

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Meniuková

Role kumulárních buněk při zrání savčích oocytů
The role of cumulus cells during the maturation of mammalian oocytes

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 24. 4. 2023

Podpis:

Poděkování

Dovoluji si touto cestou poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D za ochotu, cenné rady, trpělivost a pozitivní přístup při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat i své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Abstrakt

Kumulární buňky vznikají v ovariálních folikulech diferenciací ze somatických granulózních buněk. Jsou uspořádány kolem oocytů ve stratifikovaných shlucích, jejichž nejspodnější vrstva se nazývá corona radiata. Buňky této vrstvy svými cytoplazmatickými mikrovlákny prochází přes zónu pellucidu do blízkosti oolemy, kde v místě vzájemného kontaktu buněk vznikají gap junctions, jež zajišťují signalizační a metabolickou provázanost. Oocyty produkují faktory ovlivňující procesy v kumulárních buňkách včetně jejich metabolismu a životaschopnosti. Kumulární buňky modulací množství cyklických nukleotidů v oocytech umožňují udržování meiotického arresu, čímž oocytům poskytují čas pro dokončení růstové fáze a nabytí kompetence pro maturaci. Jelikož oocyty disponují velmi omezenou schopností zpracování glukózy, metabolická kooperace s kumulárními buňkami zprostředkovává získání energie potřebné pro děje spojené s růstem a maturací. Kumulární buňky pomocí několika metabolických drah zpracování glukózy vytvářejí energetické substráty pro tvorbu ATP, které následně transportují do oocytů. Dále regulují i množství lipidových kapének v oocytech a ochraňují je před buněčnou toxicitou. Zvýšení koncentrace luteinizačního hormonu ve folikulu těsně před ovulací indukuje šíření signálu pro expanzi kumulárních buněk. Porušení spojů mezi coronou radiatou a oocyty vede k obnovení meiózy.

Klíčová slova

kumulární buňky, oocyt, zrání, metabolismus, expanze kumulárních buněk

Abstract

Cumulus cells in the ovarian follicles emerge by differentiation from somatic granulosa cells. They are located around the oocytes in stratified clusters and their innermost layer is called the corona radiata. Cytoplasmic microvilli of cumulus cells pass through zona pellucida to the proximity of the oolema, where formation of gap junctions enables signalling and metabolic codependency. Oocytes produce factors affecting processes in cumulus cells, including their metabolism and viability. By modulating the abundance of cyclic nucleotides in oocytes, cumulus cells allow the maintenance of meiotic arrest, providing time for oocytes to finish their growth and gain competence for maturation. Because oocytes have a very limited ability to process glucose, metabolic cooperation with cumulus cells enables them to gain the energy needed for processes associated with growth and maturation. Several metabolic pathways of glucose processing create energy substrates for the formation of ATP, which they then transport to the oocytes. They also regulate the amount of lipid droplets in oocytes and protect them from cellular toxicity. An increase in the concentration of luteinizing hormone in the follicle just before ovulation induces the transmission of the signal for cumulus expansion. Interruption of the connections between corona radiata and oocytes leads to resumption of meiosis.

Key words

cumulus cells, oocyte, maturation, metabolism, cumulus cell expansion

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Folikulogeneze	2
3.	Faktory sekretované oocytem	3
4.	Gap junctions	4
5.	Růst a maturace oocytu	5
	<i>5.1 Udržování meiotického arrestu</i>	<i>6</i>
	<i>5.2 Maturace oocytu</i>	<i>7</i>
6.	Metabolismus	9
	<i>6.1 Metabolismus glukózy</i>	<i>9</i>
	6.1.1 Glykolýza a pentózofosfátový cyklus	10
	6.1.2 Hexosaminová dráha	12
	6.1.3 Polyolová dráha	13
	<i>6.2 Metabolismus lipidů</i>	<i>13</i>
	6.2.1 Lipidové kapénky	14
	6.2.2 Negativní vliv lipidů	15
	6.2.3 Role melatoninu v metabolismu lipidů	16
7.	Expanze kumulárních buněk	17
8.	Závěr	19
9.	Reference	21

1. Úvod

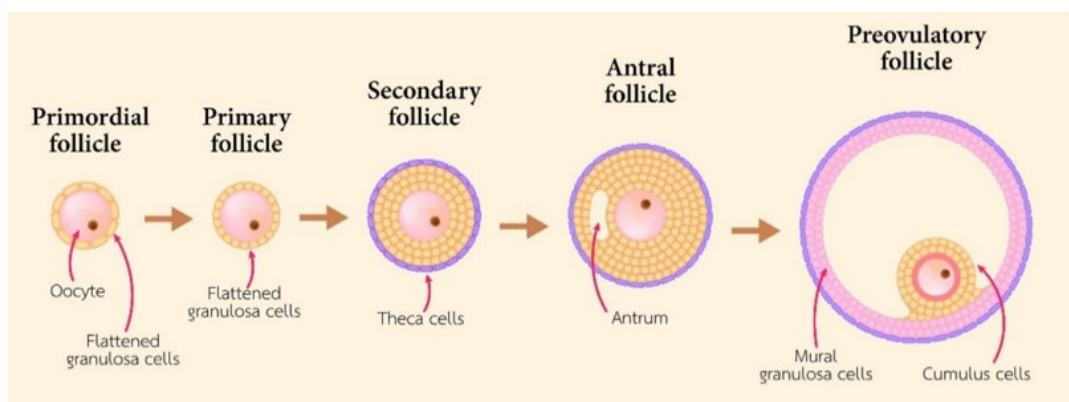
Pohlavní rozmnožování je proces umožňující vznik potomků splynutím pohlavních buněk. Savčí samičí pohlavní buňky – oocyty vznikají procesem oogeneze ze zárodečných buněk během embryonálního vývoje. Oocyty vstupují do prvního meiotického dělení, které je následně zastaveno a oocyty jsou udržovány v diplotenním stádiu profáze (první meiotický arrest). Hormonální signály během ovariálního cyklu dávají oocytům znamení pro obnovení meiózy a vyloučení prvního pólového tělíska. U oocytů, jenž vyloučily první pólové tělíska se meióza opět zastavuje (druhý meiotický arrest) a k jejímu dokončení dochází až po oplození.

Oocyty jsou až do počátku ovulace uloženy v ovariálních folikulech, které jim zajišťují vhodné prostředí pro správný průběh růstu a maturace vedoucí k nabytí vývojové kompetence pro oplození a raný embryonální vývoj. Kromě oocytů folikuly dále obsahují i somatické granulózní buňky, které během ovariálního cyklu diferencují na kumulární buňky a buňky nástěnné granulózy. Díky metabolické a signalizační provázanosti jsou oocyty často studovány právě v komplexech s kumulárními buňkami. Existence těchto komplexů umožňuje buňkám folikulu oboustrannou komunikaci a metabolickou kooperaci jak mezi somatickými buňkami navzájem, tak mezi nimi a oocyty.

Díky rostoucí potřebě léčby neplodnosti technologiemi asistované reprodukce vzrůstá zájem o pochopení mechanismů vzájemného působení buněk folikulu. Jelikož procesy růstu a maturace oocytů probíhají přirozeně uvnitř těl savců, je jejich pozorování omezené. Tato bakalářská práce poskytuje náhled především do dějů probíhajících v *in vitro* prostředí. Zrání oocytů mimo těla samiček umožňuje studium a identifikaci přirozeně probíhajících procesů v komplexech oocytů a kumulárních buněk. Přestože úspěšnost této metody je oproti maturaci *in vivo* zatím nízká, současný výzkum se zaměřuje na zdokonalení kultivačních médií umožňujících napodobování aktivní komunikace mezi somatickými buňkami folikulu a oocytem.

2. Folikulogeneze

Primordiální folikul je nejmenším folikulem obsaženým ve vaječniku. Jedním z prvních identifikovaných faktorů iniciujících jeho vývoj u potkanů je ligand pro c-kit (KITL) (Parrott & Skinner, 1999). KITL je cytokin sekretovaný granulózními buňkami (GC) a c-kit je jeho receptor exprimovaný oocyty a thékálními buňkami (Hutt et al., 2006). Studie provedená na lidských ovariálních folikulech poukazuje na důležitou roli c-Kit signalizace, jelikož po zablokování její funkce pomocí c-Kit inhibitoru byla pozorována folikulární atrezie (Carlsson et al., 2006). Během folikulárního růstu somatické buňky proliferují a stratifikují. Ve folikulu vzniká antrum vyplněné tekutinou. Při jeho tvorbě hraje hlavní roli folikulostimulační hormon (FSH). *In vitro* stimulace GC odebraných z preantrálních folikulů pomocí FSH způsobuje jejich reorganizaci do struktur připomínajících antrum. Ačkoliv po stimulaci estradiolem k reorganizaci nedochází, efekt působení FSH se po jeho přidání výrazně zesiluje (Gore-langton et al., 1990). Vznik antra způsobuje prostorové oddělení granulózních buněk a jejich diferenciaci. Z buněk v těsné blízkosti oocyty se stávají kumulární buňky (CC) a z těch lemujících okraj antra nástěnné buňky granulózy (MGC) (viz obr. 1). Diferenciaci MGC z původních GC indukuje FSH a insulin-like growth factor (Baumgarten et al., 2014). Nicméně pokud je v těsné blízkosti GC přítomen oocyt, pak je jeho vlivem inhibován efekt těchto faktorů a GC diferencují na CC (Diaz et al., 2007). Jedním z projevů fenotypu MGC v preovulačním stádiu folikulu je přítomnost receptoru pro luteinizační hormon (LHR) a schopnost luteinizace. Faktory sekretované oocytem (OSF) ovšem expresi tohoto receptoru u CC inhibují. Proto po odstranění oocyty můžeme pozorovat expresi LHR i u CC. Naopak po přidání oocyty k MGC můžeme pozorovat inhibici exprese těchto receptorů (Eppig et al., 1997).



