مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (1) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (1) 2015

الآلية الجزيئية للإنضاج المختبري لبييضات الأبقار والظواهر الفيزيولوجية المرافقة لها

الدكتور محمد سلهب[*]
الدكتور زهير جبور[**]

(تاريخ الإيداع 1 / 10 / 2014. قبل للنشر في 16 / 2 / 2015)

□ ملخّص □

يُستخدم الإنضاج المختبري للبييضات بشكل واسع في تقانات التناسل عند الأبقار ويعدّ مرحلة أساسية في إنتاج الأجنة مختبرياً ويخدم عمليات التحسين الوراثي وتشكيل البنوك الوراثية في الحيوانات الزراعية والتي يمكن أن تشكل رصيداً احتياطياً لعشرات السنين. يهدف إنضاج البييضات مختبرياً إلى الحصول على بييضات قابلة للإخصاب وقادرة على دعم مراحل تطور الجنين المبكرة ريثما يتم تفعيل جينوم الجنين، ويصبح مستقلاً، وقادراً على دعم نشاطه ومراحل تطوره المتتابعة. يتجلَى إنضاج البييضة بتغيرات على مستوى النواة والسيتوبلازم وخلايا الركام البيضي (الكومولوس) المحيطة بالبييضة. لاتزال الآلية الجزيئية لهذه التغيرات تشكل محور دراسات وأبحاث كثيرة. هدفت هذه الدراسة البحثية إلى تسليط الضوء على أهم الأبحاث العلمية والدراسات الجينية المعمَقة المرتبطة بالآلية الجزيئية للإنضاج المختبري لبييضات الأبقار وأهم الظواهر الفيزيولوجية المرافقة.

الكلمات المفتاحية: إنضاج – بييضة – كومولوس (ركام بيضي).

[*] باحث- قسم الإنتاج الحيواني- مركز البحوث العلمية الزراعية – اللاذقية – سورية.
[**] أستاذ مساعد – قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (1) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (1) 2015

Review about the molecular mechanism of In vitro maturation of bovine oocytes and accompanied physiological changes

Dr. Mohammad Salhab*
Dr. Zohair Jabbour **

(Received 1 / 10 / 2014. Accepted 16 / 2 /2015)

□ ABSTRACT □

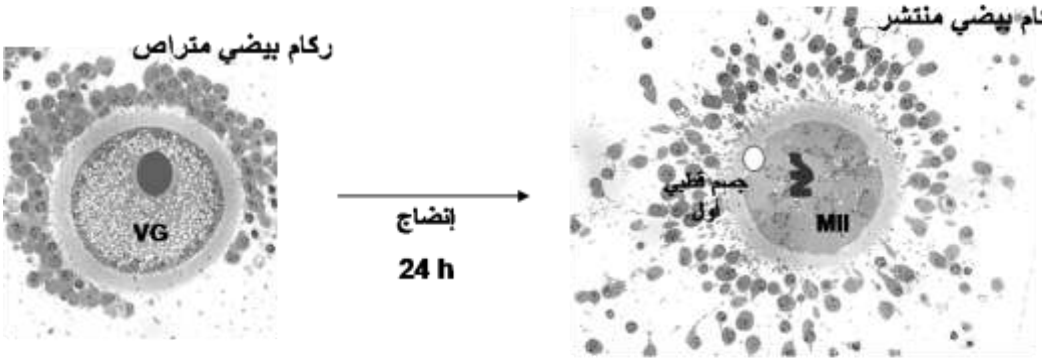
In vitro maturation of oocytes is widely used in reproductive technologies in cattle, constituting a crucial step in in-vitro embryos production. It is useful for both genetic improvement and establishment of gene banks that constitute a reserve for many years. In vitro maturation of oocytes permits to obtain fertilizable oocytes that support the early stages of embryo development until embryo genome activation, and the embryo becomes independent and able to support its development. Oocyte maturation is represented by changes at three levels: nucleus, cytoplasm and cumulus cells surrounding the oocyte. The molecular mechanism of these changes is still the focus of many studies and researches. The aim of this review is to show some recent scientific researches on molecular mechanism of oocyte maturation and accompanied physiological changes.

Keywords: Maturation, Oocyte, Cumulus.

***Researcher, Department of Animal Production, Cent. Res. Lattakia , Syria.**
****Associate Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, University of Tishreen, Lattakia , Syria.**

مقدمة:

تستكمل البييضة خلال الإنضاج المختبري انقسامها المنصّف بعد توقفه في الطور التمهيدي من الانقسام المنصّف الأوّل، لتصل في نهاية الإنضاج (بعد 24 ساعة) إلى الطور الاستوائي من الانقسام المنصّف الثاني (MII) مع ملاحظة خروج الجسم القطبي الأول، وهذا ما يسمى بالانضاج النووي للبييضة. تبقى البييضة في هذا الطور (MII) إلى حين تنشيطها من قبل النطفة أثناء الإخصاب المختبري لتستكمل الانقسام المنصّف بشكل كامل وتعطي الجسم القطبي الثاني. يتراكم خلال الإنضاج في سيتوبلازم البييضة كميات من الـ RNA، البروتينات والليبيدات وغيرها من الجزيئات التي تستخدم من أجل سير عملية الإخصاب ودعم المراحل المبكرة للتطور الجنيني وهذا ما يسمى بالإنضاج السيتوبلازمي للبييضة. يعتمد الجنين بشكل أساسي في مراحل تطوره المبكرة على مخزون البييضة من هذه المركبات باعتبار أن جينوم الجنين لا يتفعّل إلاّ بمرحلة الـ 4 خلايا ليصل إلى مستوى أعظمي في مرحلة الـ 8 خلايا، عندها يصبح الجنين مستقلاً قادراً على دعم نشاطه ومراحل تطوره المتتابعة (Richard, 2007 ; Gosden, 2002 ; Kawamura et al., 2004). في نهاية الإنضاج المختبري، تمتلئ المساحة الفاصلة بين خلايا الركام البيضي المحيطة بالبييضة بمكونات بروتينية وسكرية على شكل معقدات ذات طابع لزج مكوّنة ما يسمى بالمشبك خارج خلوي ECM (Extracellular Matrix)ما يؤدي إلى ازدياد حجمي جذري مسبباً تباعد خلايا الركام البيضي عن بعضها البعض من جهة وعن البييضة من جهة أخرى وهذا ما نسميه بظاهرة انتشار الركام البيضي (Cumulus Expansion) (Richards, 2005) (الشكل1). يشكل المشبك ECM بيئة ميكرونية تحيط بالبييضة وتحميها من تأثيرات الوسط المحيط وبشكل خاص عوامل الإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress) أو الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) الملاحظة خلال فترة الإنضاج. فضلاً عن دوره في الحفاظ على اندماجية خلايا الركام البيضي مع البييضة وبالتالي استمرارية خلايا الركام البيضي بتمرير الإشارات والجزيئات إلى البييضة واستكمال تحقيق إنضاجها النهائي. كما يسهم النشاط الأنزيمي للمشبك في إعطاء المقدرة الإخصابية للنطفة (Tanghe et al., 2002 ; Russell and Salustri, 2006 ; ; Buccione et al., 1990). أثبتت دراسات عديدة أن نسبة البييضات التي استكملت انقسامها المنصّف حتى الطور (MII) بعد الإنضاج المختبري وصلت إلى 90%، بينما نسبة البييضات التي أخصبت وانقسمت بعد الإخصاب المختبري وصلت الى 80 % -75 إلاّ أن نسبة 30-40% من البييضات فقط تطورت بعد الإخصاب المختبري إلى طور الأرومة (Blastocyst) (الطور الذي يتم عنده نقل وزراعة الجنين في رحم البقرة) ، في حين أن نسبة الأرومات وصلت إلى 70% في حال الإخصاب والتطور المختبري لبييضات منضجة داخل جسم البقرة الحيّة (in vivo) (Salhab et al., 2011 ; Rizos et al., 2002 ; Mermillod et al., 1999). بينت هذه الدراسات أن نسبة الأرومات الناتجة عن إخصاب وتطور مختبري لبييضات منضجة مختبرياً (in vitro) أقل مما هي عليه في حال الإخصاب والتطور المختبري لبييضات منضّجة داخل جسم البقرة (in vivo). هذا الاختلاف ناتج بدون شك عن أصل إنضاج البييضة ما يؤكد أن إنضاج البييضة هو العامل المحدد لإنتاج الأجنة مختبرياً. تهدف هذه الدراسة البحثية إلى توضيح آلية تطبيق إنضاج بييضات الأبقار في ظروف المختبر والتغيرات الشكلية والظواهر الفيزيولوجية المرافقة وعرض أهم الأبحاث والدراسات الجزيئية المرتبطة بالإنضاج النووي والسيتوبلازمي للبييضة وانتشار خلايا الركام البيضي المحيطة بها.



