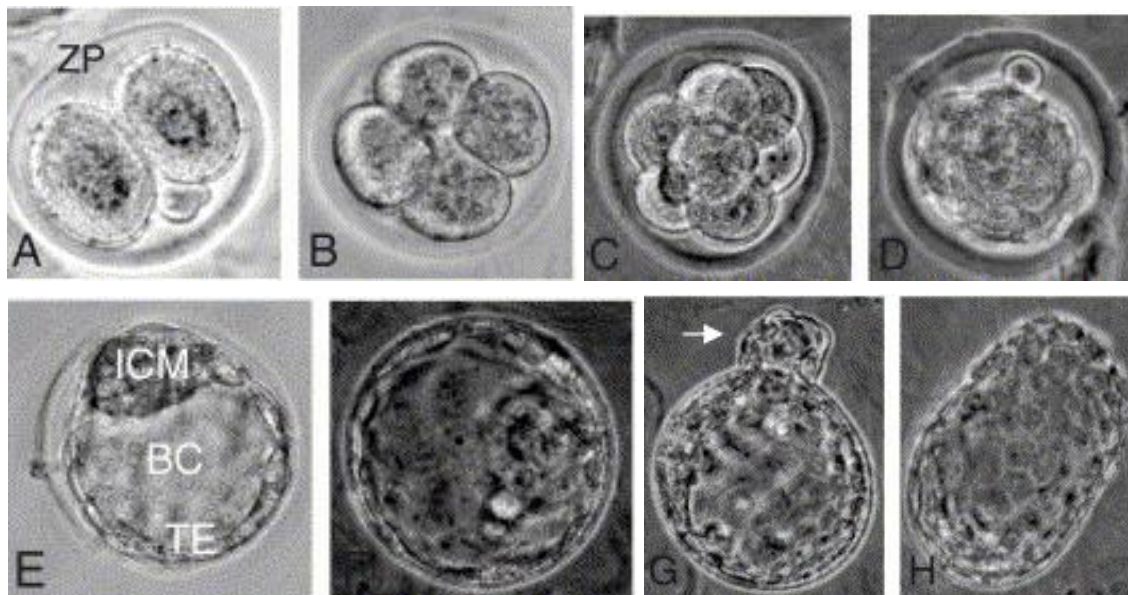
PN4 - dekondezácia chromozómov je ukončená, rané prvojadrá sú obklopené kompletnou jadrovou membránou,

PN5 - zväčšovanie prvojadier (samčie je väčšie) a ich premiestňovanie do centra ooplazmy, druhé pólóvé teliesko a bičik sú stále prítomné,

PN6 - prvojadrá s maximálnym objemom sa nachádzajú v centre ooplazmy v tesnej apozícii.

Väčšie paternálne a menšie maternálne prvojadro navzájom splynú (syngamia) a oplodnené vajíčko sa v krátkom čase rozdelí. Takmer po 24 hod. od fúzie gamét vzniká rané embryo v štádiu 2-blastomér (Laurinčík et al., 2008).

Ďalším mitotickým delením vzniká 4-bunkové, 8-bunkové, 16-bunkové štádium atď. Všetky tieto vývojové štádiá sú za optimálnych podmienok obklopené kompaktnou a celistvou ZP a pravidelne sa deliacimi homogénnymi blastomérmi. Od štádia 16-blastomér hovoríme o včasnej morule. Následné štádium kompaktnej moruly je charakteristické formovaním blastocélovej dutiny a diferencovaním buniek na bunky trofoblastu a bunky vnútornej bunkovej masy. V štádiu blastocysty je už zreteľná diferenciácia vonkajšej vrstvy trofoblastu od kompaktnejšej vnútornej masy buniek, označovanej tiež ako embryonálne kmeňové bunky. Prechod do expandovanej blastocysty je sprevádzaný zväčšovaním vonkajšieho priemeru embrya, ZP sa znižuje a praská. Keď blastocysta opustí ZP (hatching) hovoríme o voľnej blastocyste (Chrenek, 2008a).



Obrázok 5 Znáročenie jednotlivých embryonálnych štádií (myš): A) 2-bunkové štádium, B) 4-bunkové štádium, C) 8-bunkové štádium, D) štádium kompaktnej moruly, E, F) štádium blastocysty (ICM - vnútorná bunková masa, BC - blastocélová dutina, TE - trofoblast), G,H) hatching blastocysty (Cheng et al., 2005).

Tabuľka 3 Chronológia delenia embryí niektorých druhov zvierat (Chrenek, 2008a)

Druh/štádium	2-bunkové	4-bunkové	8-16-bunkové	Morula	Blastocysta
Krava	36 hod.	72 hod.	96 hod.	6-7 deň	8-9 deň
Ovca/koza	36 hod.	42 hod.	72 hod.	4-5 deň	6-7 deň
Prasnica	25 hod.	50 hod.	96 hod.	5 deň	6 deň
Kráľičica	24 hod.	35 hod.	48 hod.	3 deň	5deň

2.2 Produkcia embryí *in vitro*

Termín *in vitro* doslova znamená „v skle“, teda ide o oplodnenie prebiehajúce v podmienkach mimo tela - v „skle“ Petriho misiek (*in vitro* fertilization - IVF) (Laurinčík et al., 2008).

Priekopník tejto metódy prof. Walter Heape ešte v roku 1891 úspešne vykonal embryotransfer (ET) u rozdielnych druhov králikov. Jeho pôvodný zámer však nebol ET, ale sledovanie fenotypových zmien v novom prostredí. Po mnohých pokusoch kultivovať oocyty a embryá v laboratórnych podmienkach sa v roku 1939 podarilo G. Pincusovi ako prvému získať zrelé oocyty v MII (Strejček et al., 2007).

Prelomovým bolo zistenie, že je potrebná kapacitácia spermií Austinom a Changom v roku 1951. O osem rokov neskôr sa Changovi podarili *in vitro* oplodniť králičí oocyt a úspešne ho preniesť do recipientky. V roku 1978 bolo výsledkom práce Edwardsa, Steptoea a kolektívu pracovníkov narodenie prvého človeka (Louise Brown) metódou *in vitro*. (Kane, 2003).

In vitro produkcia embryí (IVP) zahŕňa ukončenie troch biologických krokov: *in vitro* maturácia (IVM), *in vitro* oplodnenie (IVF) a *in vitro* kultiváciu embryí (IVC).

2.2.1 *In vitro* maturácia oocytov (IVM)

Dôležitým procesom je navodenie superovulácie donorky aplikáciou exogénnych gonadotropínov. Superovulácia je hormonálna stimulácia folikulogenézy, ovplyvnenie rastu, dozrievania folikulov a ovulácie oocytov, ktorá umožňuje získať zvýšený počet životaschopných oocytov (Chrenek, 2008a). Na superovuláciu kráv sa používa jedna

injekcia s 1500 až 3000 m.j. sérového gonadotropínu gravidných kobýl (PMSG), avšak zistilo sa, že použitím superovulačného režimu s FSH a LH v pomere 5:1 sa dosiahne viac ovulácií (Pivko et al., 2000).

Z fyziologického hľadiska sa hormonálne ošetrenie uskutočňuje v luteálnej fáze, kedy sa na vaječníku nachádza žlté teliesko (*corpus luteum* – CL). Táto fáza nie je hormonálne ani morfológicky homogénna, pretože na vaječníku začína rásť 10-20 folikulov. Väčšina z nich podlieha atrezií, ostatné dozrievajú. Synchronizáciu rastu folikulov, a tým aj vyšší počet získaných oocytov možno dosiahnuť aj aplikáciou GnRH (Chrenek, 2008a).

Pre oplodnenie *in vitro* používame oocyty z antrálnych neovulačných folikulov alebo oocyty z preovulačných folikulov. Antrálne preovulačné folikuly sa získavajú väčšinou zo zvierat zabitých na bitúnku, a to aspiráciou týchto folikulov o priemere 5 mm (Antal et al., 2005). Ďalšou z možností je získavanie embryí metódou slicing, princípom ktorej je narušenie folikulov na povrchu vaječníka pomocou držiaka so žiletkou, čím sa uvoľnené oocyty vyplavia do pripraveného roztoku (napr. PBS – phosphate buffered saline) (Laurinčík et al., 2008). Technikou ovum pick up (OPU) získavame oocyty zo živých zvierat punkciou pomocou špeciálnej ihly pod kontrolou ultrazvuku. Ihlou sa folikul prepichne a folikulárna tekutina sa odsaje spolu s oocytom (Das et al., 1996).

V preovulačných folikuloch *cumulus oophorus*, špecializovaná skupina buniek *stratum granulosum*, vytvára spolu s oocytom integrovaný kumulus-oocytárny komplex (COC). Na začiatku *in vitro* kultivácie je COC kompaktný s bunkami tesne pri sebe, po 6-8 hod. kultivácie dochádza k rozširovaniu medzibunkových priestorov (expanzia *cumulus oophorus*) (Wani, 2002).

Camargo et al. (2006) uvádzajú, že vo fáze rastu vajíčko hovädzieho dobytku zväčšuje svoj priemer na viac ako 120 μm , pričom štúdie ukázali, že oocyty s priemerom menej ako 110 μm môžu byť stále vo fáze rastu a majú nižšiu schopnosť vyvíjať sa po oplodnení. Bolo navrhnuté, že kritický priemer oocytov k získaniu vývojovej kompetencie je 110 μm , čo zodpovedá folikulu o priemere 3 mm.

Jadro získaných oocytov sa v podmienkach *in vitro* počas niekoľkých hodín rozpadne a zaháji tak jadrové dozrievanie.

Dozrievanie oocytov v podmienkach *in vitro* prebieha v kultivačných médiách v semianaeróbných podmienkach pri teplote 37 - 39 °C (v závislosti od druhu zvierat'a).

Tieto kultivačné média môžu byť syntetické, na báze médií pre tkanivové kultúry obohatené o aminokyseliny (AMK), minerálne látky, rastové faktory, energetické substráty atď. Úspešnosť IVM závisí taktiež od atmosféry kultivácie a manipulácie, ktorá je najčastejšie 5 % CO₂ vo vzduchu alebo je zložená z 5 % CO₂, 10 % O₂ a 85 % N₂. V neposlednom rade je dôležitá konštantná teplota a pH kultivačného média, ktoré by malo byť 7,2 - 7,4 (Strejček et al., 2007). Na stabilizáciu optimálneho pH sa používa bikarbonátový tlmivý roztok NaHCO₃ v kombinácii s 5 % CO₂ v inkubátore. Okrem tohto pufovacieho systému sa využíva aj fosfátový tlmivý roztok, napr. médium Dulbecco's PBS (Chrenek, 2008a).

Kultivácia oocytov prebieha v malých kvapkách (25 - 90 µl) pod silikónovým olejom (napr. hovädzí dobytok 30 µl), prípadne v špeciálnych Petriho miskách s objemom 500 µl (ošípaná) (Strejček et al., 2007).