Obrázek 1: Schéma fází folikulárního vývoje. Vznik antra a diferenciaci granulózních buněk na dvě linie buněk – kumulární buňky lemující okraj oocyty a nástěnné buňky granulózy umístěné mezi thékálními buňkami a antrém. Převzato z rev.: Turathum et al., (2021).

3. Faktory sekretované oocytem

Signalizace mezi oocytem a kumulárními buňkami je oboustranná. Mezi významné faktory sekretované oocytem patří proteiny growth differentiation factor 9 (GDF-9) a bone morphogenetic protein 15 (BMP-15). Jejich mRNA může být použita jako marker pro předpověď vývojového potenciálu oocyty. Expze těchto faktorů v kumulárních buňkách pozitivně koreluje s maturací oocytů, mírou oplodnění a rýhováním (Li et al., 2014). OSF mají efekt také na životaschopnost CC, které bez jejich přítomnosti odumírají. Apoptóza izolovaných CC je však značně potlačena v médiu obsahujícím faktor BMP-15 (Hussein et al., 2005). GDF-9 s ostatními faktory určuje identitu CCs a ovlivňuje jejich schopnost expanze (Elvin et al., 1999).

Suplementace estradiolem (E2) podporuje schopnost expanze v *in vitro* izolovaných komplexech oocytů a kumulárních buněk (COC) za přítomnosti oocyty nebo OSF. Bez přítomnosti E2 dochází ke značnému omezení expanze. Pokud je oocyt odebrán a kultivace CC s E2 je provedena bez přítomnosti faktoru GDF-9, expanze neprobíhá. Nejlepší výsledky expanze přinesla přítomnost faktorů GDF-9 a BMP-15. Faktor GDF-9 způsobuje podobnou míru expze transkriptů Has2, Ptgs2 a Tnfaip6 pro expanzi kumulárních buněk, jako samotná přítomnost oocyty. Úroveň expanze však není srovnatelná, pokud není zároveň přítomný i BMP-15. Ten sám o sobě nemá na expresi transkriptů vliv, ale v kombinaci s GDF-9 pravděpodobně podporuje další procesy spojené s expanzí. Další funkcí GDF-9 v kombinaci s BMP-15 je inhibice expze transkriptu nuclear receptor-interacting protein 1 (Nrip1). Tento transkript kóduje jeden z možných inhibitorů pro estradiolový receptor v kumulárních buňkách (Sugiura et al., 2010).

Wnt signalizace je důležitá pro plodnost a správný průběh folikulogeneze savců. Frizzled4 se řadí mezi receptory Wnt signalizace. Frizzled4^{-/-} myši jsou neplodné a mají narušenou tvorbu žlutého tělíska (Hsieh et al., 2005). The secreted frizzled-related protein-4 (SFRP4) je modulátorem signální dráhy Wnt4. Jeho expze v lidských kumulárních buňkách byla značně vyšší než v buňkách nástěnné granulózy. Stimulace gonadotropiny expresi SFRP4 snižuje (Maman et al., 2011). Pro prozkoumání možnosti, zda jsou faktory sekretované oocytem zapojeny do regulace SFRP4 a tím i do regulace Wnt signalizace byly provedeny experimenty s kultivací kumulárních buněk v přítomnosti těchto faktorů a FSH. Kultivace CC s FSH snižuje produkci mRNA pro SFRP4. Přidání izolovaného faktoru GDF9 nebo BMP15 nemá na expresi významný vliv. Jiný případ nastává, pokud jsou do kultivačního média s FSH přidány oba faktory (GDF9 a BMP15) zároveň. Hladina SFRP4 mRNA se tím výrazně zvýší. Stimulace

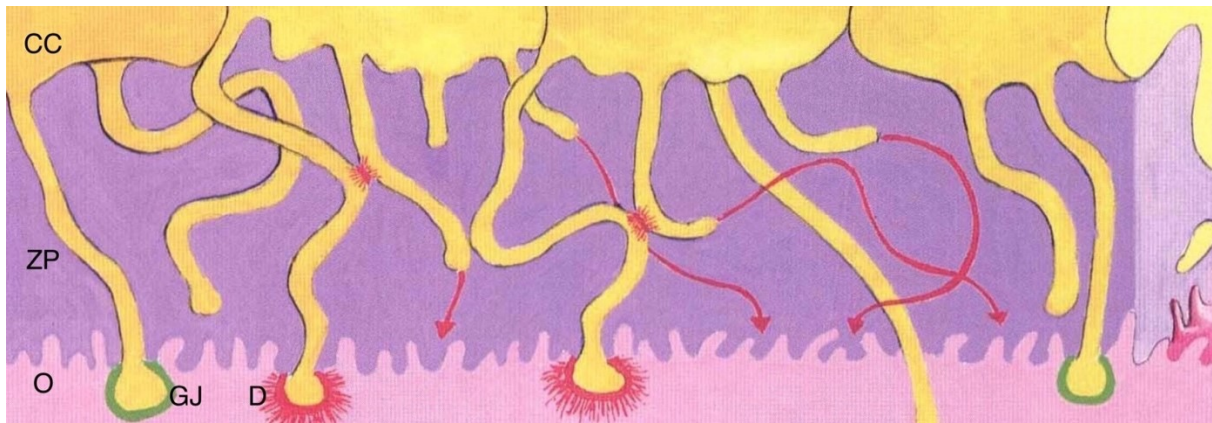
SRFP4 pomocí GDF9 a BMP15 má inhibiční účinky na Wnt4 signalizaci, jelikož snižuje aktivitu β -kateninu. Na základě těchto zjištění se předpokládá, že GDF9 a BMP15 by se s velkou pravděpodobností mohly podílet na inhibici luteinizace v kumulárních buňkách u lidí (Esfandyari et al., 2021).

Faktory BMP-15 a GDF-9 ovlivňují i metabolismus kumulárních buněk. Mutace těchto OSF způsobuje zásah do několika metabolických drah, přičemž nejvýznamnější efekt mutace je pozorován na syntéze cholesterolu a glykolýze. OSF pravděpodobně zasahují do regulace transkriptů těchto metabolických procesů v CC. Syntéza cholesterolu za přítomnosti octanu sodného se v CC značně omezí po odstranění oocytů, stejně jako v COC mutantními BMP-15 a GDF-9 (Su et al., 2008).

BMP-15 a GDF-9 se řadí do superrodiny proteinů TGF- β (transforming growth factor beta) a jsou schopné vytvářet homodimery nebo heterodimer označovaný jako cumulin. Ten hraje roli v parakrinní signalizaci oocytů a silně ovlivňuje funkci GC. Aktivuje signální dráhy SMAD2/3 a SMAD1/5/8. Podporuje proliferaci a diferenciaci GC efektivněji než samostatné homodimery (Mottershead et al., 2015).

4. Gap junctions

Oocyty vyjmuté z preantrálních folikulů myši kultivované *in vitro* byly testovány jak izolované bez granulózních buněk, tak s přidanými GC. Ani v jednom případě nedošlo k úspěšnému růstu. Po 4 dnech kultivace byla pozorovaná značná degenerace (Eppig, 1977). Oproti tomu v *in vitro* kultivovaných komplexech oocytů a granulózních buněk bez porušených spojů v rámci těchto komplexů byly oocyty schopné růstu i maturace (Eppig, 1977; Rao et al., 1990). Rolí v komunikaci mezi oocyty a GC nezajišťuje jen parakrinní signalizace, ale i fyzický kontakt mezi buňkami. Vysokorezoluční elektronová mikroskopie umožnila detailně vizualizovat interakce mezi kumulárními buňkami a oolemou. Četné mikroklky kumulárních buněk procházejí zónou pellucidou do blízkosti oolemy (viz obr. 2). Mikroklky jsou kontraktilní a jejich špičky mají schopnost dynamicky měnit délku (Motta et al., 1994).



Obrázek 2: Schéma mikrokvlků kumulárních buněk (CC) procházejících přes zonu pellucidu (ZP). V místech střetu mikrokvlků s oolemou (O) se vytvářejí buď mechanická propojení jako například desmozomy (D), nebo gap junctions (GJ) umožňující mezibuněčnou komunikaci. Některé mikrokvlky procházejí oolemou až k jádru, kde koordinují různé funkce komplexu oocyty a CC. Převzato a upraveno z Motta et al., (1994).

Každý GJ je tvořený konexony. Konexony mají hexamerní strukturu složenou z konexinů. Každý konexon prochází přes membránu jedné z buněk. V místě kontaktu tyto dva konexony vytvářejí GJ kanál. Mezibuněčné kanály regulují interakce mezi buňkami potřebné pro úspěšnou oogenezi a ovulaci. Význam funkčních GJ můžeme demonstrovat na výzkumu na myších provedených týmem Alexandra M. Simona. Při pokusech byla navozena mutace genu pro konexin 37, což u homozygotních samic vedlo k neplodnosti. Aniž by vaječníky vykazovaly abnormality ve vzhledu, ovulace neprobíhala. GJ nebyly detekovatelné, tudíž se narušila mezibuněčná komunikace oocyty s CC (Simon et al., 1996). Kromě role v komunikaci, GJ rovněž ovlivňují počet zárodečných buněk a folikulogenezi v raném stádiu. Konexin 43 přispívá ke správnému vývoji vaječníků myši. Mutace v genu pro konexin 43 způsobuje u homozygotů neonatální letalitu. Plody mutantních homozygotů odebrané prenatalně císařským řezem však vykazovaly pravidelně menší vaječníky než heterozygoti a jedinci s alelami divokého typu (Juneja et al., 1999).

