

## VPLYV MINERÁLNEHO OLEJA NA *IN VITRO* FERTILIZÁCIU A KULTIVÁCIU EMBRYÍ

PETRA CUPPEROVÁ, JANA ANTALÍKOVÁ,  
MICHAL SIMON, JANA JANKOVIČOVÁ  
a KATARÍNA MICHALKOVÁ

Oddelenie imunogenetiky, Ústav biochémie a genetiky  
živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61,  
900 28 Ivanka pri Dunaji  
petra.cupperova@savba.sk

Došlo 10.2.15, prijaté 30.3.15.

Kľúčové slová: kultivačný systém, minerálny olej, embryo

### Obsah

1. Kultivačné metódy
2. Charakteristika olejov používaných na *in vitro* fertilizáciu
3. Riziká použitia minerálneho oleja
4. Kontrola kvality oleja
5. Čistenie olejov
6. Záver

### 1. Kultivačné metódy

Úspešný vývoj predimplantačných embryí v *in vitro* podmienkach si vyžaduje prostredie, ktoré je čo najviac podobné prostrediu *in vivo*. Vhodný kultivačný systém je dôležitou súčasťou asistovanej reprodukcie, pretože ovplyvňuje implantačný potenciál embrya a zároveň úspech programov *in vitro* fertilizácie (IVF). Pre správny vývoj embryí sú nevyhnutné: špecifické a efektívne základné kultivačné médium, rôzne proteínové doplnky a kultivačný systém využívajúci vrstvu živých somatických buniek<sup>1–3</sup>. Kultivačné systémy využívané v *in vitro* technológiách pre rôzne embryonálne štádiá vývoja rôznych živočíšnych druhov boli dlhodobo optimalizované<sup>4–6</sup>. Prvé úspešné pokusy pri kultivácii embryí do štádia blastocysty v skúmavke sa podarili dvom študentom v laboratóriu Johna Biggersa na Pensylvánskej univerzite<sup>7,8</sup>. Následne, Ralph Gwatkin<sup>9</sup> a Ralph Brinster<sup>10</sup> vyvinuli metódu, ktorá využíva minerálny olej na prekrytie kultivačného média v Petriho miske<sup>11</sup> a tým umožňuje častejšie pozorovanie embryí počas pokusov bez narušenia optimálnych podmienok. Minerálny olej sa tak používa pri kultivácii embryí už od roku 1963 (cit.<sup>10</sup>). V súčasnosti sa v IVF laboratóriách používajú hlavne dve metódy kultivácie embryí v závislosti od objemu použitého príslušného

média. Embryo je možné kultivovať vo veľkom objeme média (> 0,5 ml) alebo v systéme využívajúcom mikrokvapky, ktoré tvoria malý objem (< 0,5 ml) a embryá spolu s médiom sú prekryté olejovou vrstvou<sup>12</sup>. Pri kultivácii embryí sa používa viacero druhov oleja, a to parafínový, minerálny, silikónový alebo zmes olejov.

Systém využívajúci mikrokvapky prekryté olejom má početné výhody: zabraňuje odparovaniu vody z média, a tým udržiava stále pH; redukuje fluktuáciu plynov a teploty v médiu; chráni médium pred mikrobiálnou kontamináciou; uľahčuje kontrolovanie embryí počas kultivácie<sup>10,13</sup>. Prekrytie média olejom zároveň neutralizuje toxické artefakty v kultivačnom systéme<sup>4</sup>. Minerálny olej môže tiež absorbovať hydrofóbne kontaminanty alebo prchavé organické látky z kultivačného média<sup>14,15</sup>. Nevyhnutnosť oleja pri vývoji embrya bola preukázaná u mnohých druhov, vrátane myši<sup>4,16,17</sup>, ošípaných<sup>18</sup> a hovädzieho dobytku<sup>19,20</sup>. Napriek týmto výhodám používanie minerálneho oleja má aj nedostatky.