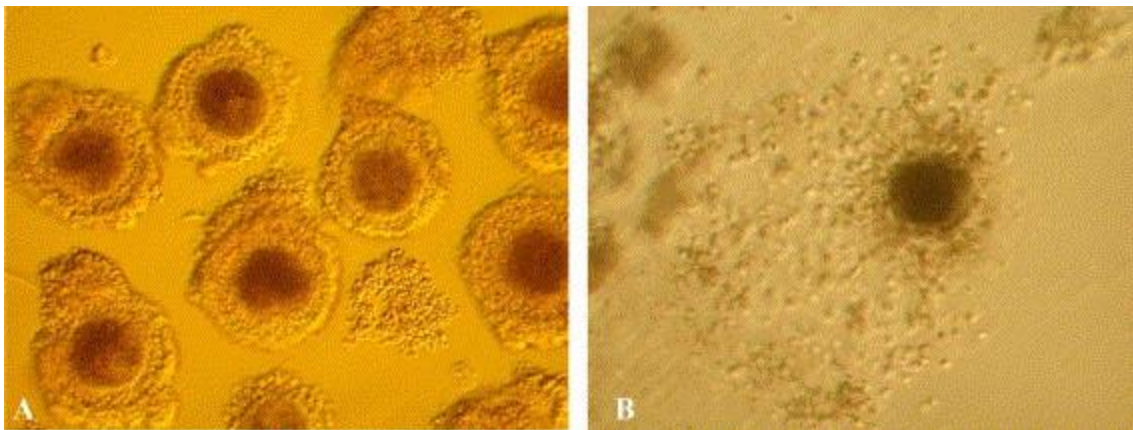
Základné zložky kultivačného média (Laurinčík et al., 2005):

- Voda - predstavuje 99% obsahu média, jej kvalita je pri príprave média najdôležitejším faktorom. Lepšie výsledky kultivácie sa dosahujú s vodou, ktorá bola trojnásobne destilovaná, aj keď počas tohto procesu môže dôjsť k uvoľneniu iónov a pyrogénov zo skla destilačnej aparatúry. Optimálne je používanie purifikačného systému Milli-Q.
- Energetické substráty – väčšina médií obsahuje pyruvát, glukózu, laktózu a glutamín. Glukóza sa uprednostňuje pre dosiahnutie vyšších vývojových štádií, avšak nemôže byť samostatne použitá pri raných vývojových štádiách v dôsledku blokovania glykolýzy.
- Proteíny – používajú sa séra, pričom proteíny v nich obsiahnuté viažu hormóny, vitamíny, mastné kyseliny, ióny kovov a pyrogény. Význam týchto proteínov spočíva vo fixácii dusíkatých látok a iónov ťažkých kovov.
- Ióny – koncentrácia a zastúpenie iónov je variabilné v závislosti od typu média a druhu zvierat'a. Najväčšie zastúpenie v tekutine vajcovodov predstavujú ióny draslíka a vápnika. Dôležitým faktorom je osmolarita média (optimum 275 - 295 mOsm).
- Aminokyseliny – niektoré AMK pôsobia ako stimulátory vývoja (glycín, histidín, serín), iné ako inhibítory (fenylalanín, leucín, izoleucín).

- Vitamíny, hormóny a rastové faktory – funkcia vitamínov nie je doposiaľ známa. Úloha hormónov a rastových faktorov v procese kultivácie oocytov je známa, avšak ich úloha pri kultivácii embryí je predmetom intenzívneho výskumu.

Optimálny čas maturácie (viac ako 90 % oocytov v MII) je 22 - 24 hod., pri prasacích oocytoch táto fáza zaberá až 44 - 48 hod (Laurinčík et al., 2005).

Na maturáciu oocytov ošípanej sa používa médium NCSU-37, do ktorého sa na prvých 24 hod. pridávajú hormóny hCG (ľudský choriónový gonadotropín) a PMSG, prípadne cAMP a na ďalších 24 hod. sú oocyty kultivované v tom istom médiu, ale bez hormónov (Strejček et al., 2007). U hovädzieho dobytky je to modifikované médium TCM-199. Pred použitím média pre in vitro kultiváciu oocytov sa pridáva 10% bovinného inaktivovaného séra pri dodržaní pH 7,2 - 7,4 a osmolite 300 mosmol. Alternatívne dodatky pre in vitro kultiváciu oocytov sú 20% inaktivované sérum kráv v ruji, FSH 0,07 m.j., LH 0,42 µg/ml a heparín 4 m.j (Pivko et al., 2000).



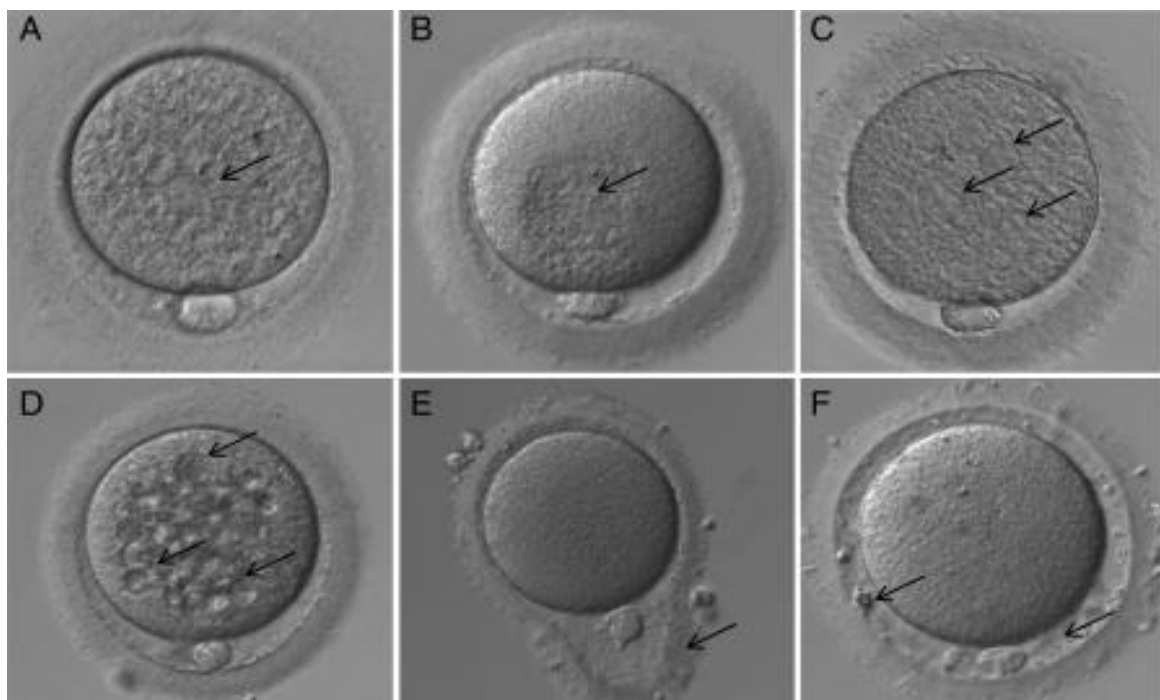
Obrázok 6 Oocyty pred a po kultivácii v médiu NCSU-23: A) čerstvo zozbierané prasacie oocyty, B) oocyty po 44 hod. kultivácii v médiu NCSU-23 (Weng et al., 2007)

Morfologické vlastnosti kumulárnych buniek spolu s morfológiou cytoplazmy oocytu sú základom hodnotenia oocytu do 5 morfológických tried (Chrenek, 2008a):

1. oocyt s kompletnou *corona radiata* , 6 a viac vrstiev kumulárnych buniek, stredne tmavá homogénna a jemne granulózna cytoplazma.
2. oocyt s nekompletnou *corona radiata*, 3 - 5 vrstiev kumulárnych buniek, stredne tmavá homogénna cytoplazma.

3. oocyt s 1 - 2 vrstvami kumulárných buniek, so stredne tmavou až tmavou cytoplazmou a výskytom nekrotických bodov.
4. oocyt s náhodnými zvyškami kumulárných buniek, tmavá nehomogénna a čiastočne fragmentovaná cytoplazma.
5. oocyt bez kumulárných buniek s fragmentovanou cytoplazmou.

Podmienky kultivácie *in vitro* môžu byť škodlivé pre oocyty, hlavne počas IVM. Oocyty prechádzajú prvým meiotickým delením a často vznikajú chromozomálne anomálie (Pivko et al., 2004). Z ďalších anomálií je to tvorba vakuol, fragmentácia oocytov, abnormálna ZP a pod. Niektoré z nich zobrazuje obrázok 7.



Obrázok 7 Morfológické abnormality ľudských oocytov (šípky), pozorované svetelným mikroskopom: A) difúzna zrnitosť cytoplazmy, B) obsah granúl v cytoplazme, C) zoskupené hladké endoplazmatické retikulum, D) vakuoly v cytoplazme, E) abnormálny tvar ZP, F) PVP obsahujúci fragmenty (Rienzi et al., 2011).

2.2.2 *In vitro* oplodnenie (IVF)

In vitro oplodnenie sa uskutočňuje tromi spôsobmi: (Chrenek, 2008a):

1. IVF v „skúmavke“ s kapacitovanými spermiami, ktoré sú kultivované spolu s oocytmi v médiu (CO₂ inkubátor), čím sa zabezpečí náhodné preniknutie

spermie do oocytu. Metóda sa používa ak nie je problém s motilitou spermii (pohyblivosť spermii).

2. Oplodnenie intracytoplazmatickou injekciou spermie (ICSI), kedy je vybraná jedna kapacitovaná spermia (imobilizovaná) a injektovaná priamo do oplazmy oocytu. Táto metóda sa používa pri zníženej motilite spermii a pri ich zníženej koncentrácii v odobratej vzorke semena.
3. Oplodnenie subzonálnou injekciou spermie (SUZI), kedy sa niekoľko spermii zavedie do PVP. Využíva sa v prípade, že je problém s koncentraciou a nie motilitou spermii.

Pri kapacitácii spermii *in vitro* sa snažíme napodobniť proces kapacitácie spermii *in vivo*, a to odmytím semennej plazmy a aktiváciou akrozómovej reakcie. Potrebný čas na kultiváciu s oocytmi je 16 - 18 hod., následne sú spermie odmyté a asi 10 % vajčiek je fixovaných a farbených (orceínom, lakmoidom) na stanovenie percenta penetrácie, prípadne polyspermie, ale taktiež ako dôkaz, že nedošlo len k partenogenetickej aktivácii (Strejček et al., 2007).

Na klasické *in vitro* oplodnenie oocytov hovädzieho doby v kvapke sa používa médium TALP (Tyrode Albumin Lactate Pyruvate), doplnené heparínom a penicilamínom, hypotaurínom a epinefrínom v atmosfére 5 % CO₂ a 20 % O₂ (Kubovičová, 2002).

ICSI patrí medzi významné techniky v oblasti asistovanej reprodukcie (ART) a predstavuje možnosť štúdia základných mechanizmov oplodnenia a začiatkov vývoja embryí. Použitie v poľnohospodárstve značne sťažuje nízka úspešnosť tejto metódy, pokiaľ ide o hospodársky významné druhy. S výnimkou človeka zostáva technológiou s nízkou efektívnosťou. Prvé údaje týkajúce sa ICSI publikovali v roku 1976 Uehara a Yanagimachi, ktorí injikovali humánne spermie a spermie škrečka do maturovaných oocytov škrečka a pozorovali transformáciu hlavičiek spermii (jadier) na dobre vyvinuté samčie prvajdrá. Prvé cicavce, ktoré sa narodili touto technikou boli králiky. Do súčasnej doby sa podarilo po aplikácii ICSI získať životaschopné jedince u ľudí, opíc, myší, doby, ošípanej a pod. (Pivko et al., 2004).