الشكل (1): التغيرات الشكلية للبييضة بعد الإنضاج المختبري

تقنية الإنضاج المختبري لبييضات الأبقار:

يعدّ إنضاج البييضات المستخلصة من المبايض المجموعة من مسالخ الأبقار نموذجاً عملياً واسع الاستخدام في مجال إنتاج الأجنة البقرية مختبرياً. إذ تجمع المبايض وتنقل مباشرة إلى المختبر في محلول ملحي (9% NaCl) درجة حرارته 32-35 درجة مئوية. تشفط الجريبات ذات القطر 2-6 مم باستخدام إبرة شفط ومضخة إخلاء خاصة ويتم استقبال نواتج الشفط في أنبوب اختبار 50 مل. تفرز البييضات تحت المجهر وتغسل عدة مرات في الوسط (TCM199) ويتم اختيار البييضات ذات المظهر المتجانس والمحاطة بأكثر من 3 طبقات من خلايا الركام البيضي، ومن ثم وضعها للإنضاج المختبري في حاضنة درجة حرارتها 38,8 درجة مئوية ضمن هواء رطب بنسبة 5% من CO_2 ولمدة 24 ساعة. يطلق على البييضة مع خلايا الركام البيضي اسم معقد بييضة - كومولوس COC (Cumulus-Oocyte Complex). يستخدم عادة الوسط TCM199 في الإنضاج المختبري لبييضات المجترات وتضاف إليه مكونات أخرى كالهرمونات، البروتينات وسوائل بيولوجية أخرى بهدف تحسين مقدرة البييضة على التطور بعد الإخصاب المختبري. تقيّم عادة مقدرة البييضة على التطور من خلال مقدرتها على الوصول إلى طور الأرومة Blastocyst(Mermillod et al., 2008). يعتبر مصل الجنين البقري (FBS) المكوّن الأكثر إضافة الى وسط الانضاج TCM199 إذ أبدت البييضات المنضّجة بوجود مصل الجنين البقري (FBS) مقدرة أعلى على التطور بعد إخصابها مختبرياً (Salhab et al., 2011) وكذلك الأمر بالنسبة للسائل الجريبي (Sutton et al., 2003). إلاّ أن التركيبة المعقدة لهذين المكوّنين تحول دون إمكانية تحديد المركب الأساسي المسؤول عن إعطاء البييضة المقدرة على التطور. كما زادت إضافة الهرمونات الموجهة للقند (LH/FSH) إلى وسط الإنضاج انتشار الركام البيضي ورفع مقدرة البييضة على التطور بعد الإخصاب (Sirard et al., 2007). بينما أدت إضافة هرمون الاستراديول إلى انخفاض نسبة البييضات البقرية الواصلة للطور (MII) (Beker et al., 2002). كما أدت إضافة تراكيز مختلفة من هرمون البروجسترون إلى انخفاض ملحوظ في نسبة الأرومات بعد الإخصاب المختبري لبييضات الابقار (Silva and Knight, 2000) على عكس هرمون النمو GH الذي أثبت فاعلية ملحوظة عند إضافته إلى وسط الإنضاج حيث ازدادت نسبة الأرومات البقرية من 58% إلى 73% (Bevers and Izadyar, 2002). كما أن إضافة عوامل النمو (EGF) بتركيز 10 نانو غرام/مل، زاد نسبة الأرومات البقرية من 64% إلى 80%

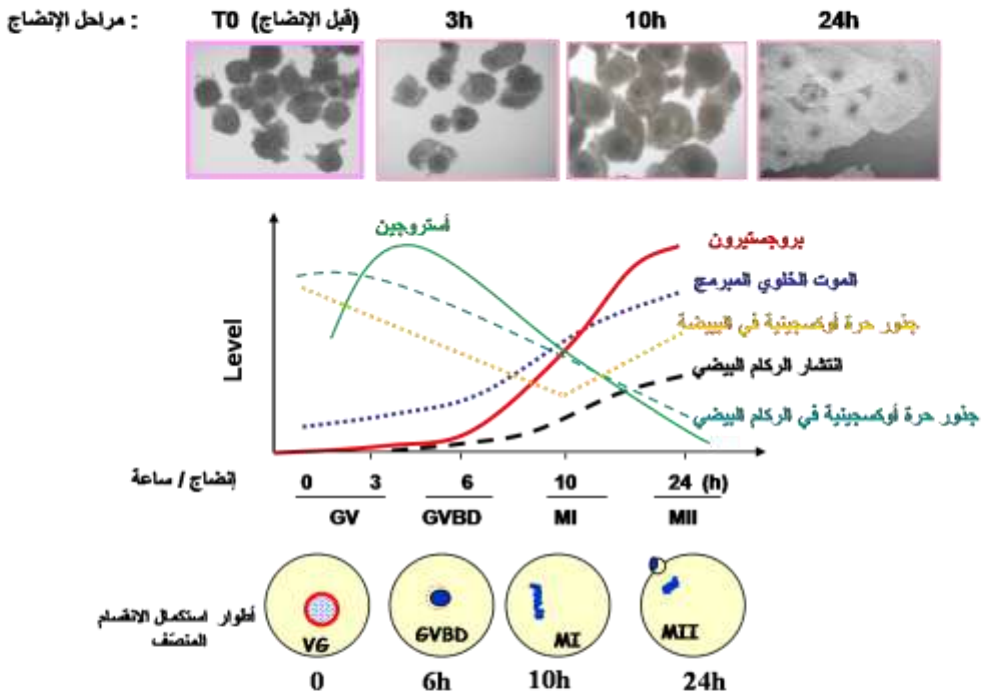
(Lonergan et al., 1996) ومن 14% إلى 32% (Salhab et al., 2011). كما أن تزويد وسط الإنضاج بمزيج من مكونات مختلفة تضم عوامل نمو وهرمونات وعناصر ومغذيات وفقاً لما تم وصفه من قبل (Donnay et al., 1998) أدى إلى زيادة نسبة الأرومات من 14% إلى 39% (Salhab et al., 2011).