### 2. Charakteristika olejov používaných na *in vitro* fertilizáciu

Minerálny olej je výsledkom spracovania ropy, rovnako ako napr. benzín, nafta, rôzne iné chemické látky (benzény), ale aj polystyrén, ktorý sa používa napríklad na výrobu Petriho misiek tiež používaných v IVF. Minerálny olej je jednou z frakcií ropnej destilácie, nazývaný aj minerálna vazelína, parafínový olej a svetlý alebo biely minerálny olej<sup>21</sup>. V rafinovanom minerálnom oleji sa vyskytujú tri typy uhl'ovodíkov, a to uhl'ovodíky s priamym reťazcom, cyklické uhl'ovodíky a aromatické uhl'ovodíky. Niektorí výrobcovia deklarujú parafínový a minerálny olej ako dva rozdielne druhy s odôvodnením, že parafínový olej je zložený iba z nasýtených uhl'ovodíkov s priamym reťazcom, na rozdiel od minerálneho oleja, ktorý okrem nasýtených obsahuje aj nenasýtené cyklické a aromatické uhl'ovodíky. Z dôvodu zložitosti separácie a rafinácie týchto podobných zložiek, ľahký minerálny a parafínový olej sú zmesou uhl'ovodíkov prevažne s priamym reťazcom a niektorých cyklických a aromatických uhl'ovodíkov, teda sú takmer identické<sup>22</sup>.

Využitie minerálneho oleja v biomedicíne je rôzne. Patrí sem napríklad schválené využitie pre lekárske účely ako laxatívum, ale taktiež využitie pri kultivácii embryí<sup>21</sup>. Pre aplikáciu v IVF metódach musí minerálny olej spĺňať špecifické požiadavky (viskozita, merná hmotnosť, obsah síry, množstvo nenasýtených, polycyklických aromatických uhl'ovodíkov) a musí vyhovieť testom kontroly kvality<sup>22</sup>. Niektoré špecifické testy môžu vykonávať ako výrobcovia, tak aj konkrétne laboratória pre IVF (cit.<sup>21</sup>).

### 3. Riziká použitia minerálneho oleja

Minerálny olej je najmenej charakterizovaná zložka používaná pri kultiváciách embryí, preto používanie oleja prináša vyššie riziká negatívneho vplyvu. Toxické znečistenie alebo zhoršená kvalita oleja môže negatívne ovplyvniť dozrievanie oocytov, oplodnenie a vývoj embryí. Ako prví poukázali na toxický vplyv oleja na kultivované embryá Fleming s kolektívom, konkrétny toxín sa však nepodarilo identifikovať. Spôsobil ale zmeny, ktoré ovplyvnili veľkosti mikrokvapiiek a tiež zapríčinil poškodenie zony pellucidy<sup>23</sup>. Neskôr boli potvrdené a publikované aj ďalšie prípady výskytu toxínov v oleji počas výroby, zistené pomocou testov kontroly kvality na myších embryách, opäť ale neboli špecifikované<sup>24</sup>. Rovnako bola zistená prítomnosť toxínov aj v oleji už používanom pri kultiváciách embryí hovädzieho dobytká<sup>20</sup>, ošípaných<sup>18</sup> a myší<sup>4</sup>. Identifikácia chemických látok a prípadných toxínov prítomných v minerálnom oleji je nevyhnutná pre zamedzenie kontaminácie kultivačných systémov. V oleji používanom pri kultiváciách embryí boli doposiaľ identifikované tri kontaminanty, a to zinok<sup>25</sup>, Triton X-100 a peroxid<sup>22,26,27</sup>.