ICSI sa najviac využíva na riešenie mužskej neplodnosti, najmä u mužov s ťažkou oligospermou (nízka koncentrácia spermii, menej ako $20 \cdot 10^6/\text{ml}^{-1}$), asthenospermou (motilita nižšia ako 5%), teratospermou (normalita spermie menšia ako 4 %) a taktiež, keď klasické IVF zlyháva (Strejček et al., 2007).

U ošípanej je *in vitro* produkcia embryí obmedzená častým výskytom polyspermie, takže ICSI je jedným z alternatívnych spôsobov produkcie monospermatických zygót (García-Roselló et al., 2009).

Ďalšou z možností využitia ICSI je tvorba transgénnych jedincov, kedy sa spermie používajú ako vektory (nosiče) cudzej DNA pri jej zabudovaní do budúceho genómu embrya. Základom je kultivácia spermií s cudzou DNA v suspenzii (asi 1 µg DNA na 10⁶/ml spermií), minimálne 30 min. pred IVF (Chrenek, 2008a).

V súčasnosti využívanou metódou je aj separácia spermií podľa pohlavia a následné oplodnenie oocytu. Najbežnejšie metódy predstavujú techniky voľne bežiackej elektroforézy, tenkovrstvovej distribúcie (TLCCD), imunologickej detekcie H-Y antigénu, albumínovej separácie spermií a prietokovej cytometrie (Chrenek, 2008a).

Morrell a Rodriguer-Martinez (2011) uvádzajú, že najspoľahlivejšou metódou je výber a separácia spermií, ktorých DNA je značená syntetickým fluorescenčným farbivom Hoechst 33342, s následným použitím prietokovej cytometrie. Keďže chromozóm X je väčší ako Y, zaberá viac DNA špecifického farbiva. U hovädzieho dobytká je napr. rozdiel v obsahu DNA približne 4,2 %, kým u ošípanej je to 3,8 %. Cytometrické triedenie spermií pre ART bolo obmedzené prevažne na chov hovädzieho dobytká a pre ICSI v chove koní.

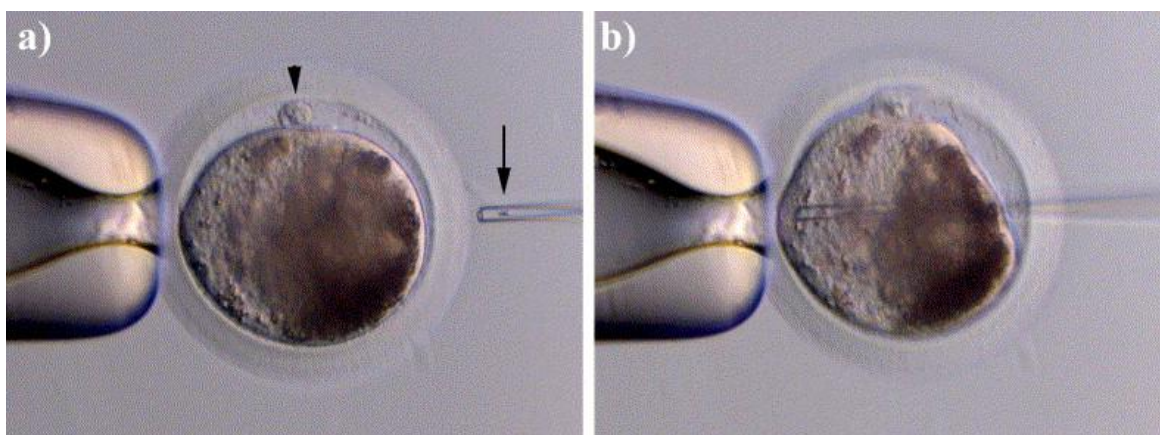
Na úspešnosť ICSI techniky má vplyv okrem životaschopnosti spermií, kvality oocytu aj efektívna aktivácia oocytu. Aj keď u väčšiny druhov (ovca, králik, koza) je zavedenie spermie do ooplazmy na aktiváciu oocytu postačujúce, u hovädzieho dobytká sa používa aj exogénna aktivácia, ako napr. elektrickým prúdom, etanolom, CaCl₂, inozitol-1-4-5-trifosfátom a ionomycínom (García-Roselló et al., 2009).

Keďže touto technikou sa spermia zavádza priamo do ooplazmy a obchádzajú sa všetky prírodné prekážky oplodnenia, úspešnosť ICSI je závislá na kvalite spermie, vybratej pre tento účel. Použitie normálnej morfológie ako jediného kritéria pre výber, zvyšuje pravdepodobnosť použitia spermie s abnormálnymi chromozómami (Morrell, Rodriguer-Martinez, 2011). Park et al. (2005) uvádzajú zvýšenie účinnosti ICSI, keď sa kančie spermie udržiavajú v kvapôčke kyseliny hyalurónovej (HA), na rozdiel od spermií v roztoku PVP (polyvinylpyrolidon). Aj keď vývoj blastocysty bol rovnaký v oboch skupinách, frekvencia normálnych diploidných embryí bola vyššia v skupine s HA (75,5 %), než v skupine s PVP (68,2 %). Autori dospeli k záveru, že používanie HA pre výber

spermií na základe ich morfológie je lepšie pre produkciu chromozomálne normálnych embryí.

Aj akrozomálny obsah spermií môže byť potenciálne nebezpečný pre vývoj embryí. Morozumi a Yanagimachi (2005) naznačili, že úspech ICSI by sa mohol zlepšiť odstránením oboch membrán spermií a akrozómu pred samotnou injekciou spermie, pretože zmeny súvisiace s aktiváciou oocyta a embryonálnym vývojom prebiehajú rýchlejšie, keďže ooplazma vajíčka nebola vystavená hydrolytickým enzýmom akrozómu.

Subzonálne zavedenie spermie (SUZI) spočíva v zavedení 1 - 10 spermií (podľa kvality) cez ZP a cytoplazmatickú membránu do PVP zrelého oocyta. Nevýhodou tejto techniky je nízka oplodnenosť a vysoký výskyt polyspermie. SUZI bola u dobytka považovaná za výhodnú len z hľadiska sledovania interakcie medzi spermou a oocytom, lebo úspešnosť oplodnenia bola zvyčajne nízka (Kubovičová, 2002).



Obrázok 8 Intra-cytoplazmatická injekcia spermie: a) zrelý oocyt s Pb a spermia v hrote mikropipety, b) vloženie spermie do cytoplazmy oocyta (Hinrichs, Choi, 2005)

2.2.2.1 Hodnotenie kvality spermií a ich uchovávanie

Metodické postupy aseptického odberu, hodnotenia, riedenia, ekvibrácie, zmrazovania, uchovávaní a rozmrazovania semena musia spĺňať požiadavky kladené na prežívateľnosť spermií. Spracovanie semena má vplyv na jeho kvalitu, významne ovplyvňuje pohyblivosť, fertilizačnú schopnosť, funkčnú celistvosť membrán a celkovú životaschopnosť spermií vyjadrovanú reprodukčnými parametrami (Makarevič et al., 2009).

Kvalitatívne parametre semena sú významným ukazovateľom pre jeho ďalšie využitie prípadne spracovanie. Analýza spermií vyhodnotená počítačom CASA (Computer Assisted Semen Analysis) je kľúčovým a objektívnym moderným nástrojom pre stanovenie kvality spermií. Aby bol systém uznaný ako CASA, musí štandardne vyhodnocovať nasledujúce parametre pohyblivosti (Norbert et al., 2006):

- DAP (distance average path) - priemerná vzdialenosť
- DCL (distance curved line) - krivočiara vzdialenosť
- DSL (distance straight path) - priamočiara vzdialenosť
- VAP (velocity average path) - priemerná dráhová rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- VCL (velocity curved line) - krivočiara rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- VSL (velocity straight line) - priama rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- STR (straightness) - priamosť pohybu a LIN (linearity) - priamočiarosť
- WOB (wobble) - kmitanie
- ALH (amplitude of lateral head displacement) - amplitúda bočného premiestnenia hlavičky ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

HTM (Hamilton Thorton Motility analyzer – USA) je integrovaný systém, ktorý patrí medzi najčastejšie používané CASA systémy v humánnej, ale aj vo veterinárnej andrológii. Okrem základných hodnôt ako počet všetkých, pohyblivých a progresívnych spermií vyhodnocuje aj percentuálne zastúpenie predchádzajúcich parametrov. (Norbert et al., 2006).

Fertilizačná schopnosť spermií sa hodnotí testami zameranými na funkčné parametre semena, ako sú test termorezistencie (prežívateľnosti), test migrácie spermií cervikálnym hlienom alebo test migrácie spermií syntetickou náhradou cervikálneho hlienu (Laurinčík et al., 2005).

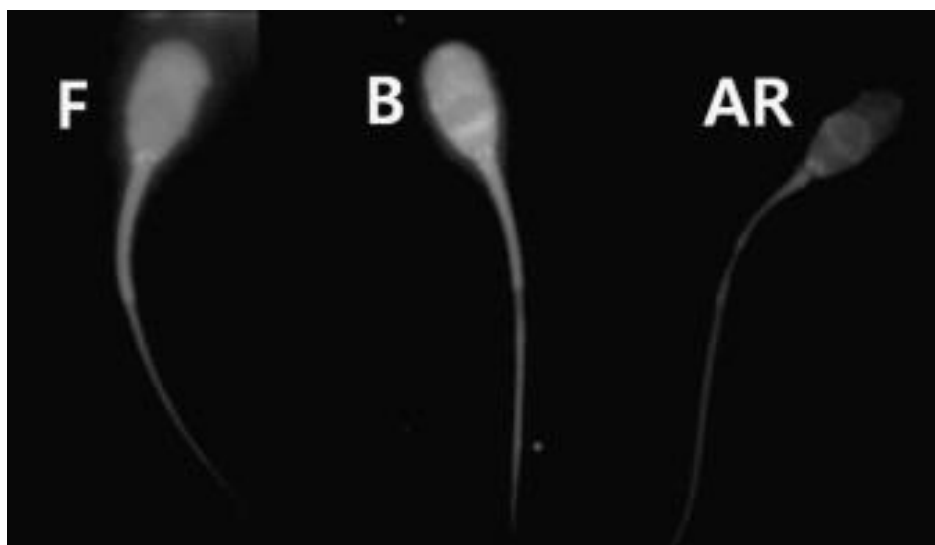
Taktiež sa používa metóda „swim-up“ spočívajúca v schopnosti aktívnych spermií vyplávať z hustejšieho prostredia seminálnej plazmy do redšieho kultivačného média (Makarevič et al., 2009).

Morfologická analýza spermií stanovuje percento abnormálnych spermií, ktoré môžu ovplyvniť plodnosť vytvorením defektnej zygoty alebo blokovat' fertilizáciu normálnych spermií. Medzi morfologické zmeny patria vývojové tvarové anomálie degeneratívneho charakteru, patologické zmeny tvaru hlavičky, zmeny na akrozóme a spojovacej časti, patologické časti na bičíkoch, nezrelé spermie a pod. (Strejček et al., 2007).

Všeobecne sa predpokladá, že mnohé tvarové zmeny vyplývajú z malformácie protoplazmovej kvapky. Podkladom bývajú zmeny na cytoplazmatickej membráne, v obsahu alebo predčasnej aktivácii lyzozómových enzýmov. Takéto spermie sa definujú ako nezrelé (Lukáč et al., 2007).

V súčasnosti sa venuje veľká pozornosť rozvoju farbiacich metód. Okrem klasickej metódy farbenia podľa Hancocka farbivom Giemsa-Romanovsky sa používa aj dvojité farbenie v kombinácii kongo-červeň a farbivo Giemsa, ktoré farebne rozlíši nielen živé a mŕtve spermie, ale aj signalizuje priebeh akrozómovej reakcie spermií (Makarevič et al., 2009).

