

Wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oraz selekcji oocytów i zarodków bydlęcych*)

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, BARTOSZ KEMPISTY*, MAGDALENA WOŻNA,
RAFAŁ WALCZAK**, PATRYCJA SZCZEPAŃSKA**, JAN DZIUBAN**,
MARTA JACKOWSKA, PAWEŁ ANTOSIK

Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki Politechniki Wrocławskiej, ul. Zygmunta Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

Jaśkowski J. M., Kempisty B., Woźna M., Walczak R., Szczepańska P., Dziuban J., Jackowska M., Antosik P.
Selected methods of assessing the developmental competence of bovine oocytes and embryos

Summary

The development of assisted reproductive technologies (ART) is based on the application of advanced molecular biology and cell biology techniques, including the analysis of gene expression, transcriptional profile and proteomics research of bovine oocytes and embryos. The aim of numerous experiments is to select candidate genes, whose expression and regulation affects the quality of oocytes and embryos. Currently, by using modern techniques of molecular biology it is possible to determine the quality of oocytes in terms of their capacity for maturation, fertilization and proper embryo development in preimplantation stages. However, the molecular genetics methods used for assessing the quality of gametes and embryos are invasive and lead to a partial or complete loss of cell viability. Therefore, it is very important now to search for new, non-invasive methods which would make it possible to analyze several parameters of cells without their destabilization.

The lab-on-a-chip system based on the microfluidic technology and recent developments in microengineering constitutes a chemical or biotechnological laboratory in micro scale. The application of this system for the analysis of bovine oocyte and embryo quality represents a fusion between reproductive biology and optoelectronics. To date there has only been scarce research in this area, which has, nevertheless, demonstrated that the analyses based on this system are non-invasive and objective. The analysis of oocyte and embryo quality based on the lab-on-a-chip system, which reveals spectral characteristics of the cells may be an important element in research on their developmental potential.

This article presents several aspects of the evaluation of bovine oocyte and embryo quality, including methods used for the analysis of cell developmental potential and competence.

Keywords: developmental competence, bovine oocyte /embryo quality, lab-on-a-chip

Przyczyny zaburzeń rozwojowych oocytów oraz zarodków bydlęcych

Poziom dojrzałości jądrowej oraz cytoplazmatycznej oocytów tuż przed zapłodnieniem jest jednym z najważniejszych czynników określających jakość zarodków oraz ich zdolność do prawidłowego rozwoju (20). Zaburzenie przebiegu tych procesów podczas długiego okresu rozwoju pęcherzykowego oocytów ssaków (okres ten u bydła trwa około 84 dni od stadium pęcherzyka pierwotnego do owulacji) jest jedną z głównych przyczyn obniżonej zdolności do zapłod-

nienia i niewłaściwego rozwoju zarodków (30, 37). Wśród czynników zewnętrznych, w negatywny sposób wpływających na zdolność rozrodczą krów, wymienia się stres cieplny, który jest jedną z głównych przyczyn zaburzeń płodności (5, 7, 11). Stres cieplny zaburza sekrecję hormonalną, która może być przyczyną uszkodzeń oocytów (16, 38). Ponadto oocyty pozyskiwane w okresie lata charakteryzują się znacznie obniżoną zdolnością do zapłodnienia *in vitro* oraz osiągnięcia stadium blastocysty (4, 39). Sugeruje się, że przyczyną tego zjawiska jest negatywny wpływ stresu cieplnego na początkowe stadia follikulogenezy (41). Podczas dojrzewania oocytów *in vitro* niewłaściwe warunki temperaturowe skutkują znacznie zre-

*) Praca finansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, umowa nr POIG.01.03.01-00-014/08-00.

dukowanym współczynnikiem podziałów komórek zarodkowych oraz obniżoną liczbą zarodków osiagających stadium blastocysty.

Mechanizm, na drodze którego stres cieplny prowadzi do tych zmian, nie został wyjaśniony. Wskazuje się, że apoptoza jest jednym z procesów prowadzących do zaburzeń w osiaganiu przez oocyty kompetencji rozwojowej. Do czynników mogących wywołać apoptozę w oocytach należą: promieniowanie, chemioterapia oraz toksyny środowiskowe (21, 36). Perez i wsp. (36) wykazali, że sfingomieliny oraz ceramidy są związkami pośredniczącymi w indukcji apoptozy w oocytach w wyniku działania na te komórki wybranych leków.