Zinok (Zn) je mäkký ľahko taviteľný kov, jeho prítomnosť v potrave je potrebná pre správny vývoj organizmu, ale nadmerné množstvo môže byť škodlivé. Hoci je nevyhnutný pre pôsobenie viac ako 300 enzýmov, môže byť jeden z toxických kovov, keď je prítomný v iónovej forme. V kvantitatívnom teste toxicity na základe príjmu neutrálnej červene do lyzozómov kultivovaných fibroblastov 3T3, bol Zn deklarovaný ako štvrtý najtoxicejší prvok v sérii: kadmium (Cd) > ortuť (Hg) > striebro (Ag) > zinok (Zn) > mangán (Mn) > meď (Cu) > kobalt (Co) > nikel (Ni) > chróm III (Cr(III)). Predmetom výskumu viacerých štúdií bolo stanovenie koncentrácie Zn, ktorá už má inhibičný vplyv na predimplantačný vývoj myších embryí za rôznych podmienok kultivácie. Interpretácia výsledkov je však zložitá, pretože v kultivačných médiách sa vyskytujú rôzne koncentrácie látok, ktoré môžu viazať Zn a tvoriť s ním stabilné komplexy (napr. sérový albumín a kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA)), a tým ovplyvniť jeho toxický účinok. Príkladom je štúdia z roku 1995, popisujúca zvýšenie obsahu zinku v médiu po prekrytí média olejom a následne jeho embryotoxický vplyv u myší (zastavenie vývoja embryí v štádiu  $\leq$  dvoch buniek), ktorý bol však zmiernený po zvýšení koncentrácie EDTA (cit.<sup>25</sup>).

Triton X-100 ( $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ ) je neionogénna povrchovo aktívna látka, ktorá má viacero využití v laboratóriu. Používa sa napríklad na solubilizáciu membránových proteínov ako zložka lyzačného roztoku alebo ako súčasť čistiacich prostriedkov. Pri testoch kontroly kvality sa zistila prítomnosť Tritonu X-100 aj v minerálnom oleji. Tento olej bol extrémne toxický pre myšie embryá. Obsah Tritonu X-100 sa navyše líšil v jednotlivých baleniach oleja až desaťnásobne. Vzhľadom k tomu, že každá fľaša zásielky nie je testovaná, je pravdepodobné, že nekontaminovaná fľaša môže byť použitá pri testovaní kontroly kvality a kontaminovaná sa môže dostať

do laboratória. Zdroj Tritonu X-100 a jeho variabilná prítomnosť vyvolávali otázky týkajúce sa výrobného procesu a dopravy. Zistilo sa, že kontaminácia Tritonom X-100 bola pravdepodobne spôsobená nevhodným obalovým materiálom. Tieto príklady izolovanej kontaminácie počas výroby by mali byť ojedinelé a je ťažké odhaliť ich pri bežných testoch kontroly kvality<sup>26</sup>.

Peroxidy sú jedným z najzávažnejších kontaminantov nájdených v minerálnom oleji. Vznikajú oxidáciou dvojitých väzieb uhlíkovodíkov, a preto olej s nenasýtenými masnými kyselinami je náchylnejší na oxidáciu. K vzniku peroxidov v oleji môže dôjsť kedykoľvek počas celej doby použiteľnosti. Výsledky niektorých štúdií potvrdili, že stupeň oxidácie je závislý od pôsobenia tepla, UV žiarenia, podmienok a dĺžky uskladnenia, výrobcu ale aj čísla šarže<sup>22,26,27</sup>. Okrem peroxidov, ktoré sú zdrojom reaktívnych foriem kyslíka (voľných radikálov), sa počas degradácie oleja môžu tvoriť aj nasýtené a nenasýtené aldehydy<sup>22</sup>, u ktorých sa preukázalo, že sú embryotoxické, keď sa vyskytujú v kultivačnom médiu alebo vo vzduchu<sup>28</sup>. Nízke hladiny peroxidov síce nemusia byť toxické pre kultiváciu embryí, ale prítomnosť voľných radikálov môže spôsobiť reťazovú reakciu a v konečnom dôsledku aj zvýšenie hladiny peroxidov, ktorá už bude embryotoxická. Tieto predpoklady boli potvrdené u myších embryí, kde peroxidy mali nepriaznivý vplyv na ich vývoj<sup>22</sup>. Vzhľadom k zisteným skutočnostiam sa užívateľom odporúča kontrolovať vplyv okolitého prostredia na olej, vrátane manipulačných a skladovacích podmienok. Niektorí výrobcovia by zároveň na základe viacerých štúdií mali odporučiť kratšiu dobu spotreby, skladovaciu teplotu 4 °C namiesto izbovej teploty a skladovanie v tme, pokiaľ nie je olej v nepriehľadnej alebo tmavej fľaši. Odporúča sa aj stanovenie obsahu peroxidov v samotnom laboratóriu pred použitím minerálneho oleja s využitím rôznych komerčne dostupných detekčných kitov<sup>29</sup>.