5. Růst a maturace oocyty

Ovariální folikuly savců obsahují primární oocyty zastavené v profázi I. K zahájení maturace oocytů dochází až znovuobnovením meiózy těsně před ovulací. Oocyty izolované z prostředí folikulu však mohou být schopné i samovolného obnovení meiózy. U menších oocytů k obnovení nedojde nebo se meióza zastaví před dosažením druhého meiotického arresu. Jen u dostatečně velkých oocytů může být vyloučeno pólóvé tělísko. Například prasečí oocyty nabývají této schopnosti až po dosažení plné velikosti oocyty v antrálním folikulu (Motlik et al., 1984). Kromě jaderné maturace, charakterizované obnovením meiózy dochází i k maturaci

cytoplazmatické. Ta umožňuje oocytu nabytí vývojové kompetence pro jadernou maturaci, oplození a raný embryonální vývoj akumulací potřebných mRNA, proteinů a živin (rev.: Watson, 2007).

5.1 Udržování meiotického arrestu

Za udržování oocytů v prvním meiotickém arrestu je zodpovědná vysoká koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), která umožňuje aktivaci protein kinázy A (PKA). Ta inhibuje aktivitu faktorů podporujících maturaci oocyty. V oocytech během růstu ale není dostatečně vysoká koncentrace cAMP pro udržení arrestu. PKA musí být aktivována také pomocí dalších faktorů. Například studie z roku 2006 došla k závěru, že by mohlo jít o faktor A kinase anchoring protein (AKAP) (Kovo et al., 2006). PKA fosforyluje další proteiny, konkrétně u myši Wee1B. Ten následně fosforyluje cdc2. Fosforylovaný cdc2 nemůže být translokován do jádra, kde by aktivoval faktory podporující maturaci oocyty (Seung et al., 2005).

Existují dvě teorie vysvětlující mechanismus udržování arrestu pomocí přítomnosti cAMP v oocytech. První z nich navrhuje, že cAMP je transportován do oocyty z kumulárních buněk (Dekel, 1988). Druhá teorie se soustředí především na generování cAMP samotným oocytem, kde by kumulární buňky mohly hrát roli především v udržování aktivity G proteinu (guanine nucleotide binding protein). Ten umožňuje stimulaci adenylát cyklázy (Downs et al., 1992). Pro ověření této hypotézy byla do oocytů injikována protilátka inhibující stimulační G protein. Její aplikace vedla k obnovení meiózy. Jelikož gap junctions mezi oocytem a somatickými buňkami obklopujícími oocyt umožňují průchod pouze molekulám o maximální velikosti 1 kD, protilátka o velikosti 150 kD nemůže ovlivnit funkci stimulačního G proteinu v kumulárních buňkách. Dle výsledků této studie je aktivita stimulačního G proteinu v oocytech potřebná pro udržování meiotického arrestu. Tato hypotéza však nevylučuje, že cAMP transportované z kumulárních buněk k udržování arrestu přispívá (Mehlmann, 2002).

Studie zabývající se vlivem poškození DNA na maturaci oocyty naopak podporují hypotézu obnovení meiotického arrestu transportem cAMP pomocí gap junctions z kumulárních buněk. Použití rentgenového záření na zárodečné buňky v nich může způsobit vznik různých chromozomálních abnormalit (Jacquet et al., 2005). Izolované oocyty bez kumulárních buněk mají méně senzitivní mechanismy pro zaznamenávání poškození, jelikož nedisponují schopností efektivně aktivovat dráhu regulující opravy DNA (Marangos & Carroll, 2012). Antibiotikum Zeocin indukuje tvorbu dvouřetězcových zlomů (DSB) v buňkách. V

denudovaných oocytech se po 15 hodinách *in vitro* kultivace obnovuje meióza v 83,9 % případů bez DSB a v 59,0 % případů DSB postižených oocytů. Jiná situace nastává, pokud jsou oocyty izolovány v komplexech s kumulárními buňkami, kde se meióza obnoví v 89,8 % případů bez DSB a pouze v 16,4 % s DSB. Aby se prokázalo, že za rapidní pokles obnovy meiózy v COC zodpovídají gap junctions, byl použit gap junction inhibitor carbenoxolone. Výsledky ani u jedné skupiny denudovaných oocytů se po použití inhibitoru výrazně nelišily. COC bez DSB nevykazovaly po použití inhibitoru významné změny, zato v COC s DSB se výrazně zvýšila míra oocytů podstupujících meiózu až na 46,9 %. Pro stanovení mechanismu potlačení obnovy meiózy byla měřena transkripce genu pro adenylát cyklázu 1 (Adcy1) v kumulárních buňkách. Úroveň transkripce byla signifikantně zvýšena v CC s DSB, což indikuje významnou roli cAMP transportovaného z kumulárních buněk do oocytu. COC s DSB exprimují také méně fosfodiesterázy 3A (PDE3A), která hydrolyzuje cAMP, čímž dále přispívá k udržování meiotického arresu (Sun et al., 2015).

Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) je dalším cyklickým nukleotidem, který hraje důležitou roli při udržování meiotického arresu. Granulózní buňky ve folikulu exprimují mRNA faktory, jejichž produkty umožňují syntézu cGMP. Buňky nástěnné granulózy exprimují protein natriuretic peptide precursor type C (NPPC) a kumulární buňky exprimují jeho receptor (NRP2). Receptor má funkci guanylát cyklázy a po jeho aktivaci ligandem kumulární buňky syntetizují cGMP. Nukleotid je transportován z CC do oocytu přes gap junctions a jeho úlohou je inhibice PDE3A. Ta následně není schopná hydrolyzovat cAMP v oocytu a snižovat tak jeho koncentraci (McDonald et al., 2010; Norris et al., 2009).

5.2 Maturace oocytu

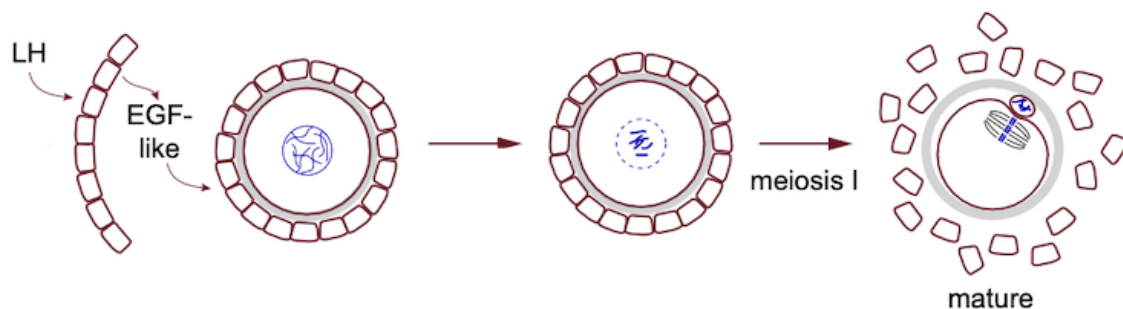
V prvním meiotickém arresu zůstává oocyt do doby, kdy dojde ke zvýšení koncentrace luteinizačního hormonu (LH). To vyvolá v komplexech kumulárních buněk a oocytů dvě zásadní reakce. Jednak se v oocytech obnovuje meióza a jednak kumulární buňky podstupují expanzi. Jelikož receptory pro LH disponují jen buňky nástěnné granulózy, je signál zprostředkován přes ně (Eppig et al., 1997). Úplný mechanismus poklesu koncentrace cAMP v oocytu není zcela objasněn. Působení LH pravděpodobně navozuje zvýšení produkce cAMP v granulózních buňkách a pokles cAMP v oocytu (Downs et al., 1988).

Jedním z popsaných mechanismů podporujících obnovu meiózy je snížení koncentrace cGMP po stimulaci LH. Měření ukázalo, že koncentrace se snižuje nejprve v buňkách nástěnné granulózy, poté v kumulárních buňkách a v oocytu. V kumulárních buňkách dochází

k inaktivaci guanylát cyklázy NPR2. To navozuje potlačení syntézy cGMP. Kromě omezení syntézy cyklického nukleotidu se snižuje propustnost gap junctions, což vede k omezení transportu. (Norris et al., 2009; Shuhaibar et al., 2015). Také aktivita fosfodiesterázy PDE3A se během obnovení meiózy zvyšuje a umožňuje hydrolyzu cAMP (Richard et al., 2001).

Dalším z důsledků stimulace folikulu luteinizačním hormonem je exprese epidermal growth factors (EGF) like faktorů: amfiregulinu, epiregulinu a beta-cellulinu. Tyto růstové faktory se chovají jako mediátory signálu LH mezi somatickými buňkami folikulu. Umožňují další šíření stimulu pomocí autokrinních a parakrinních signálů (Park et al., 2004). Mutace amfiregulinu nebo epiregulinu způsobují opoždění maturace oocyty a expanze kumulárních buněk. Poškození funkce obou faktorů zároveň způsobuje zásadní narušení odpovědi na působení LH, poukazující na zásadní roli těchto faktorů (Hsieh et al., 2007). Přítomnost receptorů pro EGF na kumulárních buňkách umožňuje další předání tohoto signálu. Inhibice funkce EGF receptoru během prvních 3 hodin po LH stimulaci částečně zastavuje maturaci oocyty i expanzi kumulárních buněk (Prochazka et al., 2003; Reizel et al., 2010).

Studie z roku 2021 ukázala, že signalizace pomocí EGF receptoru kumulárních buněk je zodpovědná za rozpojení komplexu CC a oocyty. Před tímto objevem se předpokládalo, že signál pro rozvolnění spojů pochází z oocyty (viz obr. 3). Komplex je před počátkem maturace spojen tzv. transzonálními spoji, které procházejí přes zonu pellucidu (viz kapitola 4 Gap junctions). K úspěšnému rozvolnění zmíněných spojů dochází pouze pokud je signalizace EGF receptorů kumulárních buněk neporušená (Abbassi et al., 2021).



Obrázek 3: Schéma přerušování spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami. LH působí na buňky nástěnné granulózy, které produkují ligandy EGF. Ty působí na kumulární buňky disponující EGF receptory. Působení LH a EGF na oocyt umožňuje jeho maturaci, během které můžeme na obrázku vidět narušení komplexu a oddělení kumulárních buněk od oocyty. Převzato a upraveno z Abbassi et al., (2021).