Szok cieplny jest kolejnym z czynników mogących wywołać apoptozę w oocytach i zarodkach w stadium przedimplantacyjnym (26, 35). Sugeruje się, że aktywacja szlaku kaspaz II grupy jest przyczyną zaburzenia procesu dojrzewania oocytów wywołanego szokiem cieplnym. Komórki, w których szlak kaspaz został zaktywowany, mogą przetrwać początkowe stadia apoptozy i przejść przez kolejne etapy rozwoju zarodkowego tuż po zapłodnieniu. Jednakże zarodki takie tracą zdolność do podtrzymania prawidłowego, postępującego wzrostu i rozwoju.

Metody klasyfikacji oraz ocena jakości oocytów i zarodków

Z początkiem XX wieku embriolog E. B. Wilson sformułował tezę „embryogenesis begins during oogenesis”. Wielu spośród autorów sugeruje ważny udział oceny jakości żeńskich gamet nie tylko w prawidłowym rozwoju zarodka, ale także jego właściwej implantacji i prawidłowym rozwoju płodu (10, 14, 22, 25, 34). Prawidłowa jakość oocytów kształtuje się podczas oogenezy i osiagana jest na drodze szeregu przemian komórkowych oraz molekularnych, które świadczą o zdolności oocytów do dokończenia podziału mejotycznego, zapewnieniu monospermicznego zapłodnienia, dekondensacji chromatyny plemnika, jak i prawidłowym rozwoju przedimplantacyjnym zarodka. U różnych gatunków ssaków uzyskanie przez oocyty tzw. kompetencji rozwojowej (developmental competence) zostaje osiagnięte tylko przez nieliczną frakcję oocytów. Szacuje się, że jedynie 5-10% oocytów dojrzewających oraz zapładnianych *in vitro* jest zdolnych do przekształcenia się w zarodki charakteryzujące się wysokim potencjałem rozwojowym (14). Kompetencje rozwojowe oocytów zależą od wielu biochemicznych oraz komórkowych przemian skupionych wokół prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania jądrowego oraz cytoplazmatycznego (23, 27). Kryteria oceny morfologii oocytów opierające się na dostępnych metodach badawczych wydają się niewystarczające w określaniu potencjału rozwojowego zarodków, co w konsekwencji nie przekłada się na uzyskiwanie skutecznych ciąży u zwierząt. Stosowane dotychczas metody molekularne doprowadziły do powstania no-

wej, obiektywnej oceny jakości oocytów oraz zarodków, dzięki której możliwe jest określenie ich potencjału rozwojowego (3, 14). Mankamentem tych metod jednak jest ich inwazyjność. Z tego powodu szereg zespołów badawczych na całym świecie poszukuje nowych, nieinwazyjnych metod oceny kompetencji rozwojowej oocytów oraz jakości zarodków z ich szerokimi aplikacjami praktycznymi.

Zarówno jakość, jak i potencjał rozwojowy oocytów kształtują się podczas follikulogenezy oraz podczas późniejszych stadiów procesu dojrzewania oocytów. Mimo że procesy mejozy i dojrzewania jądrowego mogą przebiegać z wysoką wydajnością, istnieją inne istotne przemiany biochemiczne wewnątrz cytoplazmy, których właściwy przebieg jest niezbędny dla pełnego uzupełnienia potencjału rozwojowego oocytów tuż przed zapłodnieniem. Skuteczne dokończenie tych procesów ma przebieg niezależny od dojrzewania jądrowego i jest określane mianem dojrzewania cytoplazmatycznego (23, 27). Oocyty, które nie dokończyły procesu dojrzewania cytoplazmatycznego charakteryzują się obniżoną jakością oraz są niezdolne do zapłodnienia, jak i prawidłowego rozwoju zarodka.