Ďalším rizikom pri používaní minerálnych olejov je prestup niektorých zložiek (napr. steroidných hormónov) z kultivačného média do oleja. Steroidné hormóny sú hormóny lipofilnej povahy, zohrávajúce dôležitú úlohu aj počas dozrievania cicavčích oocytov pri *in vivo*, či *in vitro* podmienkach. Tieto hormóny, ako je napríklad progesterón, estrogén, androgén alebo sterol aktivujúci meiózu, sú vylučované aj kumulárnymi bunkami oocytov, ktoré sú stimulované gonadotropínom počas ich maturácie *in vitro*. Vzhľadom k vysokej absorpčnej kapacite olejov a vlastnostiam hormónov, môžu byť steroidné hormóny absorbované olejom<sup>18</sup>. Potvrdzujú to výsledky experimentov, v ktorých koncentrácia estradiolu alebo progesterónu v médiu prekrytom olejom bola nižšia oproti koncentracii v médiu bez prekrytia. Nižšia hladina mohla byť spôsobená absorpciou minerálnym olejom alebo nepriaznivým účinkom toxických látok v minerálnom oleji na produkciu steroidných hormónov kumulárnymi bunkami. Je teda nutné brať do úvahy, že pri prekrytí mikrokvapiiek olejom môže dôjsť k redukcii vývojového potenciálu oocytov počas dozrievania *in vitro*<sup>30</sup>.

Pre dotvorenie prehľadu uvádzame aj výsledky našich pozorovaní, pri ktorých sme pozorovali vplyv minerálneho oleja, krátkodobu ožiareného UV svetlom počas doby manipulácie, na proces *in vitro* oplodnenia a následne aj jeho vplyv na vývoj embryí počas prvých 48 hodín po oplodnení. Dôvodom tejto analýzy je skutočnosť, že dekontaminácia priestoru pre manipuláciu pri IVF procedúrach sa vykonáva UV svetlom, v dôsledku čoho môže dôjsť ku krátkodobému vystaveniu minerálneho oleja UV žiareniu, a tým indukcii tvorby toxických zložiek v oleji. Maturované oocyty hovädzieho dobytku využité v experimente boli rozdelené do troch pokusných skupín v dvoch experimentoch (oplodnenie, vývoj). Minerálny olej bol vystavený UV žiareniu po dobu 24 hodín a následne použitý k prekrytiu mikrokvapky oplodňovacieho média (IVF-TL). Ako kontrolná vzorka bol použitý minerálny olej (s rovnakým číslom šarže) nevystavený UV žiareniu a ako druhá kontrola bola skupina oplodňovaná vo „veľkej“ (0,5 ml) oplodňovacej kvapke bez prekrytia olejom. Vo výsledkoch sme pozorovali nízke percento oplodnených oocytov (12,5 %) v porovnaní s kontrolnými vzorkami (96,3 % a 91,5 %) (Mann-Whitney,  $P \leq 0,001$ ). V následnom pokuse sme získali nasledujúce výsledky: vo vzorkách, pri ktorých bol použitý ožiarený minerálny olej, iba 10 % oocytov dosiahlo fázu prvojadier alebo zygoty a 5 % embryí dosiahlo štádium dvoch a viacerých buniek. Naopak v skupine oplodnených oocytov v kvapkách prekrytých neožiareným olejom bolo 46,5 % oocytov vo fáze prvojadier alebo zygoty a 41,9 % embryí bolo rozdelených do dvoch a viacerých buniek. Zaujímavé bolo zistenie, že v kvapkách embryonálneho média bez minerálneho oleja všetky oplodnené oocyty ostali vo fáze prvojadier alebo zygoty bez ďalšieho bunkového delenia. Predpokladáme teda, že prekrytie mikrokvapky média ISM1 minerálnym olejom je zásadné pre ďalší vývoj embryí hovädzieho dobytku a už 24hodinová expozícia minerálneho oleja UV žiareniu má toxický vplyv na hovädzie gaméty a embryá<sup>31,32</sup>.