6. Metabolismus

Komunikace mezi oocyty a kumulárními buňkami probíhá oběma směry. Oocyty sekretují faktory ovlivňující transkriptom kumulárních buněk a kumulární buňky poskytují oocytům metabolity potřebné pro správný růst a maturaci (viz obr. 4). Pokud jsou kumulární buňky z oocytu odstraněny, dochází ke snížení exprese genů spojených s metabolismem (Sugiura et al., 2005).

6.1 Metabolismus glukózy

Na základě poznatku, že embryo myši není schopné metabolizovat glukózu před dosažením 8 buněčného stádia byla vznesena otázka, zda tato jedinečná vlastnost energetického metabolismu pochází již z období před oplozením. V médiu s kontrolními denudovanými oocyty nedochází bez zdroje energie k úspěšné maturaci oocytu. Podobné výsledky přinesla i kultivace v médiu obohaceném o glukózu a fosfoenolpyruvát. Naopak pokud jsou za stejných podmínek analyzovány oocyty s kumulárními buňkami, dochází k jejich maturaci u vyššího procenta oocytů. Maturaci denudovaných oocytů však podporuje médium obohacené o pyruvát nebo oxaloacetát (Biggers et al., 1967). Podobné výsledky přineslo pozorování radioaktivně značených metabolitů v oocytech skotu a ukázalo, že během samovolné maturace po izolaci COC z prostředí folikulu se zvyšuje využití metabolitů vstupujících do Krebsova cyklu – pyruvátu, glutaminu a glycinu. Z výsledků této studie vyplývá, že hlavním zdrojem energie produkované oocyttem při maturaci je oxidativní fosforylace (Rieger & Loskutoff, 1994).

Příjem glukózy buňkami není závislý na prosté difuzi, ale na přítomnosti specializovaných glukózových transportérů (GLUT). V závislosti na druhu živočicha mohou být oocytem exprimované různé GLUT izoformy. Pomocí Western blot analýzy byla u izolovaných lidských oocytů pozorována přítomnost pouze izoformy GLUT1. Ve stádiu oocytu je příjem glukózy velmi nízký, zvyšuje se až u embryí v důsledku exprese dalších GLUT izoform (Dan-Goor et al., 1997). Imunohistochemická analýza transportéru GLUT4 v COC odhalila jeho expresi v kumulárních buňkách (Roberts et al., 2004). GLUT4 disponuje vysokou afinitou ke glukóze. Transport glukózy je konkrétně u tohoto transportéru více závislý na koncentraci inzulínu než na koncentraci glukózy, což ho odlišuje od ostatních izoform (rev.: Sutton-McDowall et al., 2010).

6.1.1 Glykolýza a pentózofosfátový cyklus

Kromě přítomnosti zmíněných glukózových transportérů jsou pro funkci metabolických drah klíčové i enzymy figurující v metabolismu glukózy. Měření množství enzymů fosfofruktokinázy (figurující v glykolýze) a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (figurující v pentózofosfátovém cyklu) odhalilo, že fosfofruktokináza je v kumulárních buňkách bohatě zastoupena. Produkty glykolýzy jsou z kumulárních buněk směřovány do oocyty. V oocytech naopak nebyla naměřena téměř žádná fosfofruktokinázová aktivita, což ukazuje na jejich nízkou schopnost využívat glykolýzu jako zdroj energie z glukózy. Aktivita glukóza-6-fosfát dehydrogenázy byla pozorovatelná jak v CC, tak v oocytech. Malé množství glukózy přítomné v oocytech je tedy pravděpodobně metabolizováno pomocí pentózofosfátového cyklu (PPP) (Cetica et al., 2002; Herta et al., 2022).

Glykolýza je důležitým metabolickým procesem v kumulárních buňkách. Kultivační média podporující glykolýzu v CC vedou ke značně zvýšené vývojové kompetenci oocytů (Krisher & Bavister, 1999). Konečný produkt glykolýzy pyruvát je hlavním substrátem pro tvorbu energie mitochondriemi (viz obr. 4). *In vitro* efekt jeho krátkodobé deprivace na růst a vývoj myších primordiálních folikulů byl studován v publikaci Zhang et al. (2022). Autoři zjistili vyšší počet rostoucích folikulů v médiu bez pyruvátu než v kontrolním médiu. Krátkodobá nepřítomnost pyruvátu měla u primordiálních folikulů pozitivní efekt na příjem glukózy a zisk energie z glykolýzy. Zvýšená glykolýza měla za následek aktivaci mTOR (mammalian target of rapamycin) signalizace. V médiu bez pyruvátu bylo exprimováno více downstream signálních molekul mTOR signalizace, jakými jsou protein kináza B a FOXO3a (forkhead box O3a). Tyto signální dráhy jsou důležité pro aktivaci primordiálních folikulů a zahájení růstové fáze. Vliv krátkodobého nedostatku pyruvátu a jeho pozitivní účinek na glykolýzu a tím i na vyšší míru aktivace primordiálních folikulů byl sledován i u člověka.

Studie z roku 2013 se zaměřila na roli glykolýzy při jaderné maturaci prasečích oocytů *in vitro* pomocí modulace její aktivity v COC. Pro ověření účinku modulátorů byla následně měřena spotřeba glukózy a koncentrace konečného produktu glykolýzy laktátu. Inhibitor glykolýzy fluorid sodný spotřebu glukózy i produkci laktátu omezil. Stejný efekt měla i vysoká koncentrace fyziologického inhibitoru glykolýzy ATP. Přestože inhibice glykolýzy neovlivnila životaschopnost oocytů ani kumulárních buněk, snížila schopnost oocytů podstoupit jadernou maturaci. Suplementace fyziologickým stimulem glykolytické aktivity AMP pozitivní účinky na jadernou maturaci nevykazovala. Stimulační efekt tohoto nukleotidu mohl být překryt stimulačním účinkem gonadotropinů obsažených v kultivačním médiu (Alvarez et al.,

2013). O rok starší studie se zaměřila právě na efekt gonadotropinů obsažených v *in vitro* médiu na glykolytickou aktivitu. Spotřeba glukózy i produkce laktátu se ve skupinách COC kultivovaných v jejich přítomnosti zvýšily (Alvarez et al., 2012). Shodné výsledky jako u modulace glykolýzy mělo i použití stimulátorů a inhibitorů PPP (Alvarez et al., 2013).

Metabolismus glukózy je využíván prasečími COC i během cytoplazmatické maturace, která vede k nabytí vývojové kompetence pro následné oplození a tvorbu blastocyt. Médium NCSU-23 neobsahuje substráty využitelné jako zdroje energie. Suplementace tohoto média laktátem o koncentraci 1 mM podporuje jadernou maturaci u 60 % oocytů, ale zároveň nepodporuje tvorbu blastocyst (počet vzniklých blastocyst je pouze 10 %), a tudíž je médium vhodné pro sledování cytoplazmatické maturace. Kontrolní COC byly kultivovány 48 hodin v NCSU-23 médiu obohaceném o 1mM laktát a 5,6mM glukózu. Média testovaných skupin obsahovala navíc ještě inhibitor glykolýzy kyselinu jodoctovou nebo inhibitor PPP 6-AN. Po kultivaci COC se zmíněnými inhibitory byly CC odebrány a oocyty, které vyloučily první pólové tělísko, byly oplozeny. Oba inhibitory měly ve výsledku negativní vliv na tvorbu blastocyst, přičemž 6-AN měl výraznější inhibiční účinek. Následně byla testována i role glykolýzy a PPP při jaderné maturaci. Při kultivaci oocytů v médiu obsahujícím 5,6 mM glukózu dokončilo jadernou maturaci pouze 26 % denudovaných oocytů a 67 % oocytů s CC. Tyto výsledky se shodují s předešlými studiemi indikujícími omezenou schopnost zpracování glukózy prasečími oocyty. Efekt snížení transkripce a exprese genových produktů pro G6PD (glukóza-6-fosfát dehydrogenáza) nebo GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) byl ověřen pomocí RNA interference. Knockdown měl negativní účinek na nukleární i cytoplazmatickou maturaci, přičemž nefunkční G6PD měla na cytoplazmatickou i jadernou maturaci signifikantnější vliv. Tyto výsledky indikují, že zásahy do metabolismu glukózy ovlivňují jaderné a cytoplazmatické zrání oocytů (Wen et al., 2020).

Stimulace gonadotropiny při *in vitro* fertilizaci (IVF) u žen se syndromem polycystických ovarií (PCOS) vyvolává hyperstimulaci těmito hormony. Jako alternativní technologie IVF může být využita *in vitro* maturace (IVM) (Trounson et al., 1994). Úspěšnost této metody je oproti *in vivo* maturaci zatím nízká (Vuong et al., 2020). Vylepšení kultivačních médií by mohlo mít pozitivní vliv na úspěšnost maturace. Kapacitační *in vitro* maturace (CAPA-IVM) se zaměřuje na vylepšení prematuračního média jeho obohacením o C-type natriuretic peptid (CNP), estradiol, GDF-9 a FSH. CNP působí na receptor kumulárních buněk a reguluje množství cGMP a cAMP v oocytech, což vede ke zpoždění obnovení meiózy. Obohacení média o estradiol a GDF-9 zesiluje působení CNP na receptor. Oocyty kultivované v přítomnosti FSH

dosahují větší velikosti. Kultivace malých antrálních folikulů myši v CAPA-IVM prematuračním médiu umožňuje transzonálním spojům setrávat intaktní po delší dobu, prodlužuje trvání meiotického arresu a poskytuje oocytům lepší podmínky pro dosažení vývojové kompetence. Rozdíl v účinnosti zmíněných dvou metod je stále patrný, ale tento model otevírá nové možnosti pro další studium *in vitro* kultivace a maturace u lidí (Romero et al., 2016). Autoři studie z roku 2021 provedli srovnání COC maturovaných pomocí CAPA-IVM a *in vivo*. Významné změny v metabolismu oocytů pozorovány nebyly. Oproti tomu kvantitativní real-time PCR odhalilo rozdíly v expresi mnoha transkriptů kumulárních buněk ve stejných fázích maturace. Autoři zjistili, že COC během *in vivo* maturace exprimují 4x více Slc2a1 (GLUT1) než COC s oocyty v prvním meiotickém arresu. To naznačuje zvýšenou potřebu příjmu glukózy během maturace. U CAPA-IVM COC nebyly v expresi Slc2a1 během zmíněných dvou fází pozorovány rozdíly poukazující na sníženou glykolytickou aktivitu COC (Akin et al., 2021). Studie z roku 2022 se zaměřila na sledování rozdílů v metabolismu glukózy při IVM a *in vivo* maturaci. Kumulární buňky při IVM vykazovaly vyšší expresi laktát dehydrogenázy a sníženou aktivitu citrátového cyklu což ukazuje na možnost, že *in vitro* prostředí i přes vyšší koncentraci kyslíku podporuje anaerobní metabolismus. Schopnost COC využívat metabolismus glukózy jako zdroje energie při IVM je tedy zřejmě nedostatečná a vyžaduje budoucí optimalizace (Herta et al., 2022).