Kapacitačný status spermií je hodnotený na základe zmien obsahu Ca^{2+} pomocou fluorescenčného antibiotika chlortetracyklínu (CTC). Komplex CTC - Ca^{2+} sa prednostne viaže na hydrofóbne oblasti ako je bunková membrána, a vytvára rôzne typy farbenia charakteristické pre nekapacitované spermie (F), kapacitované spermie (B) a spermie s akrozómovou reakciou (AR), znázornené na obrázku (Oh et al., 2010).



Obrázok 9 Živé spermie ošípanej farbené metódou CTC: F) nekapacitovaná spermia, B) kapacitovaná spermia, AR) akrozómová reakcia spermie (Oh et al., 2010)

Jednou z metód detekcie apoptózy (fyziologicky programovaná bunková smrť) je technika založená na väzbe fosfatidylserínu (PS) fluorescenčne značeným annexínom. Táto metóda umožňuje detekciu skorých fáz apoptózy, ešte pred stratou integrity bunkovej membrány (Makarevič et al., 2009).

Po analýze semena sa spermie využívajú či už na spomínané IVF, prípadne na insemináciu. V prípade, že sa semeno nepoužije hneď, musí sa uchovať pre ďalšie použitie, najčastejšie zmrazovaním alebo schladením. Na prežitie spermií pri hlbokom zmrazení vplýva veľa faktorov. Jednou z najdôležitejších zásad pri konzervácii semena je vytvorenie takého prostredia, ktoré sa najviac približuje prirodzeným podmienkam vytvorených semennou plazmou. Pre tento účel sa používajú riedidlá (Chrenek, 2008a).

Funkciou riedidiel je okrem získania väčšieho objemu a tým aj väčšieho počtu inseminačných dávok, aj dodanie živín a energie, ochrana pred tepelným šokom, regulácia škodlivého vplyvu kolísania pH, udržiavanie správnej osmotickej rovnováhy a inhibícia patogénov. Antibiotiká sa pridávajú najmä ako ochrana proti kmeňom ako *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* a iné (Smital, 2001).

Uchovávanie spermií je možné realizovať zmrazovaním do peliet alebo pejet. Uvedené metódy sa používajú na zmrazovanie spermií býkov a kancov, problém je však so spermiami baranov a králikov, kde kvalita spermií po rozmrazení je nedostatočná. Spermie sa po nariadení podchladia na +1 °C až +5 °C a následne sa niekoľko hodín nechávajú ekvilibrovať pri tejto teplote. Optimálne sa zmrazujú do teploty -125 °C v priebehu 10 - 15 min., a následne sa ponoria do tekutého dusíka (-196 °C) (Laurinčík et al., 2005).

Jednu z nových technológií na konzerváciu spermií predstavuje sušenie mrazom. Spermie môžu byť uložené za nižšie náklady, bez použitia kvapalného dusíka, pri teplote 5 °C alebo pri izbovej teplote. Po sušení mrazom spermie strácajú pohyblivosť a môžu byť použité na ICSI (Kikuchi et al., 2008).

Pri konzervácii sú spermie uvedené do stavu anabiózy, pri ktorom je ich pohyblivosť zastavená a ich metabolizmus obmedzený na minimum. Dôležité je, aby v priebehu konzervácie nedošlo k poškodeniu povrchových membrán a akrozomálneho systému, čím by sa narušila oplodňovacia schopnosť (Smital, 2001).

Vysoké koncentrácie elektrolytov, ktoré môžu poškodiť bunkové membrány a organely, sa redukujú kryoprotektívnymi látkami. Medzi takéto látky zaradujeme glycerín a dimetylsulfoxid (DMSO) v koncentrácii od 1 do 2 M. Používajú sa tiež variácie glycerolu a methanolu, etylénglykolu alebo 1-2 propándiolu (Laurinčík et al., 2005).

2.2.3 *In vitro* kultivácia embryí (IVC)

Všeobecne môžeme rozlíšiť dva základné kultivačné systémy, a to systémy vyžívajúce IVC embryí si vyžaduje špecifické nároky na kultivačný systém, vzhľadom na dlhodobý pobyt embryí v kultúre pred ich transferom, či kryokonzerváciou ko-kultúry (co-culture), prípadne na ko-kultúry adaptované médiá (kondicionované médiá) a médiá produkované bez týchto ko-kultúr, prípadne secernovaných faktorov (definované a semi-definované médiá) (Pivko et al., 2004).

Ko-kultúry sa obvykle kultivujú v médiu TCM-199 alebo Menezo-B2 s prídavkom fetálneho séra. Ako ko-kultúry slúžia kumulárne bunky, bunky epitelu vajcovodu, prípadne bunky pečene potkana línie „buffalo“ (BRL). Kondicionované médiá obsahujú faktory secernované bunkami (peptidy, rastové faktory a cytokiníny), ktoré sú prospešné pre kultiváciu (Hasler, 2000).

Médiá produkované bez účasti somatických buniek obsahujú buď sérum ako prísadu (semidefinované), alebo sa skladajú iba zo syntetických zložiek (definované) (Thomson, 1996).

SOF (Synthetic Oviductal Fluid) je štandardné médium pre kultiváciu preimplantačných embryí kráv, ku ktorému sa pridávajú AMK a sérum, prípadne bovinný serový proteín (BSA) (Gandhi et al., 1999). SOF médium umožňuje vytvoriť definované podmienky kultivácie, najmä pri použití už spomínaného BSA ako náhrady krvného séra, čo znižuje variabilitu výsledkov kultivácie. Na druhej strane, nevýhodou je potreba špecifickej atmosféry so zníženým obsahom kyslíka, kde za optimálnu je považovaná atmosféra s obsahom O₂ 5%, čo znižuje oxidačný stres embryí (Olexiková, 2009).

V médiu NCSU-23 sú kultivované embryá ošípanej s dodatkami glutamínu, taurínu a hypotaurínu (Strejček et al., 2007), prípadne v chemicky definovanom médiu PZM-4 (Porcine Zygote Medium) a semidefinovanom PZM-3 (doplnené o BSA) (García-Rosseló et al., 2009).

2.2.3.1 Hodnotenie a klasifikácia embryí

Hodnotením získaných embryí určujeme ich vývojové štádiá a kvalitu so zreteľom na ich morfológické charakteristiky. Embryá triedime podľa Pivka (2002) do týchto vývojových štádií:

1. Neoplodnené vajíčko (1.deň), charakterizované jednou bunkou s vylúčeným Pb v PVP a neporušenou ZP.
2. 2 až 16 buniek (2. - 5. deň), charakterizované pravidelným výskytom voľných blastomér.
3. Raná morula (5. - 6. deň), všeobecne popisovaná ako skupina buniek – voľných blastomér, ktoré sú od seba zreteľne oddelené a zaberajú väčšiu časť priestoru, ktorý vytvára ZP. Veľkosť embryí zostáva nezmenená od zygóty až po blastocystu, zväčšovanie nastáva až v štádiu expanzie raných embryí.
4. Kompaktná morula (6. deň), charakterizovaná splývaním blastomér, ktoré formujú v tomto štádiu kompaktnú masu moruly.
5. Raná blastocysta (7. deň), začína sa formovať blastocélová dutina v podobe excentricky sa formujúceho mechúrka.
6. Blastocysta (7. - 8. deň), dochádza k diferenciacii vonk. vrstvy trofoblastu od tmavšej kompaktnejšej vnút. masy buniek. Blastocélová dutina je rozšírená a PVP zúžený.
7. Expandovaná blastocysta (8. - 9. deň), charakterizovaná zväčšovaním vonk. priemeru embrya, PVP sa stráca za súčasného zužovania ZP až na 1/3 jej pôvodnej hrúbky.
8. Voľná blastocysta (9. deň), embryá vystupujú zo ZP (označované ako hatching) a ostávajú voľné, majú zreteľne diferencovaný a pravidelne utváraný trofoblast, tvoriaci sa embryoblast a vyvinutú blastocélovú dutinu.
9. Predĺžená blastocysta (9. - 10. deň) bez ZP, zvýšená proliferácia trofoblastu a premena oválneho tvaru na trubicovitý.

V roku 1983 Lindner a Wright vytvorili systém, ktorý rozdeľuje embryá do štyroch skupín: vynikajúce, dobré, dostatočné a nedostatočné embryo. Zjednodušenú verziu tohto systému vydala Medzinárodná Spoločnosť pre embryotransfer IETS (International Embryo Transfer Society):

1. Vynikajúce alebo dobré embryo – symetrické a okrúhle, blastoméry jednotnej veľkosti, sfarbenia a hustoty, s hladkou ZP. Najmenej 85 % bunkovej hmoty musí byť neporušenej, schopnej ďalšieho vývoja.

2. Dostatočné embryo – pomerne malé nezrovnalosti v celkovom tvare zárodočnej masy alebo v tvare, farbe a hustote jednotlivých buniek. Najmenej 50 % bunkovej hmoty musí byť neporušenej, schopnej ďalšieho vývoja.
3. Nedostatočné embryo – výraznejšie nezrovnalosti v celkovom tvare zárodočnej masy alebo v tvare, farbe a hustote jednotlivých buniek. Najmenej 25 % bunkovej hmoty musí byť neporušenej, schopnej ďalšieho vývoja.
4. Mŕtve alebo degenerované embryo – degenerované embryá, oocyty, neživé (Laurinčík et al., 2008).

Bovinné zygoty získané *in vitro* sú považované za citlivejšie na podmienky a manipulácie, ako zygoty získané *in vivo*. Bovinné embryá získané v podmienkach *in vitro* možno charakterizovať ako embryá so zmenenou morfológiou. Vykazujú vyšší stupeň vakuolizácie cytoplazmy blastomér, menšiu kompaktnosť buniek a viac fagozómov, ako embryá získané *in vivo*. Tieto odchýlky sú pravdepodobne zodpovedné za ich nižšiu životaschopnosť po zmrazovaní a rozmrazovaní, za zníženú úspešnosť po prenose a nižšiu vývojovú schopnosť pri ďalšej kultivácii v podmienkach *in vitro* (Pivko, 2002).

2.2.3.2 Zmrazovanie embryí a ich prenos

Dôležitou technikou dlhodobého uchovávania embryí je ich zmrazovanie (kryouchovávanie). Základom je zníženie miery poškodenia vplyvom intracelulárneho ľadu. Boli vyvinuté dve techniky: pomalé (kontrolované) zmrazovanie a rýchle zmrazovanie (vitifikácia). Zmrazovanie embryí zahŕňa: vystavenie embrya kryoprotektívu (DMSO, glycerín, metanol, glukóza, sacharóza), ochladenie pod bod mrazu, uskladnenie v tekutom dusíku (-196 °C), rozmrazenie, zriedenie, vyplavenie kryoprotektíva a prenesenie embryí (Chrenek, 2008a).

Kasai et al. (2002) uvádza šesť spôsobov poškodenia embryí počas kryouchovávania:

- intracelulárne formovanie kryštálov ľadu
- chemická toxicita kryoprotektíva
- osmotické naboptnanie
- osmotické zmrštenie
- fraktúra (prasknutie)
- extracelulárna kryštalizácia

Embryá kráv v štádiu včasnej blastocysty až expandovanej blastocysty môžeme úspešne zmrazovať. Avšak embryá včasnejších vývojových štádií nemožno zmrazovať a rozmrazovať bez ich poškodenia. Citlivosť embryí na ochladzovanie je ešte zreteľnejšia u ošípanej. Jej embryá všetkých vývojových štádií neprežívajú ochladenie pod 15 °C (Pivko et al., 2000).