Zastosowanie technologii RNA w ocenie potencjału rozwojowego oocytów oraz zarodków

Genomika opiera się na przesiewowych badaniach ekspresji genów. Techniki takie, jak np.: mikromacie-rze ekspresyjne, pozwalają na analizowanie całego transkryptomu w badanych oocytach czy zarodkach. Monitorowanie zmian ekspresji genów pozwala na wybranie grup genów, których ekspresja jest specyficzna dla danego, ściśle określonego fenotypu oocytu lub zarodka (27, 34, 41). Sugeruje się, że regulacja ekspresji genów w stadium przedimplantacyjnym odgrywa bardzo ważną rolę we właściwym przebiegu rozwoju płodowego (9). Copp i wsp. (12) wykazali, że defekt zaledwie jednego genu prowadzić może do zaburzenia procesu implantacji zarodka. Dokładne poznanie szlaków regulacji ekspresji genów może przyczynić się w najbliższej przyszłości do pełniejszego poznania krytycznych okresów występujących podczas rozwoju przedimplantacyjnego zarodków oraz sformułowania dokładnych kryteriów określających jakość oraz potencjał rozwojowy oocytów oraz zarodków.

Badania nad transkryptomem oocytów

Matczyny mRNA jest przechowywany w formie nieaktywnej („maskowany”), a następnie wykorzystywany jako matryca do syntezy białka w specyficznym stadium podczas dojrzewania oocytów bądź wczesnej embriogenezy (6, 25). Względna zawartość cząsteczek mRNA jest specyficzna gatunkowo i w dużym stopniu uzależniona od stadium rozwoju zarodka – w przypadku bydła począwszy od zygoty, gdzie rozwój przebiega w oparciu o nagromadzony materiał matczyny, aż do stadium 8-komórkowego, w którym dochodzi do aktywacji genomu zarodkowego.

Aktywacja genomu zarodkowego jest kluczowym etapem we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego u ssaków. Po zapłodnieniu zgromadzony matczyzny materiał w postaci mRNA oraz białek wspomaga wczesny rozwój zarodka. U bydła przed główną aktywacją genomu zarodkowego (major genome activation) występującym w zarodku w stadium od 8 do 16 komórek następuje tzw. mniejsza aktywacja genomu zarodkowego (minor genome activation) rozpoczynająca się od stadium zygoty (31). Badania Misirlioglu i wsp. (32) wykazały różnice w profilu transkrypcyjnym pomiędzy dojrzałymi oocytami a zarodkami w stadium 8-komórkowym dla genów, których produkty białkowe regulują takie procesy, jak: właściwy przebieg transkrypcji, struktura chromatyny oraz podstawowe funkcje komórkowe. Ponadto zmianę w transkryptomie wykazały geny odpowiedzialne za formowanie cech totipotencjalności komórek zarodkowych, skutkujące różnicowaniem się komórek w stadium postimplantacyjnym. Badania z wykorzystaniem techniki mikromacierzy nad oocytami bydlęcymi przed i po dojrzewaniu meiotycznym wykazały ekspresję blisko 54% genów, co przekłada się na około 23 000 transkryptów. Najbardziej zróżnicowany transkryptom był specyficzny dla genów odpowiedzialnych za poliadenylation (17). Zwiększoną ekspresję wykazywały geny, których produkty białkowe regulują takie procesy, jak: replikacja DNA, metabolizm aminokwasów oraz ekspresja białek sygnalizacyjnych związanych z receptorami białek G (15).

Badania nad transkryptomem zarodków

Stadia rozwoju przedimplantacyjnego zarodków charakteryzują się kilkoma istotnymi etapami. Wśród najważniejszych wymienia się; zamianę genomu matczynego na genom zarodkowy oraz aktywację tego drugiego, adhezję komórek i ich kompaktację, jak również różnicowanie się komórek do stadium blastocysty. Wszystkie te etapy są regulowane przez ekspresję „maszyny” genowej (40). Ruddock-D’Cruz i wsp. (42) wykazali ekspresję 100 genów regulujących ważne procesy podczas przedimplantacyjnego rozwoju zarodków bydlęcych. Produkty białkowe tych genów zaangażowane były w takie procesy, jak: ważne szlaki metaboliczne, regulacja transkrypcji i translacji, metylacja DNA i modyfikacja histonów, stres oksydacyjny, odpowiedź na syntezę czynników wzrostu, szlaki sygnalizacyjne z udziałem cytokin, regulacja cyklu komórkowego oraz apoptoza. W badaniach tych wyłoniono również 68 genów, których produkty białkowe były ściśle związane z regulacją procesów w poszczególnych stadiach, poczynając od wzrostu pęcherzykowego, poprzez oogenezę, zygotę oraz kolejne stadia rozwoju embrionalnego (2-, 4-, 8-, 16-), kończąc na moruli i blastocyste.