6.1.2 Hexosaminová dráha

Mezi minoritní dráhy zpracování glukózy v COC patří hexosaminová biosyntetická dráha (HBP) a polyolová dráha. HBP je důležitou metabolickou dráhou při expanzi kumulárních buněk, ale ovlivňuje i vývojovou kompetenci oocytů. Finální produkt této dráhy může být v buňkách zpracován jako substrát pro posttranslační připojení na proteiny jako O-GlcNAc (O-linked β -N-acetylglucosamine) (Frank et al., 2014). Poměr O-GlcNAc modifikovaných a nemodifikovaných proteinů má vliv i na úspěšnost oplození. O-GlcNAc transferáza odstraňuje O-GlcNAc z proteinů, a přestože její inhibicí nedochází k viditelným změnám při maturaci, úspěšnost IVF se výrazně snižuje a dochází k polyspermii (Zhou et al., 2019).

Autoři studie z roku 2020 se zaměřili na zkoumání vlivu aplikace prostaglandinu E2 na vývojovou kompetenci bovinních oocytů a zjišťovali jeho zapojení do procesů probíhajících během maturace. Tato studie jako první odhalila jeho stimulační vliv na metabolismus glukózy. Obohacení *in vitro* média o E2 vedlo ke zvýšenému příjmu glukózy COC a zvýšila se i produkce laktátu. Kumulární buňky exprimovaly vyšší množství mRNA pro glukózové transportéry a pro enzymy GFPT1 a GFPT2 zapojené do hexosaminové biosyntetické dráhy, naznačující

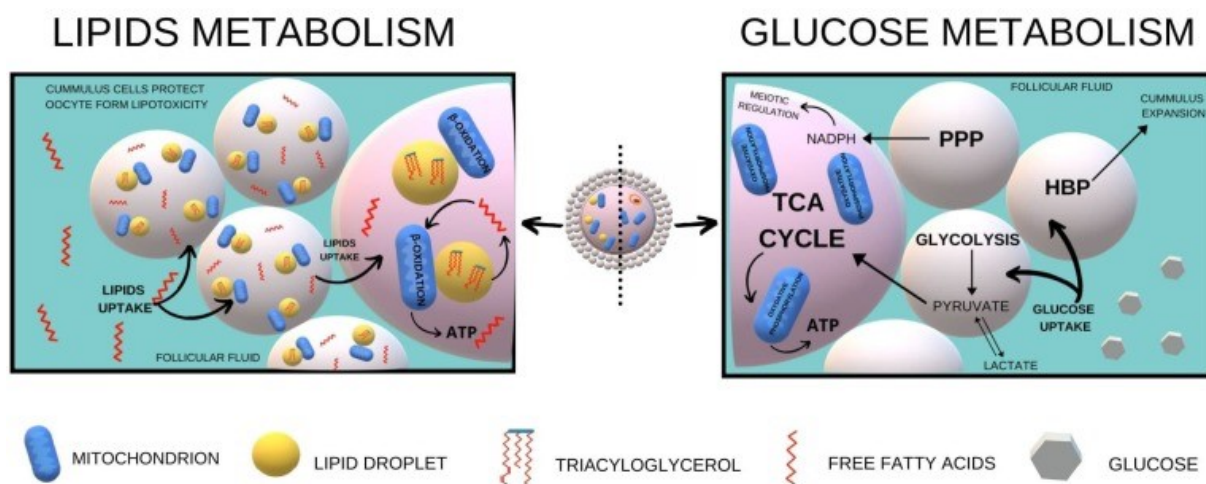
jejich roli v usměrňování spotřeby glukózy za účelem tvorby extracelulární matrix. Oproti kontrolní skupině měla testovaná skupina rozdílné množství mRNA asociovaných s antioxidačními účinky a snížila se u ní i apoptóza. Suplementace prostaglandinem E2 sice nezměnila počet maturovaných oocytů, ale vyprodukované blastocysty byly kvalitnější (Boruszewska et al., 2020).

6.1.3 Polyolová dráha

Polyolová dráha v kumulárních buňkách přeměňuje glukózu na sorbitol pomocí aldóza reduktázy. Suplementace sorbitolem během IVM v nízkých koncentracích (20mM) podporuje vznik blastocyst, zatímco vysoké koncentrace (100mM) výrazně snižují expanzi kumulárních buněk a jadernou maturaci. Vysoká koncentrace sorbitolu vedla ke vzniku více reaktivních forem kyslíku (ROS). U kontrolní skupiny nebo při nízkých koncentracích sorbitolu se hodnoty ROS nezměnily. Při kultivaci již maturovaných oocytů, které vyloučily první pólové tělíčko měl sorbitol negativní vliv na formaci blastocyst jak v nízkých, tak i ve vysokých koncentracích (Lin et al., 2013). Vliv věku na hodnoty sorbitolu *in vitro* maturovaných myších oocytů byl studován v publikaci Zhang et al., (2021). Autoři pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie naměřili u mladých myši v nezralých oocytech vyšší množství sorbitolu než v těch maturovaných (8 týdnů). U starých myši (9 měsíců) se naopak jeho hodnoty po IVM výrazně zvýšily, stejně jako exprese mRNA pro aldóza reduktázu. Hodnoty ROS byly v tomto případě také zvýšené a méně oocytů dokončilo maturaci. Po aplikaci inhibitoru aldóza reduktázy sorbinilu se úspěšnost maturace zvedla z původních 66,1 % na 82,4 %. Výsledky ukazují, že akumulace sorbitolu do vysoké koncentrace během IVM inhibuje jadernou maturaci oocytů.

6.2 Metabolismus lipidů

Oocyty v porovnání s kumulárními buňkami disponují mnohem vyšší metabolickou aktivitou enzymu lipázy. To poukazuje na roli metabolismu lipidů při jejich maturaci (Cetica et al., 2002). Během IVM se v kumulárních buňkách zvyšuje exprese 22 ze 27 zkoumaných genů figurujících v metabolismu lipidů. Kumulární buňky mají schopnost využívat zpracování lipidů (především oxidaci mastných kyselin a lipolýzu) jako zdroje energie pro vlastní funkci, což jim umožňuje následně podporovat energetický metabolismus oocytu (Sanchez-Lazo et al., 2014).



Obrázek 4: Schéma metabolismu lipidů a glukózy v COC. Cílem obou metabolismů je zajistit zdroje pro tvorbu ATP v oocytu. Lipidy se ve folikulárním prostředí mohou vyskytovat buď neesterifikované ve folikulární tekutině, kumulárních buňkách a cytoplasmě oocytu, nebo esterifikované ve formě triacylglycerolů v lipidových kapénkách. Energie z lipidů je v oocytu získávána oxidací mastných kyselin a beta oxidací. Metabolismus glukózy kumulárních buněk pomocí několika zásadních drah umožňuje transport pyruvátu NADPH do oocytu. Převzato z rev.: Warzych & Lipinska, (2020).

6.2.1 Lipidové kapénky

Lipidy jsou bohatým zdrojem energie, čehož by oocyt mohl využívat při rostoucích energetických nárocích v průběhu maturace. Tuto teorii podporuje studie z roku 2013, která sledovala obsah lipidových kapének v ooplazmách 4 skupin vzorků – nezralých a *in vitro* maturovaných bovinních oocytů buď v komplexech s CC, nebo oocytů s odebranými CC. K úbytku lipidových kapének došlo po IVM v obou skupinách. Denudované oocyty měly v ooplazmě nižší počet lipidových kapének, což ukazuje na odlišnosti v lipidovém metabolismu při přítomnosti a absenci CC. Zároveň ale byly lipidové kapénky v denudovaných oocytech větší, pravděpodobně kvůli snížené schopnosti spotřeby tohoto zdroje energie bez přítomnosti CC (Auclair et al., 2013). K úbytku lipidových kapének po IVM došlo i ve studii provedené na prasečích COC. (Malyszka et al., 2023). Studie z roku 2017 překvapivě přišla s opačnými výsledky. U denudovaných bovinních oocytů byly též pozorovány změny v obsahu lipidových kapének před a po IVM. Jejich počet se ale po maturaci zvýšil. Nesrovnalosti v obou studiích by se mohly týkat rozdílů v použitých médiích. IVM médium v této studii bylo suplementováno fafBSA (fatty acid free bovine serum albumine), zatímco ve studii z roku 2013 nikoliv (Warzych et al., 2017). Dále se tato studie zabývala rozdílným obsahem kapének v oocytech telat a dospělých krav. Oocyty telat obsahovaly před i po IVM výrazně nižší počet kapének než oocyty dospělých krav. Nebyla zde zjištěna korelace mezi velikostmi folikulů a počty

kapének. Jejich nízký počet by mohl souviset s nízkou vývojovou kompetencí oocytů prepubertálních telat (Warzych et al., 2017).