Pre účely zmrazovania sa používajú embryá vynikajúcej kvality bez morfológických zmien, s kompaktnými blastomérmi. Embryá sa pred zmrazovaním kultivujú v inkubačnom médiu, potom sa prenesú do zmrazovacieho média. Dôležité je, aby teplota zmrazovacieho média bola rovnaká ako teplota inkubačného. Počas ekvilibračnej doby (15 - 20 min.) sa embryá premývajú v zmrazovacom médiu o rôznej koncentrácii. Na konci sa plnia do označených pejet (Chrenek, 2008a).

Pri metóde pomalého zmrazovania dochádza k vnútrobunkovej tvorbe kryštálikov ľadu, čo môže spôsobiť značné morfológické a funkčné poruchy a ovplyvniť životaschopnosť embryí. Až 50 % embryí môže byť poškodených fyzikálne, pričom časté býva poškodenie najmä ZP. Technikou rýchleho zmrazovania (vitifikácia) je fyzikálne poškodenie nižšie, čo vo svojich experimentoch potvrdili aj Pivko et al. (2008).

Predtým, ako sú embryá prenesené do recipientky je potrebné klásť dôraz na ich dôkladné premývanie, z dôvodu odstránenia väčšiny patogénov. Počas premývania sa odporúča kombinovať ho s trypsínom. Embryá 5x premývame v PBS, ktorý obsahuje antibiotiká a 0,4% BSA. Následne sú 2x premyté po dobu 60 - 80 s v trypsíne (pH 7,6 - 7,8). Sterilný trypsín v Hanksovom vybalansovanom roztoku sa používa s koncentráciou 0,25%. Po ovplyvnení trypsínom embryá znovu premývame 5x v PBS s obsahom antibiotík a 2 % séra. Nahradenie BSA sérom je dôležité z hľadiska inaktivácie trypsínu (Pivko et al., 2004).

Prenosom embryí sa sledujú základné ciele ako genetické zlepšenie chovov využitím vlastných darkýň vysokej genetickej hodnoty, viacnásobné využitie najlepších potenciálnych matiek plemenných býkov, rozmnožovanie importovaných plemien so špičkovým genotypom a vytvorenie banky embryí autochtónnych plemien. Nemalou mierou prispieva k rýchlejšiemu poznaniu základných dejov v reprodukcii, ako aj procesov ranej embryogenézy a fenogenetiky reprodukcie (Pivko et al., 2000).

Chirurgický prenos sa robí viacerými spôsobmi, či už na ležiacom zvierati, stojacom zvierati alebo transvaginálnou cestou. V súčasnosti je tento proces nahradzovaný nechirurgickým, ktorý menej traumatizuje zviera a nevyžaduje drahé chirurgické vybavenie. Postup pri nechirurgickom prenose je veľmi podobný ako pri inseminácii. Aplikuje sa epidurálna anestéza alebo uterusrelaxans. Po očistení a dezinfekcii vonk. pohlavných orgánov sa do pošvy zavádza špeciálne zariadenie typu „Cassou gun“, „Hannover“ alebo inseminačný katéter Quicklock firmy Minitüb tak, aby bolo zabránené kontaminácii. Embryá v pejetkách sú umiestnené tak, aby medzi každým bola vzduchová bublina (zabránenie neželanému pohybu). Úspešnosť nechirurgického prenosu závisí nielen na kvalite prenášaného embrya, ale aj od dĺžky trvania celého procesu, z dôvodu čo najmenej traumatizácie kľčku maternice a endometrie (Laurinčík et al., 2005).

Najlepšie výsledky sa dosahujú pri prenose čerstvých raných embryí, zatriedených do prvej a druhej triedy kvality, pri zmrazených embryách sa odporúča iba prenos embryí zaradených do prvej triedy kvality (Pivko et al., 2008).

Embryá sú prenášané do vajcovodu alebo maternice, v závislosti od ich vývojového štádia. V štádiu zygoty až po 8-16-bunkové embryo sa prenášajú do vajcovodu samice, vyššie vývojové štádiá do rohu maternice hormonálne pripravenej recipientky (Chrenek, 2008a).

2.3 Genetické mikromanipulácie

2.3.1 Klonovanie

Klonovanie predstavuje tvorbu geneticky identických jedincov. Pri vyšších druhoch živočíchov, vrátane človeka, predstavujú náhodne vzniknuté klony identické jednovaječné dvojčičky. Klón nemusí byť identický s donorom (darcom) genetického materiálu, pretože: 1.) DNA je lokalizovaná nielen v jadre bunky, ale aj v mitochondriách a tým sa prenáša prostredníctvom oocyty; 2.) DNA dospelšej bunky sa môže líšiť od zárodočnej DNA, napr. vplyvom mutácií; 3.) aj jednovaječné dvojčičky sú identické len po genetickej stránke, ich fenotypový prejav môže byť vplyvom prostredia rôzny (Laurinčík et al., 2005).

Rozoznávame tri techniky tvorby klonovaných jedincov:

- a) tvorba identických jedincov bisekciou,
- b) tvorba identických jedincov prenosom jadier embryonálnych buniek (EC),
- c) tvorba identických jedincov prenosom jadier somatických buniek – somatický nukleárny transfer (SCNT).

Stručný prehľad prvých klonovaných druhov, s uvedením techniky a typu bunky, (Chrenek, 2008b):

- 1979 klonovaný cicavec - bisekcia embrya
- 1986 klonovaný cicavec - prenos jadra embryonálnej bunky
- 1997 klonovaný cicavec (ovca) - jadro somatickej bunky z mliečnej žľazy
- 1998 klonovaná myš - jadro somatickej bunky (leukocyt)
- 1998 klonované transgénne teľatá - jadro transfektovaných fibroblastov
- 2000 klonované prasa - jadro fibroblastov svalu a kože plodu
- 2002 klonované králiky - jadro kumulárnej bunky
- 2003 klonované potkany - jadro somatickej bunky
- 2003 klonovaný kôň, jadro somatickej bunky
- 2005 klonované ľudské embryo
- 2006 chimerické klonované králiky
- 2007 hybridné klonované embryá (oocyt kravy a ľudská DNA, oocyt králika a ľudská DNA)

Tvorba identických jedincov bisekciou predstavuje najjednoduchšiu techniku, rozdelením embrya v štádiu moruly alebo blastocysty na dve polovice mikronožom. Výsledkom prenosu takto získaných embryí do recipientky je narodenie geneticky identických jedincov (klonov). Pokusy získať z jedného vajíčka viac ako tri klony boli neúspešné (Chrenek, 2008a).

Na prenose jadier včasných embryí (z ich blastomér) do enukleovaného oocytu (zbaveného samičieho genetického materiálu) je výhodné to, že z jedného embrya, napr. moruly máme k dispozícii 32 blastomér, z ktorých každé jadro obsahuje kompletnú genetickú informáciu. Teoreticky prenesením jadra do recipientky je možné získať 32 geneticky identických jedincov – klonov (Laurinčík et al., 2005).

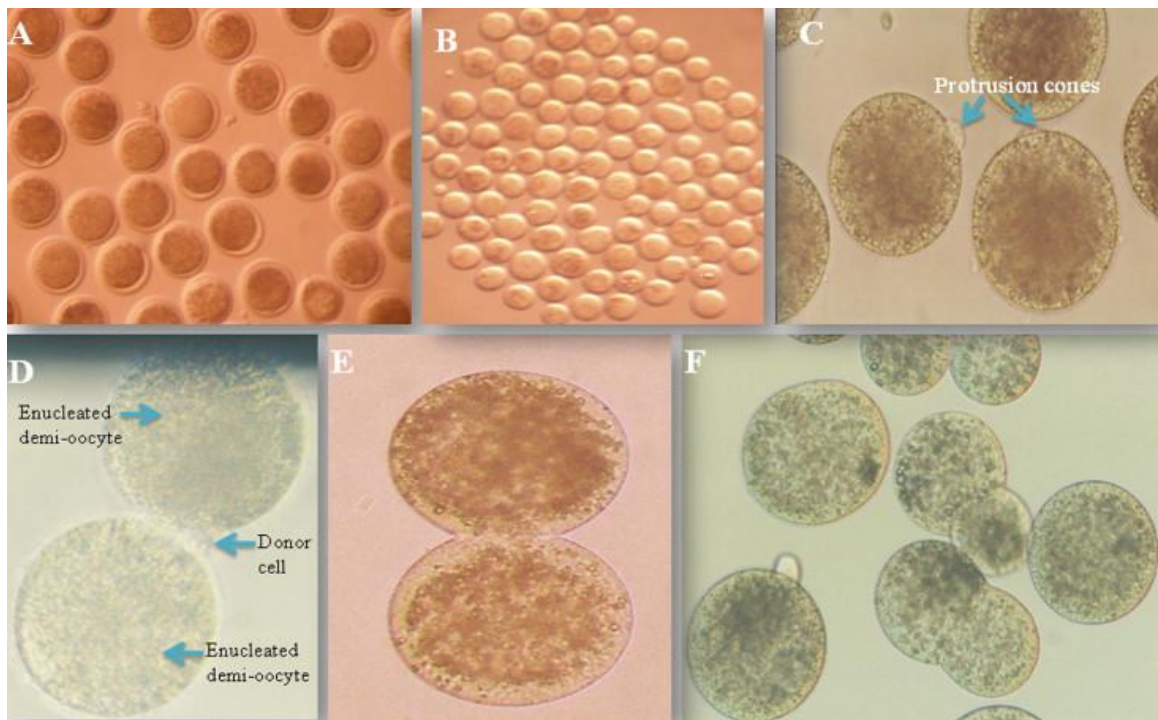
Prelomovým úspechom bolo vyklonovanie ovce Dolly (1997) metódou SCNT, a to prenosom jadra z diferencovanej somatickej bunky (z mliečnej žľazy) do enukleovaného oocyту. V porovnaní s EC somatická bunka diferencovaná, a preto jej jadro musí byť reprogramované (vrátené na začiatok vývinu) (Petrovičová, 2010).

Jedným z kľúčových faktorov úspešného priebehu klonovania je synchronizácia medzi bunkovým cyklom donorského jadra a cytoplazmou recipienta. Použitie jadra v G0/G1 fáze a štádiu MII oocyту sa ukázalo ako najlepšie, pretože použitie iných štádií bunkového cyklu jadra obvykle vedie k slabému vývoju zárodku (Gerger et al., 2010). V G1 fáze je bunka najlepšie pripravená na reprogramovanie a rozdelenie jadra. Takéto jadro prenesené do enukleovaného oocyту má kompletnú sadu chromozómov, čo je najlepší predpoklad na začatie delenia klonovaného embrya (Chrenek, 2008a).

Vývojové štádium jadier buniek môžeme ovplyvniť kultiváciou *in vitro* v médiu s ubúdajúcou koncentráciou kultivačného séra (serum starvation) alebo technikou súvislej monovrstvy, prípadne použitím chemikálií ako nocadazol, aphidicolin, butyrolactone I (Laurinčík et al., 2005).