مراحل الإنضاج المختبري:

قبل الإنضاج المختبري تكون خلايا الركام البيضي المحيطة بالبييضة متراصة ومتماسكة مع بعضها البعض من جهة ومع البييضة من جهة أخرى، في حين تشكل نواة البييضة المحاطة بغلافها النووي ما يسمى بالحويصلة الجرثومية Germinal Vesicle (GV). بعد 3 ساعات من الإنضاج المختبري تتكثّف الكروموزومات داخل الحويصلة الجرثومية. أمّا تهشم غلاف الحويصلة الجرثومية واندماجها في سيتوبلازم البييضة، فيمكن ملاحظته بعد 6 ساعات من الإنضاج المختبري، وهذا ما يسمى بمرحلة تحطم الحويصلة الجرثومية (Germinal Vesicle Breakdown) BDGV. بعد 10 ساعات من الإنضاج المختبري تستكمل البييضة انقسامها المنصّف لتصل إلى الطور الاستوائي من الانقسام المنصّف الأول (MI) وتبدأ خلايا الركام البيضي بالتباعد عن بعضها البعض من جهة، وعن البييضة من جهة أخرى، إذ يصل مستوى التباعد إلى حده الأعظمي بعد 24 ساعة من الإنضاج المختبري، في حين تكون البييضة قد وصلت في انقسامها المنصّف إلى الطور الاستوائي من الانقسام المنصّف الثاني (MII) مع ملاحظة تحرر الجسم القطبي الأول. تبقى البييضة في طور الـ MII إلى حين تنشيطها من قبل النطفة أثناء الإخصاب المختبري لتستكمل الانقسام المنصّف بشكل كامل وتعطي الجسم القطبي الثاني. يتم انتقال البييضة من طور الـ MI إلى طور الـ MII بشكل سريع دون المرور بمرحلة تضاعف الـ DNA وبغياب إعادة تشكيل الغلاف النووي للبييضة، ومن هنا تتجلّى خصوصية الإنضاج المنصّف للبييضة (Salhab et al., 2011).

الظواهر المرافقة للإنضاج المختبري:

يترافق الإنضاج المختبري للمعقدات (COC) بظواهر مختلفة ، منها ما هو ناتج عن الشروط الصنعية للإنضاج كظاهرة الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) والإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress) ، ومنها ما هو ناتج عن عمليات حيوية أساسية لمجريات الإنضاج كإنتاج الهرمونات الستيروئيدية (الشكل 2).



الشكل (2): مراحل الإنضاج المختبري للبييضة والظواهر الفيزيولوجية المرافقة (Salhab et al., 2011)

1) الموت الخلوي المبرمج Apoptosis

يترافق الإنضاج المختبري للمعقدات (COC) بازدياد نسبة خلايا الركام البيضي المصابة بظاهرة الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis). تنشأ تلك الظاهرة نتيجة تنشيط إنزيم الEndonuclease داخل نواة الخلية مؤدياً إلى تخريب وتقطيع الحمض النووي DNA. يمكن أن تحدث أيضاً ظاهرة الـ Apoptosis كنتيجة لظاهرة الإجهاد التأكسدي التي ينتج عنها تراكم الجذور الحرة الأوكسجينية والتي بدورها تقوم بتخريب وتقطيع الحمض النووي DNA. وقد ازداد مستوى الـ Apoptosis في خلايا الركام البيضي البقرية بشكل معنوي بعد 12 ساعة من الإنضاج المختبري ووصل إلى حد أعظمي في نهاية الإنضاج (Ikeda et al., 2003). كما أن مستوى الـ Apoptosis كان أعلى في وسط الإنضاج TCM199 منه في وسط الإنضاج TCM199 المزوّد بمصل الجنين البقري (37,2% مقابل 8,3%) (Salhab et al., 2011). كما أن التعبير الجيني لجينات لها دور في ظاهرة الـ Apoptosis (BAX، CLU، TMSB4، TMSB10، CTSB، CTSS، CTSZ) تم إثباته في خلايا الركام البيضي خلال الإنضاج المختبري (Salhab et al., 2011 ; Salhab et al., 2010 ; Bettegowda et al., 2008). أوضح Auclair وزملاؤه (2013) أن إنضاج بييضات عارية من خلايا الركام البيضي أعطى نسبة أقل من الأرومات (Blastocyst) بعد الإخصاب والتطور المختبري مقارنة بالبييضات التي نُضّجت مع خلايا الركام البيضي المحيطة بها (20% مقابل 40%). كما أن المستوى المرتفع لظاهرة الـ Apoptosis في خلايا الركام البيضي خلال الإنضاج كان يرافقه دوماً نسبة أقل من الأرومات (Blastocyst) بعد الإخصاب والتطور المختبري (Salhab et al., 2011 ; Balboula et al., 2010 ; Ikeda et al., 2006). إن ظاهرة الـ Apoptosis ظاهرة ناتجة عن الظروف الصنعية الخاصة بالإنضاج المختبري وهذا ما أكده Szoltys وزملاؤه (2000) عند عدم ملاحظته لظاهرة الـ Apoptosis في خلايا الركام البيضي قبل ساعة من حدوث الإباضة لدى الجرذان.

2) الإجهاد التأكسدي Oxidative Stress

لوحظت ظاهرة الإجهاد التأكسدي خلال الإنضاج المختبري عبر نشاط بعض الإنزيمات المضادة للأكسدة (Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase,.) في كلّ من البييضة وخلايا الركام البيضي المحيطة بها (Cetica et al., 2001). وقد تم إثبات التعبير الجيني للجين (*PRDX6*) المسؤول عن إنتاج الإنزيم (Peroxiredoxin 6) المضاد للأكسدة في خلايا الركام البيضي البقرية في نهاية الإنضاج المختبري (Leyens et al., 2004). تنشأ ظاهرة الإجهاد التأكسدي نتيجة فعل الجذور الحرة الأوكسجينية التي هي عبارة عن مركبات كيميائية غير مستقرة تمتلك إلكتروناً حراً (غير مزدوج) ما يحتّم عليها مهاجمة مكونات الخلية الاساسية (بروتينات، لبيدات وDNA) بهدف إشباع إلكترونها الحر، ما ينجم عنه تخريب في مكونات الخلية الأساسية (Combelles et al., 2009). تشكل الأنشطة الاستقلابية داخل الخلية وبشكل خاص استقلاب الجلوكوز (الذي يتم عادة إضافته إلى وسط الإنضاج) مصدراً أساسياً لإنتاج الجذور الحرة (Guerin et al., 2001) فضلاً عن وجود مسببات أخرى لإنتاج الجذور الحرة كالإضاءة المرئية(Nakayama et al., 1994) أو وجود عنصر الحديد أو النحاس بشكل حر في وسط الإنضاج (Nasr-Esfahani et al., 1990) أو التوتر الأوكسجيني في ظروف الإنضاج المختبري (Hashimoto, 2009). يتم إبطال فعل الجذور الحرة بشكل طبيعي في الخلية نتيجة منظومة عمل معقدة للإنزيمات المضادة للأكسدة وبعض الفيتامينات (فيتامين E وفيتامين C). تصاب الخلية بظاهرة الإجهاد التأكسدي في حال عدم التوازن بين كمية الجذور الحرة وكمية الإنزيمات والفيتامينات المضادة للأكسدة (Knoop, and Donnay 2007). كما انخفض مستوى الجذور الحرة الأوكسجينية بشكل معنوي جداً في بييضات الأبقار بعد 12 ساعة من الإنضاج المختبري عند إضافة مركب السيستئين (Cysteine) إلى وسط الإنضاج (Morado et al., 2009)إذ أن مركب السيستئين يستخدم من قبل البييضة لتصنيع الغلوتاثيون، والذي أثبت دوره في إبطال فعل الجذور الحرة (Krisher, 2004). كما أن مستوى التعبير الجيني للجين GSTA1 المسؤول عن إنتاج الإنزيم (Glutathione S-Transferase A1)، المعروف بدوره في إبطال فعل الجذور الحرة الأوكسجينية انخفض بشكل تدريجي خلال الإنضاج المختبري في خلايا الركام البيضي وبشكل متزامن مع مستوى الإنزيمات الستيروئيدية، وبشكل خاص ومعنوي جداً بعد 10 ساعات من الإنضاج المختبري ما يدعو لدور محتمل لـ GSTA1 في إبطال فعل الجذور الحرة المتشكلة خلال تركيب واستقلاب الإنزيمات الستيروئيدية داخل خلايا الركام البيضي خلال الإنضاج المختبري (Salhab et al., 2011).