Médium pro IVM běžně obsahuje 10 % folikulární tekutiny. Její složení se ale mezi různými vzorky může lišit. Studie z roku 2023 se zaměřila na studium oocytů prepubertálních prasat maturovaných ve standardním médiu s 10 % obsahem folikulární tekutiny, která se ve dvou skupinách lišila podíly MK. Skupina s vysokým podílem MK se projevovala zvýšenou dynamikou akumulace lipidů do CC a stabilním obsahem lipidových kapének v oocytech. Druhá skupina s nízkým obsahem MK měla sníženou akumulaci lipidů v CC a obsah lipidových kapének v oocytech byl snížen. Úprava podílu MK ve folikulární tekutině by tedy mohla přispět ke zlepšení kvality *in vitro* maturovaných prasečích oocytů (Malyszka et al., 2023).

Kumulární buňky hrají důležitou roli při regulaci inkorporace lipidů do oocyty. Denudované oocyty kultivované v přítomnosti analogu mastných kyselin (MK) Bodipy 558/568 C12 vykazovaly již po 4 hodinách kultivace 60 % nárůst kapének v ooplazmě oproti oocytům s CC po 23 hodinách. Kumulární buňky aktivně moduluji transport mastných kyselin do oocyty tím, že je přeměňují na triacylglyceroly, které následně ukládají v lipidových kapénkách v cytoplazmě. Kumulární buňky se tak chovají jako bariéra pro vstup lipidů dále do oocyty a ochraňují ho před cytotoxickým efektem, který může být vyvolán jejich příliš vysokou koncentrací. Autoři pak dále studovali i efekt suplementace třemi nejhojnějšími MK přítomnými v bovinní folikulární tekutině – kyseliny palmitové, stearové a olejové. Po inkubaci s MK byly lipidové kapénky v COC imunologicky značeny pomocí peripilinu-2. Inkubace se zmíněnými MK silně zvýšila množství značených kapének v CC, ale nikoliv v oocyty. I přes narušení corony radiaty během inkubace byly zbylé CC schopné ochránit oocyt před cytotoxickým efektem kyseliny palmitové. Inkubace s touto kyselinou však vedla ke zvýšení koncentrace ceramidů spojovaných s apoptózou v CC i oocytech (Lolicato et al., 2015). Také u prasečích oocytů byly MK po kultivaci akumulovány v CC a vzniklé kapénky vykazovaly různou morfologii v závislosti na použité MK. Kyselina stearová způsobila vznik mnoha malých lipidových kapének v CC, zatímco kyselina olejová nezměnila jejich počet, ale způsobila zvýšení jejich objemu. Morfologie oocyty pozměněna nebyla. (Pawlak et al., 2020).

6.2.2 Negativní vliv lipidů

Vysoká koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin má negativní vliv na izolované somatické granulózní buňky, u nichž může způsobovat apoptózu. Indukuje vznik ROS a aktivuje metabolické dráhy ERK1/2 a p38MAPK vedoucí k apoptóze (Wang et al., 2020).

Zvýšená koncentrace kyseliny palmitové snižuje proliferaci a životaschopnost granulózních buněk. Oocyty vyvíjející se takovém prostředí mají zhoršenou schopnost dalšího vývoje (Shibahara et al., 2020). Neesterifikované MK mohou ve vysokých koncentracích snižovat vývojovou kompetenci prasečích oocytů. Množství těchto MK může být u jedinců zvýšené v důsledku některých patologických stavů. Testované COC byly kultivované při vysokých koncentracích neesterifikovaných MK s monovrstvou granulózních buněk. Po kultivaci byly oocyty oplozeny. Počet získaných blastocyst byl v testované skupině 10,5 % (oproti kontrolním 14,1 %) a i vývoj blastocyst probíhal pomaleji (Shi & Sirard, 2021b). Granulózní buňky přidávané do kultivačního *in vitro* média s COC zmírňují negativní efekt vysoké koncentrace NMK na oocyty, přestože přesný mechanismus není zatím známý. Pomocí rozdílů v genové expresi granulózních buněk vystavených vysokým koncentracím NMK oproti kontrolní skupině byly identifikovány aktivované metabolické dráhy. Hlavní pozorované změny se týkaly inhibice diferenciac granulózních buněk na buňky nástěnné granulózy, metabolismu mitochondrií, zánětlivé odpovědi a buněčného cyklu. Tyto rozdíly by mohly přispívat k protekci COC během IVM a získané poznatky by mohly přispět ke zlepšení kultivačních médií (Shi & Sirard, 2021a).

Ženy s BMI (body mass index) > 30 mají průměrně v krvi a folikulární tekutině více nízkodenzitních lipoproteinů a C-reaktivních proteinů, než ženy s BMI < 25. U pacientek s vyšším BMI probíhá rýhování déle a kvalita i kvantita embryí je snižena. Studie z roku 2020 překvapivě neodhalila efekt BMI na obsah lipidů v kumulárních ani granulózních buňkách a ani pravděpodobnost otěhotnění se nezměnila. Ženy, které dosáhly úspěšného oplodnění měly nižší obsah lipidů v kumulárních a granulózních buňkách nezávisle na BMI (Raviv et al., 2020).

6.2.3 Role melatoninu v metabolismu lipidů

Melatonin ovlivňuje některé děje v komplexech oocytů a kumulárních buněk. Zlepšuje například jejich toleranci vůči teplotnímu stresu (Li et al., 2015). Pro otestování role melatoninu v metabolismu lipidů COC byly použity inhibitory triacsin C, rotenon nebo etomoxir. Ve všech testovaných skupinách byly pro vizualizaci využity sondy Lipi-blue a Lipi-green, které umožňují monitorování změn v obsahu lipidů v živých buňkách. Zaznamenaná fluorescence sond se snížila během přechodu oocytu do metafáze II, poukazující na mobilizaci lipidů jako zdroje energie pro oocyty. Skupina se suplementací melatoninem vykazovala vyšší intenzitu modré fluorescence, indikující méně mobilizovaných lipidů. U oocytů ošetřených inhibitorem etomoxirem (inhibitor oxidace MK) fluorescence také vzrostla a následná aplikace melatoninu její intenzitu neovlivnila. Naopak po aplikaci triascinu C (inhibitor tvorby diacylglycerolů, triacylglycerolů a cholesterolu) a rotenonu (inhibitor elektron transportního řetězce

mitochondrií) se fluorescence snížila. Ošetření melatoninem mělo reverzibilní účinek na vliv těchto inhibitorů. Tyto výsledky naznačují, že melatonin potlačuje lipolýzu a podporuje ukládání lipidů v maturujících prasečích oocytech, čímž zvyšuje jejich vývojovou kompetenci. Úlohou kumulárních buněk v modulaci metabolismu lipidů pomocí melatoninu je exprese receptorů pro melatonin MT1/MT2. Melatonin prostřednictvím těchto receptorů signalizuje změnu genové exprese, která souvisí především s tvorbou antioxidantů, metabolismem lipidů a mitochondriální respirací (Zhu et al., 2021). Po použití melatoninu vzrůstá exprese obou jeho receptorů v CC a při použití jeho antagonistů klesá. Kumulární buňky narozdíl od oocytů po suplementaci melatoninem nepodporují ukládání lipidů do kapének, ale snižují jejich množství a předpokládá se, že tyto kapénky jsou zpracovány právě lipolýzou (Jin et al., 2022).

7. Expanze kumulárních buněk

Expanze kumulárních buněk úzce souvisí s maturací oocyty. Ten zůstává až do jejího počátku v prvním meiotickém arretu. Vzájemný fyzický kontakt mezi CC a oocytem mu umožňuje v této fázi setrávat. Porušení vazeb mezi buňkami způsobené přívalem gonadotropinů funguje jako impulz pro obnovení meiózy (Racowsky & Baldwin, 1989). Gap junctions mezi buňkami zanikají a v kumulárních buňkách dochází k syntéze kyseliny hyaluronové (Chen et al., 1990). Expanze kumulárních buněk je obecně uznávána jako ukazatel vývojové kompetence oocytů. Extracelulární matrix produkovaná CC při expanzi se skládá především z kyseliny hyaluronové a dalších látek jako jsou TNF-stimulated gene 6, pentraxin 3 a těžké řetězce odvozené od inter-alfa-inhibitorových proteinů. Delece v oocytárním genu pro core 1 O-glykoprotein myši způsobuje změny při expanzi mutantních COC. Úroveň expanze je u mutantů oproti kontrolní skupině redukována o 32 %, vzdálenost mezi CC corony radiaty a oocytem je snižena a těžké řetězce jsou hustěji rozmístěny. Mutace způsobující pozměněný fenotyp však nemá negativní vliv na průběh ovulace ani na schopnost oplození a naznačuje tak značnou flexibilitu systému (Ploutarchou et al., 2015).

Jedním z pokusů o vylepšení kultivačního média pro IVM je FLI maturační médium, které se skládá z chemicky definovaného média suplementovaného FGF2 (fibroblast growth factor 2), LIF (leukemia inhibitory factor) a IGF 1 (insulin growth factor 1). Médium se ukázalo jako velmi efektivní, jelikož dvakrát navýšilo produkci blastocyst oproti standardnímu médiu a následně se zdvojnásobil i počet narozených selat recipientních prasnic. Předpokládá se, že pozitivní vliv FLI média je pravděpodobně způsoben změnami v načasování aktivace MAPK1/3 v kumulárních buňkách. To ovlivňuje iniciaci maturace oocytů a expanzi CC.