#### 4. Kontrola kvality oleja

Testy na kontrolu kvality by mali byť ľahko reprodukovateľné, dostatočne citlivé a mali by vyžadovať minimálne investície na čas a prácu. V súčasnosti sa používa niekoľko biotestov na skrining toxicity pre embryá v IVF laboratóriách. Existuje však spor o tom, či sú jednotlivé testy dostatočne citlivé pre detekciu hladiny škodlivých, alebo subletálnych toxínov<sup>33</sup>. Medzi najčastejšie biologické testy používané výrobcami a jednotlivými laboratóriami patria testy 1-bunkových a 2-bunkových myších embryí (mouse embryo assay, MEA) a stanovenie pohyblivosti ľudských spermíí (human sperm motility assay, HSMA)<sup>29</sup>. Najcitlivejším z vyššie uvedených testov v laboratórnych podmienkach je 1-bunková MEA<sup>34,35</sup>. Napriek tomu, nízke hladiny toxínov obsiahnuté v materiáloch používaných na IVF môžu pri súčasných metódach kontroly kvality uniknúť pozornosti, vyvolať bunkový stres a nepriaznivo

ovplyvňovať výsledky IVF<sup>34,36,37</sup>. V súčasnosti nie je úplne jasné, či citlivosť týchto testov dostatočná pre experimenty na myšiach, postačuje aj na detekciu toxínov dôležitých pre ľudské IVF laboratóriá. Zistené rozdiely v rámci jednotlivých myších kmeňov poskytujú dôkazy o tom, že súčasný štandard pre testovanie kontroly kvality využívajúci 1-bunkové embryá F1 hybridných myší, nemusí byť dostatočne citlivý pre detekciu kontaminantov, ktoré ovplyvňujú ľudské gaméty a embryá<sup>38</sup>. Túto hypotézu podporili nedávne prípady, keď toxické minerálne oleje prešli testom MEA u výrobcov, ale nie testami klinických laboratórií<sup>26</sup>. Vlastným obmedzením pre MEA je relatívny nedostatok citlivosti koncového bodu analýzy (expandované blastocysty sa môžu vytvárať z niekoľkých blastomér). Ich životaschopnosť však nie je vždy spojená s ich tvorbou, a tento fakt je potrebné potvrdiť viacerými objektívnymi koncovými analýzami ako napr. počtom buniek<sup>39</sup>. Pre zlepšenie citlivosti MEA boli testované rôzne variácie kultivačných techník: kultivácia čerstvých verus mrazených embryí ako aj odstránenie zony pellucidy pred kultiváciou, čo viedlo k variabilným výsledkom<sup>34,36,37</sup>. Ďalej bolo navrhnuté súčasné využitie testov HSMA a MEA pre spoľahlivejší skrining toxínov v embryologických laboratóriách<sup>40</sup>, v dôsledku rôznej špecifickej citlivosti jednotlivých testov na rôzne toxíny. Pri HSMA je pohyblivosť spermíí zachovaná aj v podmienkach, ktoré nie sú úplne vhodné pre oplodnenie alebo vývoj embryí a tento test nie je vhodný pre všetky toxíny. Na druhej strane HSMA je citlivejšia na detekciu endotoxínov v kontaktných dávkach a kultivačných médiách, či detekciu toxicity niektorých laboratórnych materiálov<sup>41–43</sup>.

Nedávno bol navrhnutý aj ďalší spôsob kontroly kvality, tzv. „time-lapse“ analýza bunkového delenia v čase u myších embryí (morfokinéza (MK)). Time-lapse analýza je kontinuálny záznam reálneho embryonálneho vývoja, sledujúci jednotlivé fázy bunkového delenia v reálnom čase<sup>43–45</sup>. Wolf s kolektívom potvrdili, že počiatková fáza delenia myších embryí je citlivým markerom toxínov aj v takých koncentráciách, ktoré už nemajú vplyv na vývoj blastocysty, čiže koncový bod štandardného testovania kontroly kvality. Citlivosť MK analýzy bola potvrdená pri testovaní minerálneho oleja, ktorého nezávadnosť bola deklarovaná výrobcou kontrolou kvality s využitím myších embryí, jeho toxicita sa ale prejavila pri ľudských embryách<sup>29</sup>. Vplyv toxínu v oleji sa prejavil už počas prvých 72 hodín kultivácie, teda skôr ako pri 96 hodinovej 1-bunkovej MEA. Tieto výsledky predstavujú nové paradigmy pre riadenie testovania kontroly kvality. Je teda zrejme, že sledovanie počiatkových fáz delenia by mohlo poskytnúť účinnejší nástroj pre kontrolu kvality<sup>23,47,48</sup>, nakoľko časový úsek prvých troch bunkových delení je dynamický a odráža počiatkové vývojové schopnosti embrya. Aplikácia time-lapse analýzy umožňuje sledovanie citlivosti jednotlivých vývojových udalostí na kvalitu kultivačných podmienok v čase. Naproti tomu proces tvorby blastocysty nie je dostatočne citlivým meradlom životaschopnosti<sup>39,49</sup>.