Badania przeprowadzone przez Corcoran i wsp. (13), wykorzystujące analizę transkryptomu blastocyst bydlęcych *in vivo* oraz *in vitro*, wykazały różnice w eks-

presji 384 genów, z których 85% ulegało obniżonej ekspresji w zarodkach *in vitro* w odniesieniu do zarodków *in vivo*.

Technologie proteomiczne i ich zastosowanie w określaniu potencjału rozwojowego oocytów oraz zarodków bydlęcych

Dojrzewanie oocytów i procesy ich różnicowania się regulowane są przez ekspresję specyficznych genów. W wielu komórkach można jednak zauważyć brak zależności pomiędzy profilem transkrypcyjnym a aktualną zawartością białek (28, 34). Zjawisko to jest szczególnie obserwowane w oocytach, gdzie nie można wytyczyć żadnych ścisłych liniowych współzależności pomiędzy poziomem mRNA a ilością odpowiadających im białek. Aktywacja białek jest modulowana przez posttranslacyjne modyfikacje oraz specyficzne kinazy i fosfatazy, kontrolujące ważne procesy komórkowe, takie jak: wzrost komórek i ich różnicowanie, cykl komórkowy oraz podział meiotyczny. Podczas dojrzewania meiotycznego żeńskich komórek rozrodczych istotną rolę odgrywa aktywacja kinaz białkowych MPF i MAPK (8). Przeprowadzone badania dowodzą, że aktywność transkrypcyjna (efektywność syntezy mRNA) gwałtownie obniża się podczas dojrzewania meiotycznego (18). Sugeruje to, że informacja konieczna do osiągnięcia pełnej mejozy i nabywania kompetencji rozwojowych przez oocyt, co w dalszym etapie warunkuje prawidłowy rozwój zarodka, jest przechowywana głównie w postaci białek (8).

Badania Kastropa i wsp. (23) oraz Trounsona i wsp. (45) wykazały, że oocyty bydlęce dojrzewające w warunkach *in vitro* charakteryzują się zredukowaną zawartością białek w porównaniu z oocytami dojrzewającymi *in vivo*. Wskazanie na istotną rolę białek w trakcie dojrzewania i nabywania kompetencji rozwojowych przez komórki jajowe stwarza duże możliwości badawcze dla technologii proteomicznych. Wysoka rozdzielczość dwukierunkowej elektroforezy białek (19), identyfikująca białka i peptydy oraz masowa spektrometria (1) stanowią istotne narzędzie dla wszechstronnej analizy proteomu oocytów i zarodków w różnych stadiach rozwoju. Dwukierunkowa elektroforeza umożliwia wszechstronne i ilościowe analizy dużej liczby białek w komórce, jak również ich posttranslacyjnych modyfikacji, a następnie ich wizualizację w różnym formacie (27). Bhojwani i wsp. (8) w badaniach poświęconych analizie regulacji procesów molekularnych zachodzących podczas IVM i wpływu butylolaktanu I (BLI) na aktywację kinaz białkowych analizowali poziom ekspresji białek i fosfoprotein za pomocą narzędzi proteomicznych, takich jak: dwukierunkowa elektroforeza, western blotting i MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight). Posługując się tymi metodami zidentyfikowano białka, które były w różnym stopniu ufosforylowane podczas IVM w poszczególnych stadiach rozwoju oocytów. Wykazano negatywny wpływ

BLI na ekspresję kinaz białkowych odpowiedzialnych za fosforylację białek, w konsekwencji na zmiany ich aktywności w obrębie komórki.