Měření v několikahodinových úsecích ukázalo znatelné změny ve fosforylaci MAPK1/3. Expanze kumulárních buněk se výrazně lišila mezi 3. a 6. hodinou kultivace. Vrstva kumulárních buněk se zmenšovala až do 6. hodiny kultivace, kdy došlo k rapidní expanzi. Na konci kultivace byla expanze FLI kultivovaných buněk mnohem výraznější než u standardně kultivovaných buněk (Yuan et al., 2017). Luteinizační hormon působí na somatické buňky folikulu, které jako odpověď na signál aktivují MAPK signalizaci. Důsledkem aktivace této dráhy je rozrušení gap junctions v COC (Sela-Abramovich et al., 2005). Po 42 hodinách kultivace ve FLI médiu bylo méně spojů mezi buňkami intaktních. Analýza genové exprese kumulárních buněk ukázala rozdíly v expresi sledovaných genů v různých fázích kultivace mezi oběma skupinami. Změny by mohly vysvětlovat chování kumulárních buněk během různých fází kultivace. Zmenšení vrstvy kumulárních buněk do 6. hodiny kultivace by mohlo ochraňovat oocyt před stresory (Yuan et al., 2017).

Výzkum z roku 2021 přišel s objevem, že alespoň u prasečích oocytů by nemusela být expanze kumulárních buněk ani stimulace gonadotropiny pro maturaci oocytů *in vitro* vůbec potřebná. FLI médium zesilovalo účinky gonadotropinů, které vedly k aktivaci MAPK1/3. Při absenci gonadotropinů však nebyl pozorován účinek FLI média na aktivaci MAPK1/3 a expanze CC téměř neprobíhala. Oocyty maturované tímto způsobem překvapivě ale neztratily schopnost získání jaderné a cytoplazmatické kompetence pro oplození a následnou produkci potomků. Tento objev zpochybňuje obecně přijímanou hypotézu, že expanze kumulárních buněk je pro nabytí vývojové kompetence oocytů při IVM nezbytná. Přesné mechanismy musí být teprve popsány (Redel et al., 2021).

8. Závěr

Role kumulárních buněk při růstu a maturaci oocytů je v této bakalářské práci demonstrována na mnoha studiích. Kumulární buňky spolu s oocyty vytvářejí komplexy zprostředkovávající oboustrannou signalizaci a metabolickou spolupráci. Signály mohou být v rámci komplexů předávány jak parakrinně, tak pomocí gap junctions. Signalizace ze strany oocyty má vliv na změnu genové exprese v kumulárních buňkách.

Přítomnost kumulárních buněk na oocyty umožňuje pomocí intaktních spojů udržování meiotického arresu. Narušení komplexů při jejich uvolňování z folikulů může vést k porušení komunikace mezi buňkami a u dostatečně velkých oocytů může dojít k předčasnému obnovení meiózy. Studie odhalily vliv cyklických nukleotidů na udržování meiotického arresu, nicméně přesný mechanismus se stále zkoumá. Existují dvě hypotézy přesného mechanismu, z nichž první navrhuje transport cAMP do oocyty z kumulárních buněk pomocí gap junctions a druhá podporuje generování cAMP oocytem, kde kumulární buňky mají pouze stimulační efekt na adenylát cyklázu. V obou případech kumulární buňky hrají důležitou roli. Kromě cAMP se v signalizaci uplatňuje i další cyklický nukleotid cGMP, který je kumulárními buňkami syntetizovaný a následně transportovaný do oocyty. Zde přispívá k udržování meiotického arresu inhibicí fosfodiesterázy 3A hydrolyzující cAMP. Obnovení meiózy je dáno porušením spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami. Donedávna se usuzovalo, že signál pro tento jev přichází z oocyty. Nová studie Abbassi et al., (2021) však přinesla poznatek, že luteinizační hormon působící na buňky nástěnné granulózy indukuje produkci ligandu EGF působícího na kumulární buňky, které po obdržení signálu přerušují transzonální spoje mezi nimi a oocytem.

U denudovaných oocytů v médiu s glukózou jako jediným zdrojem energie nedochází k maturaci. Kromě nízké exprese glukózových transportérů u oocytů u nich byla zaznamenána i nízká přítomnost enzymů figurujících v glykolýze. Oocyty jsou schopné maturovat v médiu s pyruvát, glutaminem a glycinem, což poukazuje na značné využívání oxidativní fosforylace jako zdroje energie. Kumulární buňky naopak exprimují hojné množství glykolytických enzymů. Média podporující glykolýzu v kumulárních buňkách zvyšují vývojovou kompetenci oocytů, z čehož můžeme usoudit jejich podpůrnou funkci pro energetický metabolismus oocyty. Zatímco glykolýza hraje významnou roli především v transportu energetických substrátů do oocyty, další metabolické dráhy zpracování glukózy v kumulárních buňkách mohou přispívat ke zlepšení vývojové kompetence. Kumulární buňky kromě metabolismu glukózy ovlivňují i metabolismus lipidů v oocytech regulací akumulace

lipidových kapének do ooplazmy. Lipidové kapénky mohou sloužit jako zdroje energie pro oocyty při jejich rostoucích energetických nárocích během maturace, na což poukazuje vysoká aktivita enzymu lipázy. Kumulární buňky mimo jiné ochraňují oocyty před cytotoxickým efektem nenasycených mastných kyselin regulací jejich prostupu do ooplazmy a jejich ukládáním do vlastní cytoplazmy.

Za obecně přijímaný marker vývojové kompetence je považována expanze kumulárních buněk. S objevem FLI maturačního média byl tento ukazatel však zpochybněn. FLI maturační médium bylo vyvinuto suplementací chemicky definovaného média FGF2, LIF a IGF 1 a ukázalo se být velmi efektivní, jelikož umožnilo zdvojnásobení počtu vzniklých blastocyst. Nová studie z roku 2021 odhalila schopnost tohoto média maturovat prasečí oocyty bez expanze kumulárních buněk.

I přes snahy novodobých studií vylepšit *in vitro* kultivační a maturační média stále nejsou výsledky maturace *in vitro* srovnatelné s maturací *in vivo*. Nové poznatky však otevírají možnosti pro další výzkum umožňující lepší pochopení a napodobení složitých dějů probíhajících mezi buňkami folikulu v jejich přirozeném prostředí.

Reference

Přehledové články jsou označeny *

- Abbassi, L., El-Hayek, S., Carvalho, K. F., Wang, W., Yang, Q., Granados-Aparici, S., Mondadori, R., Bordignon, V., & Clarke, H. J. (2021). Epidermal growth factor receptor signaling uncouples germ cells from the somatic follicular compartment at ovulation. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21644-z>
- Akin, N., Von Mengden, L., Herta, A. C., Billooye, K., Van Leersum, J., Cava-Cami, B., Saucedo-Cuevas, L., Klamt, F., Smitz, J., & Anckaert, E. (2021). Glucose metabolism characterization during mouse *in vitro* maturation identifies alterations in cumulus cells. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab008>
- Alvarez, G., Dalvit, G., & Cetica, P. (2012). Influence of the cumulus and gonadotropins on the metabolic profile of porcine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01943.x>
- Alvarez, G., Ferretti, E., Gutnisky, C., Dalvit, G., & Cetica, P. (2013). Modulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway influences porcine oocyte *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/rda.12123>
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R., & Uzbekova, S. (2013). Absence of cumulus cells during *in vitro* maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00469.2012>
- Baumgarten, S. C., Convissar, S. M., Fierro, M. A., Winston, N. J., Scoccia, B., & Stocco, C. (2014). IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human cumulus granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1139>
- Biggers, J. D., Whittingham, D. G., & Donahue, R. P. (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.58.2.560>
- Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Suwik, K., Staszkiwicz-Chodor, J., Jaworska, J., Lukaszuk, K., & Woclawek-Potocka, I. (2020). Prostaglandin E2 affects *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00598-9>

- Carlsson, I. B., Laitinen, M. P. E., Scott, J. E., Louhio, H., Velentzis, L., Tuuri, T., Aaltonen, J., Ritvos, O., Winston, R. M. L., & Hovatta, O. (2006). Kit ligand and c-Kit are expressed during early human ovarian follicular development and their interaction is required for the survival of follicles in long-term culture. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00868>
- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., & Beconi, M. (2002). Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/rep.0.1240675>
- Chen, L., Wert, S. E., Hendrix, E. M., Russell, P. T., Cannon, M., & Larsen, W. J. (1990). Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260307>
- Dan-Goor, M., Sasson, S., Davarashvili, A., & Almagor, M. (1997). Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/humrep/12.11.2508>
- Dekel, N. (1988). Regulation of oocyte maturation: The role of camp. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb22258.x>
- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.019>
- Downs, S. M., Buccione, R., & Eppig, J. J. (1992). Modulation of meiotic arrest in mouse oocytes by guanyl nucleotides and modifiers of G-proteins. *Journal of Experimental Zoology*. <https://doi.org/10.1002/jez.1402620405>
- Downs, S. M., Daniel, S. A. J., & Eppig, J. J. (1988). Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *Journal of Experimental Zoology*. <https://doi.org/10.1002/jez.1402450113>
- Eppig, J. J. (1977). Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90135-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90135-x)

- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F., & Hirao, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.976>
- Esfandyari, S., Winston, N. J., Fierro, M. A., Scoccia, H., & Stocco, C. (2021). Oocyte-secreted factors strongly stimulate sFRP4 expression in human cumulus cells. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab031>
- Frank, L. A., Sutton-Mcdowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2014). The effect of peri-conception hyperglycaemia and the involvement of the hexosamine biosynthesis pathway in mediating oocyte and embryo developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.22299>
- Gore-langton, R. E., J Daniel, S. A., & John Robarts, T. P. (1990). Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.65>
- Herta, A. C., von Mengden, L., Akin, N., Billooye, K., Coucke, W., van Leersum, J., Cava-Cami, B., Saucedo-Cuevas, L., Klamt, F., Smitz, J., & Anckaert, E. (2022). Characterization of carbohydrate metabolism in *in vivo* and *in vitro* grown and matured mouse antral follicles. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac124>
- Hsieh, M., Boerboom, D., Shimada, M., Lo, Y., Parlow, A. F., Luhmann, U. F. O., Berger, W., & Richards, J. A. S. (2005). Mice null for frizzled4 (*Fzd4*^{-/-}) are infertile and exhibit impaired corpora lutea formation and function. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042739>
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W., & Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01919-06>
- Hussein, T. S., Froiland, D. A., Amato, F., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.02644>
- Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051516>

