

4 SHRNUTÍ

Zavedla jsem real-time RT-PCT mezi základní metodiky, využívané v naší laboratoři.

Během *in vitro* kultivace prasečích oocytů, kumulárních a granulózních buněk a *in vivo* expanze oocyt kumulárních komplexů byl stanoven expresní profil *GDF9* mRNA, proteinu z rodiny TGF β faktorů. Získaná parciální sekvence byla vložena do databáze EMBL/GenBank/DDBJ a gen byl lokalizován na prasečím chromozomu 2. Na rozdíl od myši byl transkript detekován poprvé též v granulózních i kumulárních buňkách rostoucích a preovulačních folikulů. Hladina *GDF9* mRNA během *in vitro* kultivace i *in vivo* expanze klesala ve všech vzorcích.

Popsali jsme signální dráhy, kterými insulinový růstový faktor I (IGFI) zvyšuje FSH-stimulovanou expanzi oocyt-kumulárních komplexů. Potvrdili jsme, že IGFI v kombinaci s FSH zvyšuje produkci hyaluronové kyseliny. Během kultivace kumulárních buněk s FSH došlo k postupnému snížení exprese *Has2* mRNA. Avšak po 20 hodinách byla hladina stále detekovatelná v případě, kdy byl do média přidán i IGFI. Pomocí inhibitorů Akt a MAP kinázy jsme prokázali, že aktivita obou kináz je důležitá pro produkci i retenci HA.

U bovinních blastocyst, připravených za rozdílných experimentálních podmínek (*in vitro*, *in vivo* v ovčím vejcovodu a v kombinaci obou způsobů) byla stanovena exprese genů pro *Bax*, *L37* a *S3a*. V blastocystách, kultivovaných kompletně nebo v konečné fázi v SOF, byly prokázány nejvyšší relativní koncentrace mRNA pro proapoptický gen *Bax*. Lze shrnout, že nejkritičtější fází vývoje embrya je počáteční období, ve kterém dochází k přechodu z maternální k embryonální kontrole genové exprese. Blastocysty kultivované od druhého do sedmého dne vývoje v ovčím vejcovodu jsou vývojově schopnější a kvalitou vysoce podobné embryím získaným *in vivo*. Podmínky *in vitro* kultivace neposkytují přísun všech potřebných faktorů, které by zabezpečily kvalitní vývoj embryí.

U bovinních blastocyst, připravených z oocytů po izolaci s přesně definovaných folikulů, byla stanovena exprese genů pro *Bax*, *Cx31* a *Cx43*. U embryí kultivovaných 8 dní v *in vitro* podmínkách po izolaci oocytů z folikulů ve fázi růstu/stagnace byla detekována nejvyšší hladina transkriptu pro *Cx43*. Konexiny tvoří hlavní proteinovou jednotku mezibuněčných spojů, blastocysty v embryích s větším obsahem takovýchto gap junctions spolu intenzivně komunikují a jsou vývojově schopnější. *Cx43* by bylo možné použít jako jeden z markerů kvality blastocyst.

Pomocí metody subtraktivní hybridizace bylo nalezeno přes 200 pozitivních sekvencí genů, rozdílně exprimovaných mezi oocytem MII a 4-buněčným embryem skotu. Celkem u 14 vybraných genů s rozdílnými funkcemi jejich produktů byla stanovena exprese během preimplantačního vývoje skotu.