3) إفراز الستيروئيدات Steroids Secretion

يترافق الإنضاج المختبري للمعقدات (COC) بازدياد إفراز خلايا الركام البيضي لهرمون البروجسترون في وسط الإنضاج (Salhab et al., 2010) وانخفاض إفراز الأستروجين (Schoenfelder et al., 2003).

يبدأ إنتاج الهرمونات الستيروئيدية في الخلية بنقل الكوليستيرول إلى الغشاء الداخلي للميتوكوندريا بوساطة الإنزيم **STAR** (Steroidogenic Acute Regulatory Protein).

يقوم الإنزيم **P450-SCC** (p450 Side Chain Cleavage) بتحويل الكوليستيرول إلى **Pregnenolone** ومن ثم يتم تحويل الـ **Pregnenolone** إلى بروجستيرون بفعل الإنزيم **3β-HSD** (3β- hydroxysteroid-deshydrogenase) يتحول البروجستيرون إلى أندروجينات بفعل الإنزيم-17α hydroxylase) **p450C17α**) في حين أن الأندروجينات تتحول إلى أستروجينات بفعل الإنزيم **p450-arom**.

يزداد التعبير الجيني للجين STAR بشكل معنوي جداً في خلايا الركام البيضي في نهاية الإنضاج المختبري، بينما ينخفض بالنسبة للجين CYP19A1 المسؤول عن إنتاج الإنزيم **p450–arom** (Salhab et al., 2011). إن دور الستيروئيدات في عملية استكمال البييضة لانقسامها المنصّف تم إثباته من قبل Wang وزملاؤه (2006) إذ أدت إضافة مثبطات لإنتاج الستيروئيدات إلى وسط الإنضاج المختبري، إلى انخفاض معنوي في نسبة البييضات المستكملة لانقسامها المنصّف حتى الطور (MII). كما أن إنتاج الستيروئيدات من قبل خلايا الركام البيضي يتم ضبطه وتنظيمه من قبل عوامل تفرزها البييضة إذ أدى وضع خلايا الركام البيضي وحدها في الإنضاج بمعزل عن البييضات، إلى زيادة أكبر في إفراز البروجستيرون في وسط الإنضاج (Vanderhyden et al., 1993 ; Li et al., 2000).

الآلية الجزيئية لإنضاج البييضات

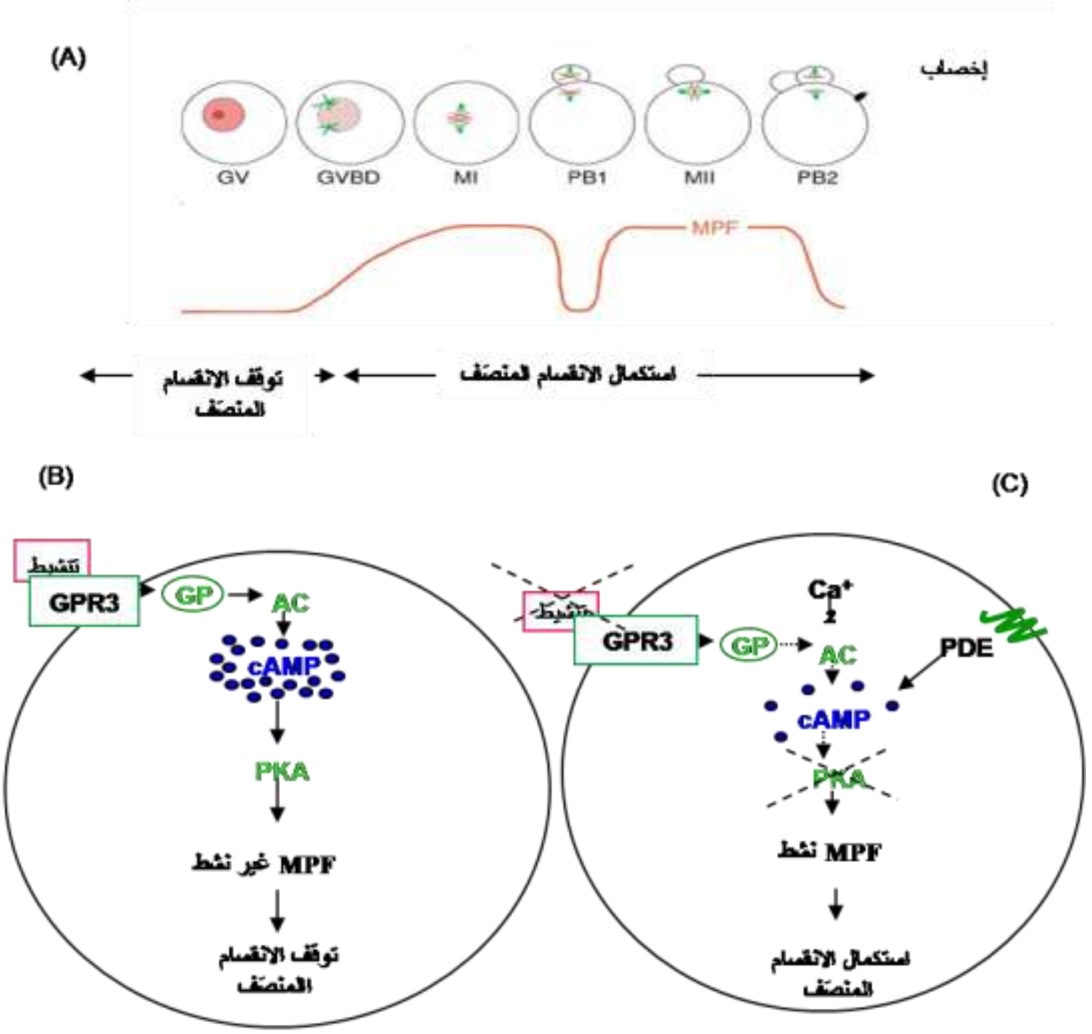
1- الإنضاج النووي (المنصّف)