Enukleácia oocyту je proces, pri ktorom sa neodstráni celé jadro, ale len metafázová platnička a prvé Pb. Využíva sa viacero techník vizualizácie ako farbenie chromatínu fluorescenčnými farbami a expozícia pod UV lampou. Metóda aspirácie časti jadra v blízkosti vylúčeného Pb má nevýhody v schopnosti Pb migrovať v PVP, takže nemusí dôjsť k odstráneniu chromatínu. Problémom je taktiež odstránenie väčšej časti cytoplazmy oocyту, čím sa môže zredukovať jej kapacita nevyhnutná pre epigenetické reprogramovanie prenášaného jadra (Petrovičová, 2010).

Ďalším spôsobom je použitie techniky bez mikromanipulátora - handmade cloning (HMC), ktorá spočíva v bisekcii časti oocyту (bez ZP), pričom sa oddelí metafázová platnička II s Pb (Laurinčík et al., 2005). Následne sú oocyty bez metafázovej platničky spojené fytohemaglutinínom (PHA) a fúzované spolu s darcovskou bunkou. Touto technikou sa môže zvýšiť produkcia blastocýst, je jednoduchšia a náklady na prístrojové vybavenie sú nižšie. Nevýhoda spočíva v strate väčšej časti cytoplazmy z oocyту, čo sa rieši použitím dvoch cytoplástov, medzi ktoré sa vloží jeden karyoplast (Petrovičová, 2010).



Obrázok 10 HMC kozích oocytov: A) oocyty po odstránení granulóznych buniek, B) oocyty bez ZP, C) vykľutie cytoplazmy, D) zoskupenie donorskej somatickej bunky a dvoch enukleovaných demi-oocytov, E) fúzia po 2 minútach elektrických impulzov, F) po 20 minútach., Akshey et al. (2011).

Aktivácia predstavuje naštartovanie vývinu embrya, pričom je dôležité jej načasovanie: 1. preaktivácia - aktivácia pred samotnou fúziou jadra s cytoplasmom (embryonálne bunky) 2. bezprostredná aktivácia v čase fúzi, alebo tesne po nej (embryonálne bunky) 3. oneskorená aktivácia – aktivácia v presne určenom čase po fúzii (somatické bunky). Realizovaná je najčastejšie kombináciou ionomycínu alebo kalciovej ionoforézy s 6-dimetylaminopurínom (6-DAMP), prípadne cykloheximidom (CHX). Ionomycín prednostne mobilizuje intracelulárne zásoby Ca^{2+} . Vápnik inaktivuje CSF supresorovú aktivitu MPF a následnou aplikáciou 6-DAMP alebo CHX zabraňuje reformácii aktivity MPF (Petrovičová, 2010).

Klonovanie hospodárskych zvierat prenosom jadra darcovskej bunky vytvára podmienky jednak pre tvorbu identických kópii zvierat, ale umožňuje aj cielejšiu zmenu genetickej informácie v populácii zvierat. Ďalšie snahy o využitie klonovania embryí smerujú k zachovaniu ohrozených či vyhynutých živočíchov (Macák et al., 2003).

Vo vyhlásení EFSA (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín) zo septembra 2010 o vedeckom posúdení klonovania sa uvádza:

„Klon má ako genetická kópia svojho bunkového darcu podobný potenciál úžitkových vlastností. Je potrebné zdôrazniť, že v rámci súčasných výberových posunov sa okrem kvantitatívnych/kvalitatívnych vlastností zvieracích produktov zohľadňujú ďalšie relevantné parametre, medzi ktoré patrí odolnosť voči bežným patológiám (napr. mastitíde, iným infekčným a parazitickým chorobám), plodnosť, psychický stav a ďalšie parametre, ktoré súvisia s celkovým dobrým zdravotným stavom zvieratá. Vyšľachtenie takýchto komplexných vlastností na základe využitia tradičných výberových postupov je časovo náročné, môže byť zložité z úspech nie je zaručený. Klonovanie by pomohlo rýchlejšie riešiť tieto dôležité otázky.“ (http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/20101019_report_ec_cloning_sk.pdf, 29.3.2011).

Tabuľka 4 Efektivita tvorby klonovaných jedincov prenosom jadra somatickej bunky (Chrenek, Makarevič, 2009)

Druh	Úspešnosť tvorby klonovaných	Úspešnosť narodených klonovaných	Životaschopnosť klonovaných jedincov (%)	Efektivita klonovania (%)
králik	64	10	66	0,3
ošípaná	9,5	20	80	0,5
koza	27	20	85	5,2
ovca	25	20	36	3,0
hov. dobytok	29	29	64	1,5

2.3.2 Transgénne živočíchy

Transgénne živočíchy poskytujú široké možnosti využitia, najmä získaním nových teoretických poznatkov a ich praktickým použitím. Technológia transgenézy je neoceniteľným zdrojom pre analýzu regulačných vlastností génov, génovú terapiu a pri modelovaní chorôb ľudí na zvieratách. Využitie transgénnych jedincov

v poľnohospodárstve sa orientuje na zlepšenie ich reprodukčných vlastností, kvality mlieka a mäsa, rezistenciu voči chorobám. (Wall, 1996).

Dôležitý je aj význam transgénnych jedincov vo farmaceutickom priemysle. Živočíchy ako „bioreaktory“ sa využívajú na produkciu biologicky aktívnych látok, predovšetkým humánnych liečiv (laktoferín, hemoglobín, faktor zrážania VIII a IX, proteín a iné) a tieto sa získavajú z ich mlieka. Alternatívou je použitie obličiek alebo močového mechúra, čo by umožnilo produkovať tieto látky po celý život u oboch pohlaví (Dunn et al., 2005).

Pri tvorbe transgénnych jedincov ide o prenos úseku cudzej DNA do genómu jedinca (knock in) alebo o vyblokovanie cieľného úseku DNA (knock out). Transgénny jedinec je charakteristický tým, že má vo svojom genóme integrovaný cudzí gén s následnou expresiou (fenotypovým prejavom) a je schopný tento gén prenášať na potomstvo (Bauerová et al., 2008).

Gén môže byť navrhnutý tak, aby bol vnesený náhodne do genómu hostiteľskej bunky, alebo aby bol vložený do genómu na presne určenú pozíciu daného chromozómu (homologická rekombinácia) (Chaible et al., 2010).

Techniky na zavedenie cudzej DNA do hostiteľskej bunky:

- Vápenato-fosfátová transfekcia – metódu popísal Graham a Van der Eb v roku 1973. DNA naviazaná na ióny Ca sa endocytózou dostáva do bunky (jadra). Táto metóda je jednoduchá, ale neefektívna, hlavne preto, že veľká časť DNA je degradovaná v rámci endozómu.
- Elektroporácia – popísaná Neumanom a kol. v roku 1982. Princíp tejto techniky spočíva v použití silného elektrického prúdu, ktorý narúša fosfolipidovú membránu bunky a otvára tak štrbiny pre prechod DNA. Ide o najviac účinnú metódu.
- Lipozómy – sú schopné ľahko prechádzať bunkovou membránou. Ide o najjednoduchšiu metódu, nevyžaduje zvláštne vybavenie, ale je menej účinná ako elektroporácia.
- Mikroinjekcia – je najviac používanou technikou, pri ktorej sa cudzia DNA priamo injektuje do bunkového jadra (100 % úspešnosť). Nevýhodou je, že

vyžaduje špeciálne zariadenia a vysokokvalifikovaných pracovníkov. Úspešnosť zabudovania cudzej DNA do genómu hostiteľskej bunky je 4-8%.

- Vírusové vektory – DNA sa zavádza do genómu vírusových častíc schopných infikovať bunku. Vyžívajú sa napr. Simian vírus 40 (SV40), retrovírusy a lentivírusy (Chaible et al., 2010).

Vo všeobecnosti môžeme prenos génov uskutočniť:

- do gonád (pohlavných orgánov)
- do gamét (oocyty, spermie)
- do oplodneného vajíčka (embrya)

Prenos génov do gonád:

Prenos génov je možné realizovať injekciou priamo do gonád, kde sa nachádzajú prekurzory pohlavných buniek, využitím retrovirálnych vektorov alebo lipozómov. Retrovirálne vektory injektované do semenníkov vtákov umožnili integrovať sa cudzej DNA do spermatozoidov, avšak expresia daného génu bola minimálna (Bauerová et al., 2008).

Prenos génov do gamét:

a) do oocytov

Prenos DNA pomocou mikroinjekcie do ooplazmy alebo GV oocytov je málo úspešnou metódou. Na zabudovanie cudzieho génu do genómu hostiteľa je potrebné, aby táto DNA bola prítomná v momente replikácie genómu (krátko po oplodnení). Cudzia DNA má však všetky predpoklady degradácie, hlavne pred indukciou replikácie embryonálnej DNA (Laurinčík et al., 2005).

b) prenos spermiami

V roku 1971 Breckett a kolektív pracovníkov ako prví demonštrovali, že cicavčie spermie majú schopnosť viazať exogénnu DNA. Experimenty na myšiach naznačili, že väzba DNA na kapacitovanú spermium by mohla byť využitá na zavedenie cudzej DNA do oocytu pri oplodnení. Použitie spermii (Sperm mediated gene transfer - SMGT) a následné oplodnenie metódou ICSI zaznamenalo väčší úspech len u ošípanej. Na zvýšenie

úspešnosti sa testujú možnosti využitia lipozómov, restriktčných endonukleáz, elektroporácie a protilátok (Robl et al., 2007).

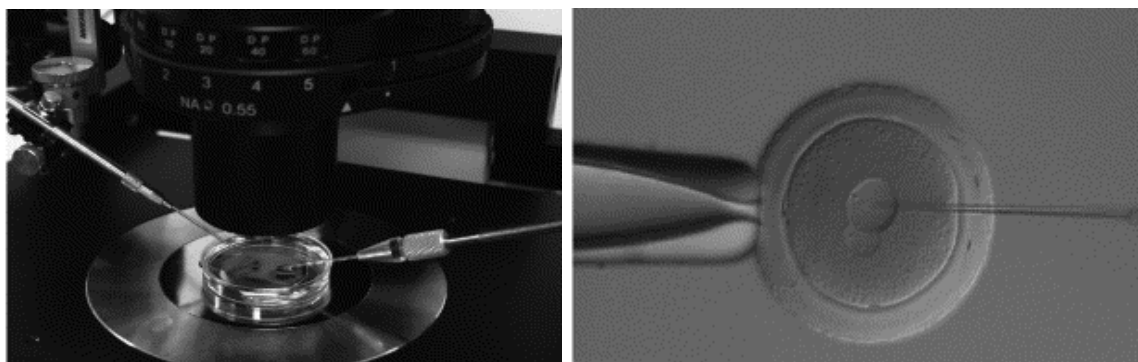
Prenos génov do oplodneného vajíčka (embrya) možno uskutočniť:

- a) mikroinjekciou cudzej DNA do prvojadra oplodneného vajíčka,
- b) mikroinjekciou cudzej DNA do obidvoch prvojadier oplodneného vajíčka,
- c) prenosom s použitím retrovírusov alebo adenovírusov.

Mikroinjekcia cudzej DNA do prvojadra oplodneného vajíčka

Táto metóda je v súčasnosti najviac rozpracovaná. Jan Gordon v roku 1980 preukázal, že exogénna DNA môže byť zavedená do genómu injektážou roztoku cudzej DNA. Do prvojadra oocyty sa zavádza 1 - 2 pl tohto roztoku (cca 200 molekúl DNA) (Smith, 2002).