Jednou z ďalších možností optimalizácie citlivosti testov je aj zmena testovaných myší. Experimenty ukázali, že embryá od nepríbuzných (outbredných) rodičov myší sú podstatne citlivejšie na *in vitro* stres, než od príbuzných (inbredných) rodičov alebo F1/hybridných embryí<sup>38</sup>. Aplikácia modelu morfokinézy (MK) na MEA iných druhov myší tiež môže umožniť zvýšenie citlivosti testov, avšak využitie embryí iných druhov myší ako rutinného nástroja pre kontrolu kvality môže byť problematické pre ich obmedzenia pri používaní<sup>29</sup>.

## 5. Čistenie olejov

Napriek tomu, že väčšina výrobcov prečisťuje minerálny olej pred balením, názory embryológov na dodatočnú purifikáciu oleja tesne pred použitím sa rôznia. Fleming s kolektívom ako prví uvádzajú možnosť detoxikácie oleja dodatočným premývaním<sup>23</sup>. V neskorších štúdiách vedci pozorovali lepší vývoj myších embryí za použitia premytého minerálneho oleja<sup>4</sup>. Účinok premývania bol dokázaný aj neskôr, keď sa znížilo množstvo TX-100, a tiež olej obsahujúci peroxidy bol po prečistení menej toxický pre vývoj embryí. V prípade peroxidov v olejoch však nie je známe, či zníženie toxicity premytého oleja je spôsobené znížením množstva jedného alebo všetkých prítomných toxínov (peroxidová aktivita, nasýtené alebo nenasýtené aldehydy)<sup>26</sup>.

Napriek tomu, že sa používa mnoho rôznych premývacích metód, či už výrobcami na začiatku alebo koncovými užívateľmi, je len málo dôkazov uprednostňujúcich jeden spôsob čistenia pred druhým. Otsuki s kolektívom ukázali, že albumín by mohol pôsobiť ako akési sito pre vstup možných nečistôt z oleja do médiá. Na druhej strane ale bolo dokázané, že albumín môže potenciálne prispieť k oxidácii oleja, a preto bolo odporúčané, aby bol vylúčený z premývacích roztokov<sup>22</sup>. V ďalších experimentoch bola na premývanie olejov od Tritonu X-100 a peroxidov používaná voda a niektoré typy kultivačných médií, nebol však preukázaný rozdiel v ich účinnosti. Mnohí výrobcovia odporúčajú použiť na dodatočné premývanie vodu, pretože pri použití viacerých kultivačných médií by mohlo dôjsť k nežiaducej prenosu zložiek z médií<sup>21</sup>.

## 6. Záver

Technika *in vitro* fertilizácie patrí medzi progresívne biotechnologické metódy, ktoré v posledných rokoch našli široké praktické uplatnenie tak v humánnej, ako aj veterinárnej medicíne. Priebeh *in vitro* fertilizácie okrem rastového potenciálu embryí ovplyvňuje aj množstvo ďalších faktorov súvisiacich s kultiváciou. Jedným z nich je minerálny olej používaný ako ochranná vrstva zabraňujúca odparovaniu kultivačného média, udržiavajúca stále pH a osmotický tlak. V tomto prehľadnom článku sú zhrnuté skúsenosti a experimentálne údaje týkajúce sa používania minerálneho oleja. Niekoľkí autori popísali toxický účinok