Ustalenie markerów molekularnych charakteryzujących poszczególne stadia dojrzewania oocytów i rozwój zarodków wraz z morfologiczną ich oceną skutkuje bardziej precyzyjną oceną jakości, a tym samym kompetencji rozwojowych badanych komórek (8). Stwarza to możliwość kreowania profili proteomu dla wyselekcjonowanej grupy oocytów i zarodków ssaków (24). Godne uwagi wydaje się także wykorzystanie technik proteomicznych jako metod nieinwazyjnych w ocenie obecności białek specyficznych dla komórek wzgórka jajonośnego, które mogą być przeanalizowane bez narażania żywotności komórki jajowej (34).

Mikrosystemy analityczne typu „lab-on-a-chip”

Trwający od początku lat 50. ubiegłego stulecia rozwój mikroelektroniki zaowocował powstaniem odrębnej dziedziny nauki i techniki – mikrosystemów – integrujących w jednym chipie, podobnym do układu scalonego, elementy mikroelektroniczne (np. tranzystory, diody, układy scalone), optoelektroniczne (np. diody elektroluminescencyjne, fotodiody i światłowody) i mikromechaniczne (np. kanały, rowki, vialy, belki, membrany). Naturalnym etapem rozwoju mikrosystemów było zintegrowanie miniaturowych (kapilarnych) kanałów i komór reakcyjnych o pojemności od pojedynczych nanolitów do mikrolitrów oraz sensorów wielkości fizycznych i chemicznych, tworzących mikrosystem analityczny – μ TAS (micro-total analysis system), zwany dziś powszechnie laboratorium na chipie (lab-on-a-chip). Zalety lab-on-a-chipów – znacznie zredukowana objętość reagentów oraz próbki zużywanych do wykonania analizy, możliwość pełnej automatyzacji analizy oraz krótszy czas analizy, jak i mniejsze zużycie energii oraz koszt pojedynczej analizy – spowodowały szerokie ich rozpowszechnienie w różnych dziedzinach nauk chemicznych, przyrodniczych, weterynaryjnych i medycznych. Lab-on-a-chipy wykorzystywane są np. w medycynie do diagnozowania wybranych chorób, kontroli, interakcji i odkrywania nowych leków, detekcji substancji bioterrorystycznych oraz monitoringu jakości wody, powietrza i żywności (2, 29, 43, 47, 48). W przyszłości lab-on-a-chipy staną się podstawowym narzędziem badawczym wykorzystywanym w szeregu laboratoriach medycznych i biotechnologicznych, wykonującym obiektywne, tanie (a tym samym powszechne), szybkie i w pełni zautomatyzowane analizy (50).

W ciągu ostatnich kilku lat lab-on-a-chipy znalazły zastosowanie również w badaniach biologii rozrodu (46). Znane z literatury rozwiązania techniczne lab-on-a-chipów umożliwiające ocenę jakości komórek rozrodczych zwierząt wykorzystują metody mechaniczne (33), bio-chemiczne (33) lub optyczne (49). Metoda mechaniczna, za pomocą której wyznaczana jest elastyczność komórki, może być metodą niszczą-

cą. W metodzie biochemicznej analizowane są produkty metabolizmu komórek, a więc jest to metoda pośrednia i wymagająca skomplikowanego osprzętu analitycznego. Metoda optyczna, polegająca na pomiarze charakterystyki spektralnej światła widzialnego, absorbowanego przez ludzką komórkę jajową, umożliwia ocenę dojrzałości oocytu ludzkiego, ale brak jest informacji na temat szerszego wykorzystania tej metody w odniesieniu do komórek rozrodczych zwierząt hodowlanych. Wydaje się, że ze względu na łatwość integracji komponentów optycznych z lab-on-a-chipem (np. światłowodów włóknistych o średnicach zbliżonych do średnicy komórek rozrodczych) oraz nieniszczącej natury metody optycznej, pomiar charakterystyk spektralnych komórek rozrodczych jest najlepszą metodą. Jedną z pierwszych prac dotyczących tego zagadnienia została opublikowana przez Szczepańską i wsp. (44). Autorzy przeprowadzili pełną charakterystykę spektralną oocytów/zarodków świń oraz bydła. Badania te wykazały wyraźną korelację pomiędzy morfologią oocytów i zarodków a ich obrazem spektralnym. Ponadto po raz pierwszy w układzie matematycznym pokazano różnice w jakości oocytów świń pozyskanych z pęcherzyków jajnikowych różnej wielkości (44).