Pri mikroinjekcii realizovanej použitím automatického mikroinjektora a mikroskopu sa vajíčka fixujú pomocou fixačnej pipety a mikroinjekčnou ihlou sa do nich injektuje DNA. Po krátkej (2 - 4 hod.), prípadne dlhšej (1 - 4 dni) kultivácii v podmienkach *in vitro* sú embryá prenášané do vajcovodu alebo maternice hormonálne pripravených samíc. Úspešnosť narodených jedincov sa pohybuje okolo 15 - 25 % s 1,5 - 10 % úspešnosťou integrácie génu, ktorá u vyšších zvierat je ešte nižšia (do 1%) ako u laboratórnych zvierat (Bauerová et al., 2008).



Obrázok 11 Mikroinjekcia cudzej DNA do samčieho prvojadra králičieho embrya (Fan and Watanabe, 2003)

Mikroinjekcia cudzej DNA do obidvoch prvojadier oplodneného vajíčka

Táto metóda je založená na podobnom princípe ako predchádzajúca. V prípade mikroinjekcie cudzej DNA do obidvoch prvojadier sa predpokladá väčšia degradácia embryí. Experimentálne skúmanie však preukázalo, že to tak nie je. Úspešnosť tejto metódy bola o 30 % vyššia (Laurinčík et al., 2005).

Prenos cudzej DNA použitím retrovírusov alebo adenovírusov

Podmienkou je zbavenie vírusových vektorov ich vlastných génov, ktoré im umožňujú replikáciu a limitujúcim faktorom je dĺžka génovej konštrukcie (max. 10 kb) (Bauerová et al., 2008).

Retrovírusy je možné použiť v prípade génovej terapie a pre produkciu transgénnych vtákov. Hneď po infekcii retrovírus produkuje DNA kópie pomocou enzýmu reverzná transkriptáza. DNA kópie vírusového genómu alebo provírus sa integrujú do genómu hostiteľskej bunky. Pri prenose do embryí cicavcov sa zvyšuje percento mozaicizmu, keďže nie sú schopné dokonalej infekcie embryí do 4-bunkového štádia (Dunn et al., 2005).

Adenovírusy sú schopné infikovať širokú škálu buniek, vrátane tých, ktoré sa nedelia. Sú schopné niesť veľké transgény (až cca 38 kb) bez toho, aby bola narušená ich infekčnosť (Smith, 2002).

Transgénne králiky predstavujú vhodný model pre štúdium humánnych chorôb ako napr. problémy s metabolizmom lipidov, arterioskleróza, hypertrofická kardiopatia a iné. Súčasne výskum potvrdil, že sú vhodným bioreaktorom pre produkciu rekombinantných proteínov pre experimentálne i komerčné účely. Limitujúcim faktorom je nízka úspešnosť produkcie takýchto živočíchov. Autori uvádzajú, že počas ich pokusov *in vitro* 89 % králičích embryí po jednoduchej mikroinjekcii génu dosiahlo štádium blastocysty, pričom u 38 % sa dokázala prítomnosť sledovaného génu. Avšak v pokusoch *in vivo* sa narodilo iba 26 % mláďat z prenesených embryí a prítomnosť génu sa dokázala iba v 3,3 % (pri dvojitej mikroinjekcii 4,1 %) (Súvegova et al., 2006).

Použitie embryonálnych kmeňových buniek a tvorba chimér

Medzi živočíšne bunky, cielene geneticky modifikované, patria aj embryonálne kmeňové bunky (embryonic stem cells – ESC). ESC izolované z vnútornej bunkovej masy (inner cell mass – ICM) sa označujú ako pluripotentné a sú schopné udržať sa v podmienkach *in vitro* v nediferencovanom stave. Môžu kolonizovať hostiteľské embryo, čo vedie k tvorbe chimér (Dunn et al, 2005).

Ako chiméra je označovaný jedinec pozostávajúci z dvoch alebo viacerých geneticky rozdielnych populácií buniek. Fenotypovým prejavom chimerizmu môže byť mozaikové zastúpenie rôznych populácií buniek v tkanivách. Percentuálna úspešnosť závisí hlavne od typu buniek, ale aj od použitej techniky (Bauerová et al., 2008).

Pluripotentné embryonálne bunky sú udržiavané v kultúre *in vitro*. Po zavedení cudzej DNA pomocou elektroporácie, mikroinjekcie, transfekcie alebo prostredníctvom retrovírusov sú embryonálne bunky injektované do blastocélovej dutiny hostiteľskej blastocysty alebo inkubované spolu so skoršími štádiami embryí (myš) a následne transferované do recipientky pre ďalší vývoj (Dunn et al., 2005).

Klonovanie zvierat na Slovensku zaznamenalo prvé úspechy vďaka intenzívnej spolupráci so zahraničnými pracoviskami (INRA Jouy-en-Josas, Francúzsko). Výsledkom bolo narodenie troch chimerických klonovaných králikov po prenose jadier somatických buniek (Chrenek, Makarevič, 2009).



Obrázok 12 Chimerický klonovaný králik (Chrenek, Makarevič, 2009)

Záver

V bakalárskej práci „Produkcia embryí *in vitro*“ sme sa zamerali na zhromaždenie a preštudovanie dostupnej literatúry týkajúcej sa tejto problematiky.

Popisujeme proces gametogenézy samčích a samičích pohlavných buniek, oplodnenia, vývoja prvojadier a jednotlivých embryonálnych fáz. V neposlednom rade sa venujeme aj hormonálnej stimulácii týchto procesov.

Samotná produkcia embryí *in vitro* v sebe zahŕňa ukončenie troch biologických procesov: *in vitro* maturáciu, *in vitro* oplodnenie a *in vitro* kultiváciu. Pochopenie základných mechanizmov týchto procesov vedie k zvýšeniu efektivity IVP.

Na úspešnosť maturácie oocytov vplýva najmä kvalita kultivačného média, jeho zloženie, optimálny čas maturácie, teplota, pH a taktiež atmosféra kultivácie. Ďalej sa zameriavame na metódu ICSI, ktorá je významnou technikou v oblasti asistovanej reprodukcie. Na jej úspešnosť vplýva najmä životaschopnosť spermíí. V súčasnosti analýza spermíí počítačom CASA je kľúčovým nástrojom pre stanovenie ich kvality.

In vitro kultivácia embryí si vyžaduje špecifické nároky na kultivačný systém, vzhľadom na dlhodobý pobyt embryí v kultúre pred ich transferom, či kryokonzerváciou. Hodnotením získaných embryí určujeme ich vývojové štádiá a kvalitu so zreteľom na ich morfológické charakteristiky. Takto získané embryá prenášame do hormonálne pripravených samíc, prípadne ich uskladňujeme. Kryokonzervácia je dôležitou technikou dlhodobého uchovávanía embryí, základom ktorej je zníženie miery poškodenia vplyvom intracelulárneho ľadu.

V poslednej časti bakalárskej práce sa venujeme genetickým mikromanipuláciám, a to klonovaniu, produkcii transgénnych zvierat a ich využitiu.

Rozpracovaním nových biotechnologických postupov dochádza k intenzívnejšiemu využitiu pohlavných buniek a zvyšovanie reprodukčného potenciálu živočíchov. Dôležité je zvyšovať si úroveň poznania o procesoch dozrievania oocytov, oplodnenia a raného embryonálneho vývoja. Toto všetko nám umožňuje lepšie pochopiť a prepracovať metódy či už superovulácie, kultivácie, oplodnenia *in vitro*, mikromanipulácií s embryami a pod.

Zoznam použitej literatúry

- AKSHEY, Y. S. - MALAKAR, D. - KUMAR DE, A. - KUMAR, JENA, M. - KUMAR PAWAR, S. - DUTTA, R. - SAHU, S. 2011: Effect of roscovitine treated donor cells and different activation methods on development of handmade cloned goat (*Capra hircus*) embryos. In *Theriogenology* 75, 2011, p. 1516-1524.
- ANTAL, J. - MARAČEK, I. - HALAGAN, J. 2005. Dominantné preovulačné a atretické terciárne folikuly vaječníkov oviec po asistovanom estre a ovulácii. In *VI. Celoslovenský seminár fyziológie živočíchov*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. ISBN 80-8069-526-1, p. 1-4.
- BAUEROVÁ, M. - BAUER, M. - OMELKA, R. - MICHALÍK, I. - CHRENEK, P. - HRUBÍKOVÁ, K. - UHRÍN, P. 2008. *Metódy analýzy génov a genómov*. Nitra : Fakulta prírodných vied UKF, 2008. 197 p. ISBN 80-224-0834-4.
- CAMARGO, L.S.A. - VIANA, J.H.M. - SÁ, W.F. - FERREIRA, A.M. - RAMOS, A.A. - VALE FILHO, V.R. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. In *Animal Reproduction* 3, 2006, p. 19-28.
- DAS, G.K. - JAIN, G.C. - SOLANKI, V.S. - TRIPATHI, V.N. 1996. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. In *Theriogenology* 46, 1996, p. 1403-1411.
- DUNN, D.A. - PINKERT, C.A. - KOOYMAN, D.L. 2005. Foundation Review: Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. In *Drug Discovery Today* 10, 2005, p. 757-767.
- ELVIN, J.A. - YAN, C. - WANG, P. - NISHIMORI, K. - MATZUK, M.M. 1999. Molecular Characterization of the Follicle Defects in the Growth Differentiation Factor 9-Deficient Ovary. In *Molecular Endocrinology* 13, 1999, p. 1018-1034.
- FAN, J. - WATANABE, T. 2003. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. In *Pharmacology and Therapeutics* 99, 2003, p. 261-282.
- GANDHI, A.P. - LANE, M. - GARDNER, D.K. - KRISHER, R.L. 1999. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. In *Human Reproduction* 15, 1999, p. 395-401.

- GARCÍA-ROSELLÓ, E. - GARCÍA-MENGUAL, E. - COY, P. - ALFONSO, J. - SILVESTRE, M.A. 2009. Intracytoplasmatic Sperm Injection in Livestock Species: An update. In *Reproduction in Domestic Animals* 44, 2009, p. 143-151.
- GERGER, R.P. - RIBEIRO, E.S. - FORELL, F. - BERTOLINI, L.R. - RODRIGUES, J.L. - AMBRÓSIO, C.E. - MIGLINO, M.A. - MEZZALIRA, A. - BERTOLINI, M. 2010. In vitro development of cloned embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. In *Genetics and Molecular Research* 9, 2010, p. 295-302.
- HASLER, J.F. 2000. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. In *Animal Reproduction Science* 60-61, 2000, p. 81-91.
- HELL, P. - SLAMEČKA, J. - SOMMER, A. 2006. *Fyziológia a výživa zveri*. Zvolen : Technická univerzita, 2006. 139 p. ISBN 80-228-1583-7.
- HINRICHS, K. - CHOI, Y. H. 2005. Assisted Reproductive Techniques in the Horse. In *Clinical Techniques in Equine Practice* 4, 2005, p. 210-218.
- <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap12.htm> [citované 2011-03-02].
- HYTTEL, P. - SINOWATZ, F. - VEJLSTED, M. - BETTERIDGE, 2010. *Essentials of Domestic animal embryology*. Edinburgh : Saunders, 2010. 455 p. ISBN 978-0-7020-2899-1.
- CHAIBLE, L.M. - CORAT, M.A. - ABDELHAY, E. - DAGLI, M.L.Z. 2010. Genetically modified animals for use in research and biotechnology. In *Genetics and Molecular Research* 9, 2010, p. 1469-1482.
- CHENG, X. - DEN, Z. - KOCH, P.J. 2005. Desmosomal cell adhesion in mammalian development. In *European Journal of Cell Biology* 84, 2005, p. 215-223.
- CHRENEK, P. - MAKAREVIČ , A.V. 2009. *Význam tvorby klonovaných jedincov* [online]. [citované 2011-03-04]. Dostupné na internete: <http://www.agroporadenstvo.sk/zv/ostatne/klonovanie.htm>.
- CHRENEK, P. 2008a. *Genetické manipulácie s embryami*. Nitra : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, 2008. 98 p. ISBN 978-80-88872-79-5.