kontaminantov oleja, ako sú zinok, Triton X-100 a peroxidy. Skúsenosti poukazujú aj na to, že kvalita oleja nie je štandardná a pred použitím novej šarže, prípadne balenia je potrebné olej pretestovať. Pre zachovanie kvality sa veľký dôraz kladie na správne uchovávanie oleja (4 °C, skladovanie v suchu a tme), šetrnú prepravu a správnu manipuláciu. Výsledky získané v našom laboratóriu potvrdzujú toxický vplyv minerálneho oleja vystaveného UV žiareniu po dobu 24 hodín. Bovinné oocyty a embryá kultivované v mikrokvapkách prekrytých týmto olejom vykazovali zníženú fertilizačnú schopnosť (12,5 % vs. 96,3 %, Mann-Whitney,  $P \leq 0,001$ ) a spomalenie až zastavenie delenia buniek v porovnaní s kontrolou.

*Realizácia projektu bola finančne podporená grantom VEGA 2/0006/12.*

## LITERATÚRA

1. Bavister B. D., Rose-Hellekant T. A., Pinyopummintr T.: *Theriogenology* 37, 127 (1992).
2. Rief S., Sinowatz F., Stojkovic M., Einspanier R., Wolf E., Prelle K.: *Reproduction* 124, 543 (2002).
3. Fukuda Y., Ichikawa M., Naito K., Toyoda Y.: *Biol. Reprod.* 42, 114 (1990).
4. Lee S. T., Cho M. Y., Kim E. J., Kim T. M., Lee C. K., Han J. Y., Lim J. M.: *J. Vet. Med. Sci.* 66, 63 (2004).
5. Fukui Y., McGowan L. T., James R. W.: *J. Reprod. Fertil.* 92, 125 (1991).
6. Hwu Y., Lee R. K., Chen C., Su J., Chen Y., Lin S.: *Hum. Reprod.* 13, 1916 (1998).
7. Hammond J. Jr.: *Nature* 163, 28 (1949).
8. Whitten W. K.: *J. Endocrinol.* 16, 80 (1957).
9. Gwatkin R. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 576 (1963).
10. Brinster R. L.: *Exp. Cell Res.* 32, 205 (1963).
11. Biggers J. D., v knihe: *The mammalian preimplantation embryo: regulation of growth and differentiation in vitro* (Baroster B. D., ed.), kap. 1. Plenum Press, New York 1987.
12. Sifer C., Pont J. C., Porcher R., Martin-Pont B., Benzacken B., Wolf J. P.: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 147, 52 (2009).
13. Kane M. T.: *Theriogenology* 27, 49 (1987).
14. Miller K. F., Goldberg J. M., Collins R. L.: *J. Assist. Reprod. Genet.* 11, 342 (1994).
15. Miller K. F., Pursel V. G.: *Gamete Res.* 17, 57 (1987).
16. Borque C., Pintado B., Garcia P., Sanchez R.: *Theriogenology* 45, 206 (1996).
17. Provo M. B., Herr C.: *Theriogenology* 49, 214 (1998).
18. Shimada M., Kawano N., Terada T.: *Reproduction* 124, 557 (2002).
19. Van Soom A., Langendonck A., Mahmoudzadeh A. R., Deluyker H., Dessy F., de Kruif A.: *Theriogenology* 41, 325 (1994).
20. Van Soom A., Mahmoudzadeh A. R., Christophe A., Ysebaert M. T., de Kruif A.: *Reprod. Domest. Anim.*