لا تزال تشكل الآلية الجزيئية لاستكمال الانقسام المنصّف للبييضة محور دراسات وأبحاث كثيرة في العديد من بلدان العالم. تتفق أبحاث كثيرة فيما بينها على أن توقف الانقسام المنصّف للبييضة غير الناضجة عند الطور التمهيدي من الانقسام المنصّف الأول، يرتبط بتركيز مرتفع من مركب الـ cAMP (**C**yclic **A**denosine **M**ono**P**hosphate) داخل البييضة (Mehlmann et al., 2004 ; Richard, 2007 ; Zhang et al., 2010 ; Dekel, 2005)

ينجم عن التركيز المرتفع لـ cAMP زيادة نشاط الإنزيم PKA (**P**rotein **K**inase **A**) الذي يقوم بتثبيط نشاط المركب MPF (**M**aturation **P**romoting **F**actor) المسؤول عن استكمال الانقسام المنصّف (Dekel ,2005 ; Mehlmann, 2005). يعزى استكمال الانقسام المنصّف للبييضة حتى طور الـ MII، إلى زيادة نشاط إنزيم الـ PDE (Phosphodiesterase) الذي يقوم بتحطيم الـcAMP داخل البييضة (Richard et al., 2001). بينما تعزو دراسات أخرى استكمال الانقسام المنصّف إلى ارتفاع تركيز أيونات الكالسيوم داخل البييضة، وينجم عن ذلك تثبيط الإنزيم AC (**A**denylate **C**yclase) والذي يعتبر الإنزيم الأساس في تكوين الـ cAMP (Defer et al., 2000 ; Hanoune and Defer, 2001 ; Wang and Storm, 2003 ; Horner et al., 2003)

كما ترجع بعض الفرضيات استكمال الانقسام المنصف إلى عدم تفعيل المستقبل GPR3 (**G**– **P**rotein **R**eceptor 3) الموجود على الغشاء السيتوبلازمي للبييضة باعتباره مركباً يدخل في المسار التركيبي لـ cAMP (Mehlmann et al., 2004 ; Richard, 2007 ; Mehlmann, 2005). تساهم خلايا الركام البيضي في تثبيط أو استكمال الانقسام المنصّف للبييضة من خلال وجود أقنية بين خلوية بين خلايا الركام البيضي من جهة وبين البييضة من جهة أخرى، تسمح بمرور الإشارات الخلوية والجزيئات والأيونات ذات الوزن الجزيئي الصغير (أقل من 3 كيلو دالتون) (Buccione et al., 1990 ; Tanghe et al., 2002). كما أدى تثبيط إنزيم الفوسفوديستيراز (PDE4) إلى ارتفاع مستوى الـ cAMP في خلايا الركام البيضي (Richard et al., 2001 ; Thomas et al., 2002). يبدأ نشاط الـ MPF في لحظة تهشم الحويصلة الجرثومية حيث يكون أعظمياً خلال الطور MI والطور MII في حين ينخفض نشاطه بشكل حاد بين هذين الطورين. ويعتبر هذا الانخفاض الحاد أساسياً لفسح المجال أمام البييضة كي تستكمل انقسامها المنصّف الأول وتشكل الجسم القطبي الأول (الشكل 3). إنّ استعادة MPF لنشاطه مباشرة بعد تشكل الجسم القطبي الأول يسهم مباشرة في دخول البييضة في الانقسام المنصّف الثاني

دون المرور في الطور الفاصل بين انقسامي المنصّف الأول والثاني ما يفسّر غياب إعادة تشكل الغلاف النووي للبييضة وعدم تضاعف الـ DNA (Dekel, 2005).



الشكل (3): الآلية الجزيئية لاستكمال الانقسام المنصّف للبييضة (Dekel, 2005 ; Mehlmann, 2005). (A): مراحل استكمال الانقسام المنصّف للبييضة، (B): الآلية الجزيئية لتوقف الانقسام المنصّف للبييضة، (C): الآلية الجزيئية لاستكمال الانقسام المنصّف للبييضة.

2-الإنضاج السيتوبلازمي

تتصل خلايا الركام البيضي مع بعضها البعض من جهة ومع البييضة من جهة أخرى بوساطة أقنية بين خلوية تسمح بمرور الجزيئات والأيونات ذات الوزن الجزيئي الصغير (أقل من 3 كيلو دالتون) ما يسمح لخلايا الركام البيضي بممارسة دورها الفعّال في تحقيق الإنضاج السيتوبلازمي للبييضة. تستقلب خلايا الركام البيضي مركب الـ /Cystine/ إلى مركب الـ /Cysteine/ بحيث يمكن انتقاله الى البييضة واستخدامه من قبلها في تصنيع مادة بروتينية تدعى GSH (Glutathione) التي لها دور أساسي في حماية البييضة ضد الجذور الحرة (Tatemoto et al., 2000 ; de Matos et al., 1997). فضلاً عن دوره في تهيئة البادئة النووية للنطفة بعد الإخصاب من أجل اندماجها مع البادئة النووية للبييضة (Tanghe et al., 2002). لا تستطيع البييضة استقلاب سكر الجلوكوز، حيث يتم استقلابه من قبل خلايا الركام البيضي وفق مسارين اثنين:

- المسار الاستقلابي Glycolysis: ينتج عنه مركب البيروفات Pyruvate ،الذي يتم استخدامه من قبل البييضة كمصدر هام للطاقة.

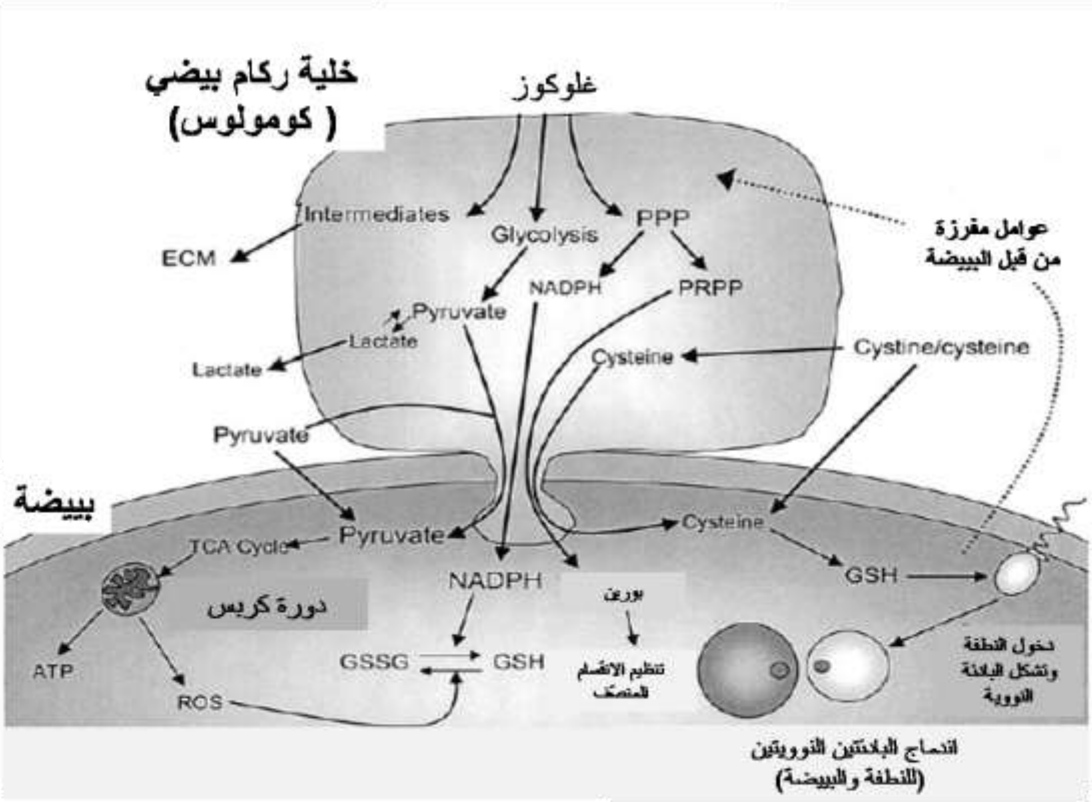
- المسار الاستقلابي PPP (Pentose Phosphate) ينتج عنه ثلاثة مركبات رئيسة:

1) مركب PRPP (Phosphoribosylpyrophosphate): يستخدم من قبل البييضة في تصنيع البورين (المركب الأساسي في تنظيم عملية استكمال الانقسام المنصّف للبييضة)

2) مركب NADPH: الذي يعتبر منظماً لاستقلاب الـ GSH داخل البييضة.

3) مركب Glucose−6−phosphate: المركب الأساسي لتشكيل السكريات الرايبوزومية والتي تدخل بدورها في تركيب الأحماض النووية (RNA, DNA) (Sutton et al., 2003) (الشكل 4).

تلعب أيضاً البييضة دوراً إيجابياً خلال فترة الإنضاج السيتوبلازمي، فهي تحفز النشاط الاستقلابي للجلوكوز في خلايا الركام البيضي، فقد وجد Zuelke وBrackett (1992) أن مستوى التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن إنزيمات استقلاب الجلوكوز قد تناقصت في خلايا الركام البيضي في حال الإنضاج المختبري بغياب البييضات. تقوم أيضاً البييضة بدور وقائي لخلايا الركام البيضي ضد ظاهرة الموت الخلوي Apoptosis إذ لوحظ أن مستوى التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن الإنزيمات المضادة لظاهرة الموت الخلوي تتناقص في خلايا الركام البيضي في حال تم الإنضاج المختبري بغياب البييضة (Hussein et al., 2005). مما سبق يتبيّن أن هناك علاقة تبادلية هامة ومعقدة، تشكل محور دراسات بحثية كثيرة، بين البييضة وخلايا الركام البيضي المحيطة بها. تلك العلاقة أساسية وهامة من أجل ضمان وظائفية مثلى لخلايا الركام البيضي وبالتالي تحقيق إنضاج أمثل للبييضة وإكسابها المقدرة على أن تخصب من قبل النطفة وتدعم مراحل تطور الجنين المبكرة.

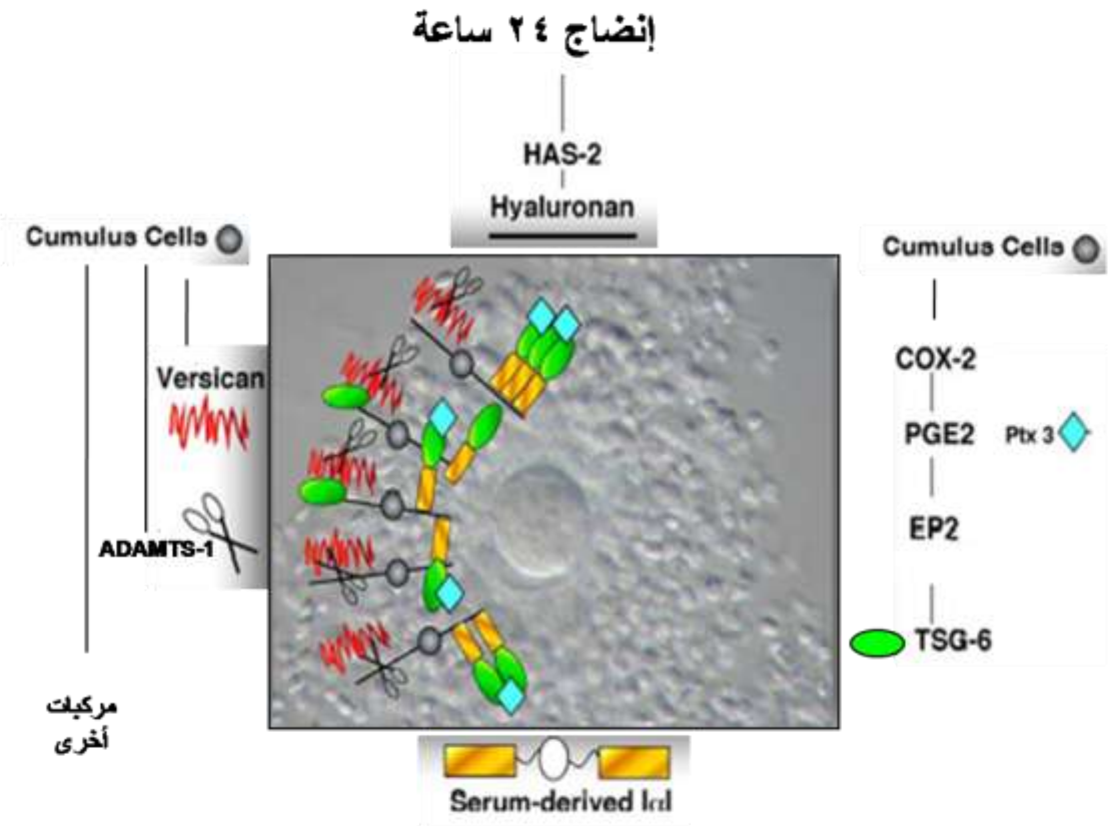


الشكل (4): الآلية الجزيئية لمساهمة خلايا الركام البيضي في الإنضاج السيتوبلازمي للبييضة (Sutton et al., 2003)