- Jacquet, P., Adriaens, I., Buset, J., Neefs, M., & Vanckerkom, J. (2005). Cytogenetic studies in mouse oocytes irradiated *in vitro* at different stages of maturation, by use of an early preantral follicle culture system. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.008>
- Jin, J. X., Sun, J. T., Jiang, C. Q., Cui, H. Di, Bian, Y., Lee, S., Zhang, L., Lee, B. C., & Liu, Z. H. (2022). Melatonin regulates lipid metabolism in porcine cumulus–oocyte complexes via the melatonin receptor. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox11040687>
- Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G. C., & Kidder, G. M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.5.1263>
- Kovo, M., Kandli-Cohen, M., Ben-Haim, M., Galiani, D., Carr, D. W., & Dekel, N. (2006). An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00824>
- Krisher, R. L., & Bavister, B. D. (1999). Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U)
- Li, Y., Li, R.-Q., Ou, S.-B., Zhang, N.-F., Ren, L., Wei, L.-N., Zhang, Q.-X., & Yang, D.-Z. (2014). Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-81>
- Li, Y., Zhang, Z. Z., He, C. J., Zhu, K. F., Xu, Z. Y., Ma, T., Tao, J. L., & Liu, G. S. (2015). Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/jpi.12268>
- Lin, T., Zhang, J. Y., Diao, Y. F., Kang, J. W., & Jin, D. Il. (2013). Effects of sorbitol on porcine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000567>
- Lolicato, F., Brouwers, J. F., van de Lest, C. H. A., Wubbolts, R., Aardema, H., Priore, P., Roelen, B. A. J., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2015). The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120634>

- Malyszka, N., Pawlak, P., Cieslak, A., Szkudelska, K., & Lechniak, D. (2023). Distinct dynamics of lipid accumulation by porcine cumulus cells during *in vitro* maturation with follicular fluid of low and high fatty acid contents. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.015>
- Maman, E., Yung, Y., Cohen, B., Konopnicki, S., Dal Canto, M., Fadini, R., Kanety, H., Kedem, A., Dor, J., & Hourvitz, A. (2011). Expression and regulation of sFRP family members in human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar010>
- Marangos, P., & Carroll, J. (2012). Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.063>
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G. B., Hirota, S. A., Slaba, I., Waterhouse, C. C. M., Beck, P. L., Muruve, D. A., & Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1195491>
- Mehlmann, L. M., Jones, T. L. Z., & Jaffe L. A. (2002). Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a G protein in the oocyte. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1073978>
- Motlik, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720323>
- Motta, P. M., Makabe, S., Nagur, T., & Correr, S. (1994). Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology*. <https://doi.org/10.1679/aohc.57.369>
- Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J. J., Richani, D., White, M. A., Martin, G. A., Trotta, A. P., Ritter, L. J., Shi, J., Mueller, T. D., Harrison, C. A., & Gilchrist, R. B. (2015). Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671487>
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2009). Cyclic GMP from the

- surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>
- Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L. C., & Conti, M. (2004). EGF-Like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1092463>
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6994>
- Pawlak, P., Malyszka, N., Szczerbal, I., & Kolodziejewski, P. (2020). Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa045>
- Ploutarchou, P., Melo, P., Day, A. J., Milner, C. M., & Williams, S. A. (2015). Molecular analysis of the cumulus matrix: Insights from mice with O-glycan-deficient oocytes. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0503>
- Prochazka, R., Kalab, P., & Nagyova, E. (2003). Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005520>
- Racowsky, C., & Baldwin, A. V. (1989). *In vitro* and *in vivo* studies reveal that hamster oocyte meiotic arrest is maintained only transiently by follicular fluid, but persistently by membrana/cumulus granulosa cell contact. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(89\)90102-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(89)90102-4)
- Rao, Y. P., Miyano, T., & Kato, S. (1990). Fertilization of *in vitro* grown mouse oocytes. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80006-8)
- Raviv, S., Hantisteanu, S., Sharon, S. M., Atzmon, Y., Michaeli, M., & Shalom-Paz, E. (2020). Lipid droplets in granulosa cells are correlated with reduced pregnancy rates. *Journal of Ovarian Research*. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0606-1>
- Redel, B. K., Spate, L. D., Yuan, Y., Murphy, C. N., Roberts, R. M., & Prather, R. S. (2021). Neither gonadotropin nor cumulus cell expansion is needed for the maturation of competent porcine oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaob090>

- Reizel, Y., Elbaz, J., & Dekel, N. (2010). Sustained activity of the EGF receptor is an absolute requisite for LH-induced oocyte maturation and cumulus expansion. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0267>
- Richard, F. J., Tsafiriri, A., & Conti, M. (2001). Role of Phosphodiesterase Type 3A in Rat Oocyte Maturation. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1444>
- Rieger, D., & Loskutoff, N. M. (1994). Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000257>
- Roberts, R., Stark, J., Iatropoulou, A., Becker, D. L., Franks, S., & Hardy, K. (2004). Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: Response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol-3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023549>
- Romero, S., Sánchez, F., Lolicato, F., Van Ranst, H., & Smitz, J. (2016). Immature oocytes from unprimed juvenile mice become a valuable source for embryo production when using C-type natriuretic peptide as essential component of culture medium. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139808>
- Sanchez-Lazo, L., Brisard, D., Elis, S., Maillard, V., Uzbekov, R., Labas, V., Desmarchais, A., Papillier, P., Monget, P., & Uzbekova, S. (2014). Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1049>
- Sela-Abramovich, S., Chorev, E., Galiani, D., & Dekel, N. (2005). Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1006>
- Seung, J. H., Chen, R., Paronetto, M. P., & Conti, M. (2005). Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.056>
- Shi, M., & Sirard, M. A. (2021a). Cocultured porcine granulosa cells respond to excess non-esterified fatty acids during *in vitro* maturation. *Journal of Ovarian Research*. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00904-y>

- Shi, M., & Sirard, M. A. (2021b). Effects of NEFAs during IVM on pig embryos from granulosa cell-cocultured oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.23548>
- Shibahara, H., Ishiguro, A., Inoue, Y., Koumei, S., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2020). Mechanism of palmitic acid-induced deterioration of *in vitro* development of porcine oocytes and granulosa cells. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.006>
- Shuhaibar, L. C., Egbert, J. R., Norris, R. P., Lampe, P. D., Nikolaev, V. O., Thunemann, M., Wen, L., Feil, R., & Jaffe, L. A. (2015). Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423598112>
- Simon, A. M., Daniel A Goodenought D A, En Ll, & Paul D L. (1996). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/385525a0>
- Su, Y. Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Affourtit, J. P., Pangas, S. A., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2008). Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.009068>
- Sugiura, K., Pendola, F. L., & Eppig, J. J. (2005). Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.027>
- Sugiura, K., Su, Y. Q., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2010). Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0260>
- Sun, M. H., Zheng, J., Xie, F. Y., Shen, W., Yin, S., & Ma, J. Y. (2015). Cumulus cells block oocyte meiotic resumption via gap junctions in cumulus oocyte complexes subjected to DNA double-strand breaks. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143223>
- * Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0345>

- Trounson, A., Wood, C., & Kausche, M. B. B. S. A. (1994). *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertility and Sterility*. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56891-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56891-5)
- * Turathum, B., Gao, E. M., & Chian, R. C. (2021). The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>
- Vuong, L. N., Ho, V. N. A., Ho, T. M., Dang, V. Q., Phung, T. H., Giang, N. H., Le, A. H., Pham, T. D., Wang, R., Smitz, J., Gilchrist, R. B., Norman, R. J., & Mol, B. W. (2020). *In vitro* maturation of oocytes versus conventional IVF in women with infertility and a high antral follicle count: A randomized non-inferiority controlled trial. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa240>
- Wang, Y., Li, C., Li, J., Wang, G., & Li, L. (2020). Non-esterified fatty acid-induced reactive oxygen species mediated granulosa cells apoptosis is regulated by NRF2/P53 signaling pathway. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox9060523>
- * Warzych, E., & Lipinska, P. (2020). Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *Journal of Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-102>
- Warzych, E., Pawlak, P., Pszczola, M., Cieslak, A., & Lechniak, D. (2017). Prepubertal heifers versus cows —The differences in the follicular environment. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.007>
- * Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- Wen, J., Wang, G. L., Yuan, H. J., Zhang, J., Xie, H. L., Gong, S., Han, X., & Tan, J. H. (2020). Effects of glucose metabolism pathways on nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59709-6>
- Yuan, Y., Spate, L. D., Redel, B. K., Tian, Y., Zhou, J., Prather, R. S., & Roberts, R. M. (2017). Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703998114>

- Zhang, X., Zhang, W., Wang, Z., Zheng, N., Yuan, F., Li, B., Li, X., Deng, L., Lin, M., Chen, X., & Zhang, M. (2022). Enhanced glycolysis in granulosa cells promotes the activation of primordial follicles through mTOR signaling. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04541-1>
- Zhang, Y., Yan, Z., Liu, H., Li, L., Yuan, C., Qin, L., Cai, L., Liu, J., Hu, Y., & Cui, Y. (2021). Sorbitol accumulation decreases oocyte quality in aged mice by altering the intracellular redox balance. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.203747>
- Zhou, L. T., Romar, R., Pavone, M. E., Soriano-Úbeda, C., Zhang, J., Slawson, C., & Duncan, F. E. (2019). Disruption of O-GlcNAc homeostasis during mammalian oocyte meiotic maturation impacts fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.23131>
- Zhu, T., Guan, S., Lv, D., Zhao, M., Yan, L., Shi, L., Ji, P., Zhang, L., & Liu, G. (2021). Melatonin modulates lipid metabolism in porcine cumulus–oocyte complex via its receptors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648209>