Podsumowując, w pracy przedstawiono wybrane metody selekcji oraz analizy kompetencji rozwojowej oocytów oraz zarodków bydłecych. Opisane techniki opierające się na analizie transkryptomu lub proteomu badanych komórek dostarczają informacji na temat ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki procesów. Wiele z tych procesów i mechanizmów świadczy o właściwym dojrzewaniu oocytów, różnicowaniu się komórek zarodkowych oraz może wskazywać na prawidłowy przebieg implantacji, jak i rozwoju zarodków w stadium postimplantacyjnym. W pracy zwrócono także uwagę na pojawienie się w ciągu ostatnich kilku lat nieinwazyjnych metod oceny jakości oocytów oraz zarodków.

Piśmiennictwo

1. *Aebersold R., Mann M.*: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198-207.
2. *Ahn C. H., Choi J. W., Beaucauge G., Nevin J. H., Lee J. B., Puntambekar A., Lee J. Y.*: Disposable smart lab on a chip for point-of-care diagnostics. *Proc. IEEE* 2004, 92, 154-173.
3. *Albertini D. F., Sanfins A., Combelles C. M.*: Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod. Biomed. Online* 2003, 6, 410-415.
4. *Al-Katanani Y. M., Paula-Lopes F. F., Hansen P. J.*: Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2002, 85, 390-396.
5. *Al-Katanani Y. M., Webb D. W., Hansen P. J.*: Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 2611-2616.
6. *Bachvarova R. F.*: A maternal tail of poly(A): the long and short of it. *Cell* 1992, 96, 895-897.
7. *Badginga L., Collier R. J., Wilcox C. J., Thatcher W. W.*: Interrelationships of milk yield, body weight, and reproductive performance. *J. Dairy. Sci.* 1985, 68, 1828-1831.
8. *Bhojwani M., Rudolph E., Kanitz W., Zuehlke H., Schneider F., Tomek W.*: Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells* 2006, 8, 259-274.