- CHRENEK, P. 2008b. *Odborná správa k problematike klonovania* [online]. [citované 2011-03-27]. Dostupné na internete: <http://www.mpsr.sk/sk/index.php?navID=1&id=1194>.
- IKAWA, M. - INOUE, N. - BENHAM, A.M. - OKABE, M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. In *The Journal of Clinical Investigation* 120, 2010, p. 984-994.
- KANE, M.T. 2003. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. In *Theriogenology* 79, 2003, p. 171-190.
- KASAI, M. - ITO, K. - EDASHINE, K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. In *Human Reproduction* 17, 2002, p. 1863-1874.
- KIDDER, G.M. - VANDERHYDEN, B.C. 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, 2010, p. 399-413.
- KIKUCHI, K. - KASHIWAZAKI, N. - NAGAI, T. - NAKAI, M. - SOMFAI, T. - NOGUCHI, J. - KANEKO, H. 2008. Selected Aspects of Advanced Porcine Reproductive Technology. In *Reproduction in Domestic Animals* 43, 2008, p. 401-406.
- KUBOVIČOVÁ, E. 2002. *Produkcia embryí in vitro : záverečná správa za etapu 02*. Nitra : Výskumný ústav živočíšnej výroby, 2002. p. 1-60.
- KULÍŠEK, V. et al. 1996. *Cytológia, histológia a embryológia*. druhé doplnené vydanie. Nitra : Vysoká škola poľnohospodárstva, 1996. p. 162. ISBN 80-7137-334-6.
- LAURINČÍK, J. – CHRENEK, P. – CHRISTIANSEN, S.B. – GAMBORG, CH. – LUCK, M.R. – HYTTEL, P.M. – MAKAREVICH, A.V. – NIEMANN, H. – PETROVIČOVÁ, I. – RASMUSSEN, M.A. – SANDOE, P. – SCHAUSER, K. – STREJČEK, F. – ŠVARCOVÁ, O. – VAJTA, G. – WOLF, X.A. 2008. *Animal Biotechnology*. Bratislava : ŠEVT a.s., 2008. 174 p. ISBN 978-80-8094-641-2.
- LAURINČÍK, J. - CHRENEK, P. - PETROVIČOVÁ, I. - STREJČEK, F. - ŠVARCOVÁ, O. - TRANDŽÍK, J. 2005. *Biotechnológie živočíchov*. [CD-ROM]. Nitra: Fakulta prírodných vied UKF, 2005, ISBN 80-8050-860-7. 169 p.

- LUKÁČ, N. - BULLA, J. - CIGÁNKOVÁ, V. - FLEŠÁROVÁ, S. - KOVÁČIK, J. - MASSÁNYI, P. - NAĎ, P. - SKALICKÁ, M. - STAWARZ, R. - TOMAN, R. - TRANDŽÍK, J. 2007. *Stopové prvky a kvalita spermií*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007. 118 p. ISBN 978-80-8069-904-8.
- MACÁK, V. - NOVOTNÝ, F. - HAJURKA, J. - LAZAR, G. - HURA, V. - VALOCKÝ, I. - ŠŤAVOVÁ, Ľ. - VALENČÁKOVÁ, A. 2003. Klonovanie embryí. In *InfoVet*. ISSN 1335-1907, 2003, roč. 10, č. 5, p. 30-34.
- MAKAREVIČ, A.V. - PIVKO, J. - KUBOVIČOVÁ, E. - SIMON, M. 2009. Nový pohľad na hodnotenie fertilizačnej schopnosti spermií cicavcov. In *InfoVet*. ISSN 1335-1907, 2009, roč. 16, č. 2, p. 98-105.
- MARETTA, M. 2000. *Veterinárna embryológia*. Košice : Univerzita veterinárskeho lekárstva, 2000. 255 p. ISBN 80-88985-28-5.
- MASSANYI, L. 1991. *Funkčná morfológia spermie*. Bratislava : VEDA, 1991. 196 p. ISBN 80-224-0149-8.
- MAULIA, R. 2009. *Gametogenesis*. [online]. [citované 2011-03-22]. Dostupné na internete: <http://rizkamaster.blogspot.com/2009/03/catatan-embriog-samain-yu.html>.
- McLACHLAN, R.I. - O'DONNELL, L. - MEACHEM, S.J. - STANTON, P.G. - de KRETSEN, D.M. - PRATIS, K. - ROBERTSON, D.M. 2002. Identification of Specific Sites of Hormonal Regulation Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man. In *Recent progress in Hormone research* 57, 2002, p. 149-179.
- MIHOLOVÁ, B. - LIPSKÝ, D. 1994. *Anatómia a fyziológia hospodárskych zvierat*. IV. vydanie. Bratislava : PRÍRODA a.s., 1994. 416 p. ISBN 80-07-00648-6.
- MOROZUMI, K. - YANAGIMACHI, R. 2005. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. In *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 102, 2005, p. 14209-14214.
- MORRELL, J.M. - RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2011. Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. In *Veterinary Medicine International* 2011, 2011, p. 1-9.

- NORBERT, L. - MASSÁNYI, P. - BULLA, J. 2006. Nové technológie v hodnotení kvality ejakulátu. In *InfoVet*. ISSN 1335-1907, 2006, roč. 13, č. 3, p.129-130.
- OH, S.A. - PARK, Y.J. - YOU, Y.A. - MOHAMED, E.A. - PANG, M.G. 2010. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. In *Animal Reproduction Science* 121, 2010, p. 131-138.
- OLEXIKOVÁ, L. - KUBOVIČOVÁ, E. - MAKAREVIČ, A. - PIVKO, J. - POPELKOVÁ, M. 2009. Vplyv systému kultivácie na úspešnosť produkcie bovinných embryí in vitro. In *Acta fytotechnica and zootechnica*. ISSN 1335-258X, 2009, roč. 12, č. 3, p. 68-71.
- PARK, C.Y. - UHM, S.J. - SONG, S.J. - KIM, K.S. - HONG, S.B. - CHUNG, K.S. - PARK, CH. - LEE, H.T. 2005. Increase of ICSI efficiency with hyaluronic acid binding sperm for low aneuploidy frequency in pig. In *Theriogenology* 64, 2005, p. 1158-1169.
- PETROVIČOVÁ, I. 2010. *Somatický nukleárny transfer*. Nitra : Fakulta prírodných vied UKF, 2010. 79 p. ISBN 978-80-8094711-8.
- PIVKO, J. - GRAFENAU, P. - SOKOL, J. 2000. *Prenos raných embryí zvierat*. Nitra : Garmond, 2000. p. 212. ISBN 80-7148-038-X.
- PIVKO, J. - KUBOVIČOVÁ, E. - MAKAREVIČ, A.V. - OLEXÍKOVÁ, L. - RIHA, Ľ. 2008. Možnosti zníženia rizika infekcie premývania embryí zvierat pred ich prenosom. In *InfoVet*. ISSN 1335-1907, 2008, roč. 15, č. 3, p. 123-129.
- PIVKO, J. 1995. *Morfogenéza oocytov a raných embryí niektorých živočíchov*. Bratislava : Slovak Academic Press, spol. s r.o., 1995. 113 p. ISBN 80-85665-53-0.
- PIVKO, J. 2002. *Hodnotenie kvality in vitro produkovaných embryí : záverečná správa za etapu číslo: 27-20/02-03*. Nitra : Výskumný ústav živočíšnej výroby, 2002, p. 3-47.
- PIVKO, J. et al. 2004. *Ovariálne funkcie a embryogenéza u normálnych a transgénnych zvierat*. Nitra : Výskumný ústav živočíšnej výroby, 2004. 172 p. ISBN 80-88872-42-1.
- RIENZI, L. - VAJTA, G. - UBALDI, F. 2011. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. In *Human Reproduction Update* 17, 2011, p. 34-45.
- ROBL, J.M. - WANG, Z. - KASINATHAN, P. - KUROIWA, Y. 2007. Transgenic animal production and animal biotechnology. In *Theriogenology* 67, 2007, p.127-133.

SMITAL, J. 2001. *Ředení a konzervace kančího spermatu pro účely inseminace*. [online]. [citované 2011-03-28]. Dostupné na internete: http://www.agroweb.cz/Redeni-a-konzervace-kanciho-spermatu-pro-ucely-inseminace__s45x9532.html.

SMITH, K.R. 2002. Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts. In *Journal of Biotechnology* 99, 2002, p. 1-22.

SPRÁVA KOMISIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADE o klonovaní zvierat na potravinársku výrobu. [online]. [citované 2011-03-29]. Dostupné na internete: http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/docs/20101019_report_ec_cloning_sk.pdf.

STREJČEK, F. - ŠVARCOVÁ, O. - PETROVIČOVÁ, I. - CHRENEK, P. - TRANDŽÍK, J. - VOZÁR, M. - LAURINČÍK, J. 2007. *Produkcia embryí in vitro*. [CD-ROM]. Nitra : Fakulta prírodných vied UKF, 2007, 34 p. ISBN 978-80-8094-164-2.

SÚVEGOVA, K. - JURČÍK, R. - CHRENEK, P. - GAŽOVIČOVÁ, Z. - RAFAY, J. - HANUSOVÁ, E. 2006. Porovnanie hmotnosti tela a parenchymatóznych orgánov a niektorých hematologických a biochemických ukazovateľov v krvi transgénnych a netransgénnych králikov. In *Produkcia a analýza transgénnych králikov*. Nitra : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, 2006. ISBN 80-88872-54-5, p. 57-68.

THOMPSON, J.G. 1996. Defining the requirements for bovine embryo culture. In *Theriogenology* 45, 1996, p. 27-40. van der HURK, R., ZHAO, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. In *Theriogenology* 63, 2005, p. 1717-1751.

WALL, R.J. 1996: Transgenic Livestock: Progress and Prospects for future. In *Theriogenology* 45, 1996, p. 57-68.

WANI, N.A. 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. In *Small Ruminant Research* 44, 2002, p. 89-95.

WENG, Y.CH. - SHA, S.W. - CHIOU, CH.M. - TANG, P.CH. - YANG, J.H. - JA, J.CH. 2007. Butyrolactone I reversibly alters nuclear configuration, periooplasmic microtubules and development of porcine oocytes. In *Theriogenology* 67, 2007, p. 509-519.

WILLIAMS, C.J.- ERICKSON, G.F. 2008. *Morphology and physiology of the ovary* [online]. [citované 2011-02-03]. Dostupné na internete: <http://www.endotext.org/female/female1/female1.htm>.

WORTZMAN-SHOW, G.B. - KUROKAWA, M. - FISSORE, R.A. - EVANS, J.P. 2007. Calcium and sperm components in the establishment of the membrane block to polysperm: studies of ICSI and activation with sperm factor. In *Molecular Human Reproduction* 13, 2007, p. 557-565.