- 36, 169 (2001).
21. Morbeck D. E., Leonard P. H., v kniže: *Embryo culture* (Smith G. D., Swain J. E., Pool T. B., ed.), kap. 18. Humana Press, LLC 2012.
  22. Otsuki J., Nagai Y., Chiba K.: *Fertil. Steril.* 91, 1745 (2009).
  23. Fleming T. P., Pratt H. P., Braude P. R.: *Fertil. Steril.* 47, 858 (1987).
  24. Gardner D. K., Reed L., Linck D., Sheehan C., Lane M.: *Semin. Reprod. Med.* 23, 319 (2005).
  25. Erbach G. T., Bhatnagar P., Baltz J. M., Biggers J. D.: *Hum. Reprod.* 10, 3248 (1995).
  26. Morbeck D. E., Khan Z., Branidge D. R., Walker D. L.: *Fertil. Steril.* 94, 2747 (2010).
  27. Otsuki J., Nagai Y., Chiba K.: *Fertil. Steril.* 88, 741 (2007).
  28. Hall J., Gilligan A., Schimmel T., Cecchi M., Cohen J.: *Hum. Reprod.* 13, 146 (1998).
  29. Wolff H. S., Fredrickson J. R., Walker D. L., Morbeck D. E.: *Hum. Reprod.* 28, 1776 (2013).
  30. Funahashi H., Cantley T., Day B. N.: *J. Reprod. Fertil.* 101, 159 (1994).
  31. Cupperová P., Antalíková J., Simon M., Jankovičová J., Michalková K., Horovská E.: *XX<sup>th</sup> Symposium of biology and immunology of reproduction with international participation, Třešť, 22.-24. May 2014*, Book of Abstracts (bez editora), str. 60.
  32. Cupperová P., Antalíková J., Simon M., Michalková K., Jankovičová J., Horovská E.: *Reprod. Domest. Anim.* 49(3), 62 (2014).
  33. Lane M., Mitchell M., Cashman K. S., Feil D., Wakefield S., Zander-Fox D. L.: *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 23 (2008).
  34. Davidson A., Vermesh M., Lobo R., Paulson R.: *Fertil. Steril.* 49, 516 (1988).
  35. Scott L. F., Sundaram S. G., Smith S.: *Fertil. Steril.* 60, 559 (1993).
  36. Fleetham J. A., Pattinson H. A., Mortimer D.: *Fertil. Steril.* 59, 192 (1993).
  37. Naz R. K., Janousek J. T., Moody T., Stillman R. J.: *Fertil. Steril.* 46, 914 (1986).
  38. Khan Z., Wolff H. S., Fredrickson J. R., Walker D. L., Daftary G. S., Morbeck D. E.: *Fertil. Steril.* 99, 847 (2013).
  39. Lane M., Gardner D. K.: *J. Reprod. Fertil.* 109, 153 (1997).
  40. Gardner D. K., Weissman A., Howles C. M., Shoham Z. (ed.): *Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical perspectives*. Taylor & Francis, New York 2004.
  41. Claassens O. E., Wehr J. B., Harrison K. L.: *Hum. Reprod.* 15, 1586 (2000).
  42. Lierman S., De Sutter P., Dhont M., Van der Elst J.: *Fertil. Steril.* 88, 1266 (2007).
  43. Morimoto Y., Hayashi E., Ohno T., Kawata A., Hori-koshi Y., Kanzaki H.: *Hum. Cell.* 10, 271 (1997).
  44. Arav A., Aroyo A., Yavin S., Roth Z.: *Reprod. Bio-Med. Online* 17, 669 (2008).
  45. Gonzales D. S., Pinheiro J. C., Bavister B. D.: *J. Reprod. Fertil.* 105, 1 (1995).
  46. Lemmen J. G., Agerholm I., Ziebe S.: *Reprod. Bio-Med. Online* 17, 385 (2008).
  47. McKiernan S. H., Bavister B. D.: *Hum. Reprod.* 9, 2123 (1994).
  48. Taft R. A.: *Theriogenology* 69, 10 (2008).
  49. Lane M., Gardner D. K.: *Hum. Reprod.* 11, 1975 (1996).

**P. Cupperová, J. Antalíková, M. Simon, J. Jankovičová, and K. Michalková (Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji): Effect of Mineral Oil on *In Vitro* Fertilization and Embryo Cultivation**

The present review deals with the harmful effects of mineral oils used as protective layers in fertilization *in vitro*. The results have shown the importance of the high quality and purity of the mineral oils used for the purpose. Contaminants reducing the oil quality include peroxides, Zn and Triton X-100. The review also highlights the deleterious effects of UV radiation on the oil which are usually less considered. Further the importance of storage and transportation for maintaining a high-quality oil is emphasized.