9. *Brison D. R., Schultz R. M.*: Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence or a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 1088-1096.
10. *Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jaśkowski J. M., Olechnowicz J.*: Wybrane aspekty związane z dojrzewaniem oocytów, zapłodnieniem oraz rozwojem zarodkowym u psów. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 626-631.
11. *Cavestany D., el-Wishy A. B., Foote R. H.*: Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *J. Dairy. Sci.* 1985, 68, 1471-1478.
12. *Copp A. J.*: Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 1995, 11, 87-93.
13. *Corcoran D., Fair T., Park S., Rizos D., Patel O. V., Smith G. W., Coussens P. M., Ireland J. J., Boland M. P., Evans A. C., Lonergan P.*: Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in vitro compared to in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006, 131, 651-660.
14. *Coticchio G., Sereni E., Serrao L., Mazzone S., Iadarola I., Borini A.*: What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1034, 132-1044.
15. *Cui X. S., Li X. Y., Yin X. J., Kong I. K., Kang J. J., Kim N. H.*: Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 2007, 53, 405-418.
16. *Edwards J. L., Hansen P. J.*: Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 46, 138-145.
17. *Fair T., Carter F., Park S., Evans A. C. O., Lonergan P.*: Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology* 2007, 68, 91-97.
18. *Fuente R. De La, Viveiros M. M., Burns K. H., Adashi E. Y., Matzuk M. M., Eppig J. J.*: Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* 2004, 275, 447-458.
19. *Görg A., Weiss W., Dunn M. J.*: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
20. *Hansen P. J.*: Regulation of immune cells in the uterus during pregnancy in ruminants. *J. Anim. Sci.* 2007, 85, 30-31.
21. *Hu X., Christian P. J., Thompson K. E., Sipes I. G., Hoyer P. B.*: Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 87-93.
22. *Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.*: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
23. *Kastrop P. M., Bevers M. M., Destrée O. H., Kruip T. A.*: Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 29, 271-275.
24. *Katz-Jaffe M. G., Gardner D. K.*: Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology* 2007, 68, 125-130.
25. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.*: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
26. *Krinninger C. E. 3rd, Stephens S. H., Hansen P. J.*: Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 63, 335-340.
27. *Krisher R. L.*: The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 14-23.
28. *Lopez M. F.*: Better approaches to finding the needle in a haystack: Optimizing proteome analysis through automation. *Electrophoresis* 2000, 21, 1082-1093.
29. *McGlennen R. C.*: Miniaturization technologies for molecular diagnostics. *Clin. Chem.* 2001, 47, 393-402.
30. *McNatty K. P., Heath D. A., Lundy T., Fidler A. E., Quirke L., O'Connell A., Smith P., Groome N., Tisdall D. J.*: Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 54, 3-16.
31. *Memili E., First N. L.*: Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000, 8, 87-96.
32. *Misirlioglu M., Page G. P., Sagirkaya H., Kaya A., Parrish J. J., First N. L., Memili E.*: Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 18905-18910.
33. *Murayama Y., Constantinou C. E., Omata S.*: Micro-mechanical sensing for the characterization of the elastic properties of the ovum via uniaxial measurement. *J. Biomech.* 2004, 37, 67-72.
34. *Patrizio P., Fragouli E., Bianchi V., Borini A., Wells D.*: Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod. Biomed. Online* 2007, 15, 346-353.
35. *Paula-Lopes F. F., Hansen P. J.*: Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1169-1177.
36. *Perez G. I., Knudson C. M., Leykin L., Korsmeyer S. J., Tilly J. L.*: Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat. Med.* 1997, 3, 1228-1232.
37. *Picton H., Briggs D., Gosden R.*: The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998, 25, 145, 27-37.
38. *Rivera R. M., Hansen P. J.*: Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001, 121, 107-115.
39. *Rocha A., Randel R. D., Broussard J. R., Lim J. M., Blair R. M., Roussel J. D., Godke R. A., Hansel W.*: High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology* 1998, 49, 657-665.
40. *Rodriguez-Zas S. L., Schellander K., Lewin H. A.*: Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 2008, 135, 129-139.
41. *Roth Z., Meidan R., Shaham-Albalancy A., Braw-Tal R., Wolfenson D.*: Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction* 2001, 121, 745-751.
42. *Ruddock-D'Cruz N. T., Hall V. J., Tecirlioglu R. T., French A. J.*: Gene expression analysis of single preimplantation bovine embryos and the consequence for developmental potential. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007, 64, 341-363.
43. *Srinivasan V., Pamula V. K., Fair R. B.*: An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids. *Lab. Chip* 2004, 4, 310-315.
44. *Szczańska P., Walczak R., Dziuban J., Jackowska M., Kempisty B., Jaśkowski J. M., Bargiel S.*: Lab-on-chip quality classification of porcine/bovine oocytes. *Procedia Chemistry* 2009, 1, 341-344.
45. *Trounson A., Andriesz C., Jones G.*: Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001, 121, 51-75.
46. *Urbanski J. P., Johnson M. T., Craig D. D., Potter D. L., Gardner D. K., Thorsen T.*: Noninvasive metabolic profiling using microfluidics for analysis of single preimplantation embryos. *Anal. Chem.* 2008, 80, 6500-6507.
47. *Verpoorte E.*: Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* 2002, 23, 677-712.
48. *Walczak R., Dziuban J., Ruano-Lopez J. M., Bang D. D.*: Miniaturowy system do prowadzenia reakcji PCR czasu rzeczywistego do taniego i masowego wykrywania patogenów żywności. *Elektronika* 2008, 49, 242-244.
49. *Zeggari R., Wacogne B., Pieralli C., Roux C., Gharbi T.*: A full micro-fluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for cell maturity estimation and fertilization indication. *Sensors and Actuators B* 2007, 125, 664-671.
50. *Ziober B. L., Mauk M. G., Falls E. M., Chen Z., Ziober A. F., Bau H. H.*: Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head Neck.* 2008, 30, 111-121.

Adres autora: prof. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań; e-mail: jasko@au.poznan.pl