3-انتشار الركام البيضي

تعزى ظاهرة انتشار الركام البيضي إلى تشكل المشبك خارج خلوي (ECM) في نهاية الإنضاج المختبري، إذ يشكل الحمض HA (Hyaluronic Acid) المكوّن الأساسي لهذا المشبك، ويتم تصنيعه من قبل خلايا الركام البيضي انطلاقاً من سكر الجلوكوز بفضل الأنزيم HAS2 (Hyaluronan synthase 2). يقوم الإنزيم HAS2 ببلمرة الديسيكريدات ليشكل السلسلة الطويلة للحمض HA ذات الوزن الجزيئي الكبير (أكثر من 2* 10^6 دالتون) (Russell and Robker, 2007 ; Schoenfelder and Einspanier, 2003). يتم إفراز سلسلة الـ HA خارج خلايا الركام البيضي لتملأ المسافات بين الخلوية. ترتبط بعض البروتينات الموجودة في المسافات بين خلوية بهذه السلسلة الطويلة لتشكل مركباً أكثر ثباتاً وتوازناً. إذ يرتبط المركب TSG-6 (tumor necrosis stimulated gene/protein-6) بالحمض HA أو يشكل معقداً مع المركب IαI (serum-derived factor inter-α trypsin inhibitor) ومن ثم يرتبط هذا المعقد بالحمض HA (Richards, 2005). كما ترتبط مكونات أخرى بالحمض HA تم الكشف عنها في المشبك ECM مثل PTX-3 (Pentraxin 3) (Varani et al., 2002) والمستقبلات CD44 (Russell and Robker, 2007) وغيرها من الجزيئات الأخرى كالكولاجين (Collgen) والفيبرونيكتين (Fibronectin) والفيرسيكان (Versican) والتي تسهم بمجملها في زيادة ثباتية الحمض HA وتكوين مشبك أكثر توازناً. تنتج أيضاً خلايا الركام البيضي بالتوازي مع الحمض HA، الإنزيم Cox2 (Cyclooxygenase 2) المسؤول عن إنتاج البروستاغلاندين (PGE2). يرتبط البروستاغلاندين (PGE2) مع مستقبلاته (EP2) مؤدياً إلى إنتاج جزيئات أخرى من قبل خلايا الركام البيضي ومن ثم إفرازها في الوسط خارج خلوي وارتباطها مع الحمض HA وبالتالي زيادة ثباتيته Russell and Salustri, 2006 ; Zhuo and Kimata, 2001 ; Nuttinck et al., 2002). فعلى سبيل المثال يعزى إنتاج TSG-6 من قبل خلايا الركام البيضي إلى الفعل التحريضي للبروستاغلاندين (Ochsner et al., 2003). خلال الإنضاج المختبري، لا يقتصر إنتاج خلايا الركام البيضي على جزيئات تسهم في تشكيل وثباتية المشبك ECM وإنما يرافقه أيضاً إنتاج جزيئات مضادة في وظيفتها الفيزيولوجية. حيث تنتج خلايا الركام البيضي الإنزيم (ADAMTS-1) الذي يسهم في تحطيم بنائية المشبك ECM (Richards, 2005). كما وجد Salhab وزملاؤه (2013) أن التعبير الجيني للجينين (SERPIN5 وMPP9) يزداد بشكل معنوي في خلايا الركام البيضي في نهاية الإنضاج المختبري علماً أن كلا الجينين يسهمان في تحطيم المشبك ECM (الشكل 5). تعتبر عمليتي تشكيل وتهديم المشبك ECM ظاهرة هامة جداً تخدم حركية وانتقال البييضة (Migration) لحظة الإباضة ضمن القناة التناسلية فضلاً عن أهميتها في تنظيم بنائية وإعادة هيكلة المشبك Berkholtz et al., 2006). يسبق ظاهرة انتشار الركام البيضي تغيرات في بنائية ألياف الأكتين داخل خلايا الركام البيضي، هذه التغيرات يمكن ملاحظتها من خلال استطالة بروتينات غشائية (موجودة على الغشاء السيتوبلازمي لخلايا الركام البيضي) تتصل بألياف الأكتين من جهة وبمكوّنات المشبك من جهة أخرى. تم الكشف عن عدة جينات لها دور في تغيير بنائية ألياف الأكتين في خلايا الركام البيضي خلال الإنضاج المختبري كالجينين (TMSB4 و TMSB10)، إذ تبين تزايد مستوى تعبيرهما في نهاية الإنضاج المختبري بالتوازي مع تزايد مستوى انتشار الركام البيضي (Salhab et al., 2010). يعتمد انتشار الركام البيضي بشكل أساسي على عوامل تفرزها البييضة، حيث أنه لم يلاحظ انتشار الركام البيضي عند الإنضاج المختبري بغياب البييضة عند الفئران (Buccione et al., 1990 ; Salustri et al., 1990 ; Vanderhyden et al., 1990 ; Gilchrist et al., 2008). كما أن التعبير

الجيني للجينات (HAS2 وCOX2) تم تحفيزه مختبرياً في خلايا الركام البيضي من قبل العامل GDF9 (Growth Differentiation Factor-9) المفرز من قبل البييضة (Zhuo and Kimata, 2001).



الشكل (5): الآلية الجزيئية لانتشار الركام البيضي (Richards, 2005)

الاستنتاجات والتوصيات:

يستنتج من هذه الدراسة البحثية أن فترة الإنضاج المختبري للبييضات أساسية لتفاعلات حيوية استقلابية ناجمة عن علاقة تبادلية معقدة بين البييضة وخلايا الركام البيضي المحيطة بها. ينتج عنها استكمال البييضة لانقسامها المنصّف، قابليتها للإخصاب ودعم مراحل تطور الجنين المبكرة. إلاّ أن الآلية الجزيئية للإنضاج المختبري والظواهر الفيزيولوجية المرافقة لها لا تزال تحتاج للكثير من الدراسات والأبحاث بهدف الفهم الدقيق لمجريات الإنضاج والعوامل المؤثرة سلباً على سير هذه التقانة ما يفسح المجال لتحسين ظروف تطبيق هذه التقانة باستخدام أوساط إنضاج جديدة تؤدي في نهاية المطاف إلى رفع مردودية الأرومات Blastocysts من الإخصاب والتطور المختبري، إذ لا تزال نسبة الأرومات الناتجة عن الإخصاب والتطور المختبري للبييضات المنضّجة مختبرياً (in vitro) أقل مما هي عليه في حال الإخصاب والتطور المختبري لبييضات مُنضّجة داخل جسم البقرة (in vivo). كما أن إجراء دراسات جينية معمّقة تعتمد على مبدأ تحليل ومقارنة مستوى التعبير الجيني (Gene Expression) لجينات معينة بين نماذج مختلفة من إنضاج البييضات (بيضات منضجة مختبرياً in vitro وبييضات منضجة داخل جسم البقرة الحية in vivo) قد يسهم

في تطوير هذه التقانة وتعدد آفاق تطبيقاتها ولاسيما في دراسة وتطوير تقانات تناسلية أخرى كالاستنساخ وإنتاج حيوانات معدلة وراثياً وبالتالي الحل الجذري لمشاكل الخصوبة الملاحظة في قطعان الأبقار في معظم بلدان العالم.

المراجع:

1. AUCLAIR, S.; UZBEKOV, R.; ELIS, S.; SANCHEZ, L.; KIREEV, I.; LARDIC, L.; DALBIES-TRAN, R.; UZBEKOVA, S. *Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 67, 2013, 599–613.

2. BALBOULA, A. Z.; YAMANAKA, K.; SAKATANI, M.; HEGAB, A. O.; ZAABEL, S., M.; TAKAHASHI, M. *Cathepsin B activity is related to the quality of bovine cumulus oocyte complexes and its inhibition can improve their developmental competence*. Mol Reprod Dev, 77(5), 2010, 439-448.

3. BEKER, A. R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. *Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes*. Theriogenology, 58, 2002, 1663-73.

4. BERKHOLTZ, C. B.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. *Extracellular matrix functions in follicle maturation*. Semin Reprod Med, 24, 2006, 262-9.

5. BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; LEE, K. B.; PARK, K. E.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. *Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications*. Biol Reprod, 79, 2008, 301-9.

6. BEVERS, M. M.; IZADYAR, F. *Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation*. Mol Cell Endocrinol, 197, 2002, 173-8.

7. BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; EPPIG, J. J. *FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte.* Dev Biol, 138, 1990, 16-25.

8. CETICA, P. D.; PINTOS, L. N.; DALVIT, G. C.; BECONI, M. T. *Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation*. IUBMB Life, 51, 2001, 57-64.

9. COMBELLES, C. M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. *Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes?*. Reprod Biomed Online, 18, 2009, 864-80.

10. DEFER, N.; BEST-BELPOMME, M.; HANOUNE, J. *Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase*. American Journal of Physiology and Renal Physiology, 279, 2000, 400–416.

11. DEKEL, N. *Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation*. Mol Cell Endocrinol, 234, 2005, 19-25.

12. DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. *Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells*. Biol Reprod, 57, 1997, 1420-5.

13. DONNAY, I.; AUQUIER, P.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. *Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity*. Anim Reprod Sci, 52, 1998, 93-104.

14. DONNAY, I.; KNOOPS, B. *Peroxiredoxins in gametogenesis and embryo development*. Subcell Biochem, 44, 2007, 345-55.

15. GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. *Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality*. Hum Reprod Update, 14, 2008, 159-77.

16. GOSDEN, R. G. *Oogenesis as a foundation for embryogenesis*. Mol Cell Endocrinol, 186, 2002, 149-53.

17. GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings*. Hum Reprod Update, 7, 2001, 175-89.

18. HANOUNE, J.; DEFER, N. *Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 41, 2001, 145–174.

19. HASHIMOTO, S. *Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology*. J Reprod Dev, 55, 2009, 1-10.

20. HORNER, K.; LIVERA, G.; HINCKLEY, M.; TRINH, K.; STORM, D.; CONTI, M. *Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest*. Developmental Biology, 258, 2003, 385–396.

21. HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. *Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins*. J Cell Sci, 118, 2005, 5257-68.

22. IKEDA, S.; IMAI, H.; YAMADA, M. *Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes*. Reproduction, 125, 2003, 369-76.

23. IKEDA, S.; SAEKI, K.; IMAI, H.; YAMADA, M. *Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects.* Reproduction, 132(4), 2006, 549-557

24. KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S. Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J. D.; BATHGATE, R. A. *Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 2004, 7323- 8.

25. KRISHER, R. L. *The effect of oocyte quality on development*. J Anim Sci, 82, 2004, 14-23.

26. LEYENS, G.; VERHAEGHE, B.; LANDTMETERS, M.; MARCHANDISE, J.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. *Peroxiredoxin 6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation: role of intercellular communication*. Biol Reprod, 71, 2004, 1646-51.

27. LI, R.; NORMAN, R. J.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. *Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells.* Biol Reprod, 63, 2000, 839-45.

28. LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. *Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro*. Biol Reprod, 54, 1996, 1420-9.

29. MEHLMANN, L. M.; SAEKI, Y.; TANAKA, S.; BRENNAN, T. J.; EVSIKOV, A. V.; PENDOLA, F.L.; KNOWLES, B. B.; EPPIG, J. J.; JAFFE, L. A. *The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes*. Science, 306, 2004, 1947-50.

30. MEHLMANN, L. M. *Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation.* Reproduction, 130, 2005, 791-9.

31. MERMILLOD, P.; MARCHAL, R. La *maturation de l'ovocyte de mammifères*. médcine/sciences, 15, 1999, 148-56.

32. MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R.; UZBOKOVA, S.; THELIE, A.; TRAVERSO, J. M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. *Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?*. Reprod Domest Anim, 43(2), 2008, 393-400.

33. MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. *Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro.* Reprod Fertil Dev, 21, 2009, 608-14.

34. NAKAYAMA, T.; Noda, Y.; Goto, Y.; Mori, T. *Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos*.Theriogenology, 41, 1994, 499-510.

35. NASR-ESFAHANI, M.; JOHNSON, M. H.; AITKEN, R. J. *The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro.* Hum Reprod, 5, 1990, 997-1003.

36. NUTTINCK, F.; REINAUD, P.; TRICOIRE, H.; VIGNERON, C.; PEYNOT, N.; MIALOT, J. P.; MERMILLOD, P.; CHARPIGNY, G. *Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle.* Mol Reprod Dev, 61, 2002, 93-101.

37. OCHSNER, S. A.; RUSSELL, D. L.; DAY, A. J.; BREYER, R. M.; RICHARDS, J. S. *Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice.* Endocrinology, 144, 2003, 1008-19.

38. RICHARD, F. J. *Regulation of meiotic maturation*. J Anim Sci, 85, 2007, E4-6.

39. RICHARD, F. J.; TSAFRIRI, A.; CONTI, M. *Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation*. Biol Reprod, 65, 2001, 1444-51.

40. RICHARDS, J. S. *Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization.* Mol Cell Endocrinol, 234, 2005, 75-9.

41. RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. *Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.* Mol Reprod Dev, 61, 2002, 234-48.

42. RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. *Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex.* Hum Reprod Update, 13, 2007, 289-312.

43. RUSSELL, D. L.; SALUSTRI, A. *Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex.* Semin Reprod Med, 24, 2006, 217-27.

44. SALHAB,M.; DHORNE-POLLET,S.; AUCLAIR,S.; GUYADER-JOLY,C.; BRISARD,D.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; PONSART,C.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. *In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells.* Molecular Reproduction and Development, 80, 2013, 166-182.

45. SALHAB, M.; TOSCA, L.; CABAU, C.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; DUPONT, J.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. *Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion.* Theriogenology, 75, 2011, 90–104.

46. SALHAB, M.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; GUYADER-JOLY, C.; DUPONT, J.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. *Thymosins beta-4 and beta-10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation.* Reprod Fertil Dev, 22, 2010, 1206–1221.

47. SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. C. *Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells.* Dev Biol, 138, 1990, 26-32.

48. SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. *Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle.* Biol Reprod, 69, 2003, 269-77.

49. SCHOENFELDER, M.; SCHAMS, D.; EINSPANIER, R. *Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 84, 2003, 291-300.

50. SILVA, C. C.; KNIGHT, P. G. *Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes.* J Reprod Fertil, 119, 2000, 261-9.

51. SIRARD, M. A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence.* Theriogenology, 68(1), 2007, S71-6.

52. SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. *Effects of in-vivo and invitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity.* Hum Reprod Update, 9, 2003, 35-48.

53. SZOLTYS, M.; TABAROWSKI, Z.; PAWLIK, A. *Apoptosis of postovulatory cumulus granulosa cells of the rat*. Anat Embryol (Berl), 202, 2000, 523-9.

54. TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. *Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization.* Mol Reprod Dev, 61, 2002, 414-24.

55. TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. *Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells.* Biol Reprod, 63, 2000, 805-10.

56. THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. *Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation.* Dev Biol, 244, 2002, 215-25.

57. VANDERHYDEN, B. C.; COHEN, J. N.; MORLEY, P. *Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis.* Endocrinology, 133, 1993, 423-6.

58. VANDERHYDEN, B. C.; CARON, P. J.; BUCCIONE, R.; EPPIG, J. J. Developmental *pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation.* Dev Biol, 140, 1990, 307-17.

59. VARANI, S.; ELVIN, J. A.; YAN, C.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; HORTON, H. F.; BYRNE, M. C.; MATZUK, M. M. *Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility.* Mol Endocrinol, 16, 2002, 1154-67.

60. WANG, H. F.; ISOBE, N.; KUMAMOTO, K.; YAMASHIRO, H.; YAMASHITA, Y.; TERADA,T. *Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle.* Reprod Biol Endocrinol, 4, 2006, 4.

61. WANG, H.; STORM, D.R. *Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system.* Molecular Pharmacology, 63, 2003, 463–468.

62. ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. *Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes.* Science, 330, 2010, 366.

63. ZHUO, L.; KIMATA, K. *Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation.* Cell Struct Funct, 26, 2001, 189-96.

64. ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. *Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro.* Endocrinology, 131, 1992, 2690-6.