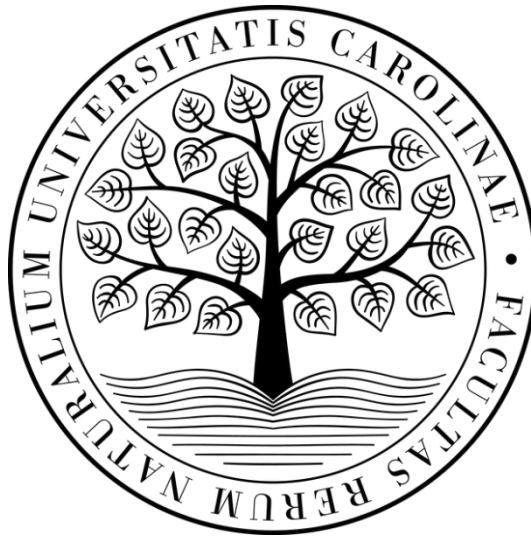


Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Chyská

Molekulární aspekty kvality oocytů a embryí

Molecular aspects of mammalian oocyte and embryo quality

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Michaela Vaškovičová

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, 3. 8. 2023

Anna Chyská

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Michaele Vaškovičové za velmi přínosné a cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala po celou dobu psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Dávidu Drutovičovi, Ph.D. za jeho ochotu, věcné rady a vstřícnost při konzultacích během vypracování této bakalářské práce. Také děkuji své rodině a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

V České republice se podle statistik s neplodností setkává až 20 % párů a toto procento stále stoupá. Jednou z možností léčby neplodnosti je podstoupení některé z metod asistované reprodukce. Mezi nejčastější používané metody patří tzv. mimotělní oplodnění (*in vitro* fertilizace, IVF). Za účelem zvýšení pravděpodobnosti úspěšného oplodnění je preferováno disponovat kvalitním oocytem se specifickými vlastnostmi. Takový oocyt je pak předpokladem pro kvalitní embryo, správný průběh těhotenství a správný vývoj plodu. Meiózu, která je klíčovým krokem při tvorbě oocytů, regulují složité signální dráhy. Pokud jsou tyto dráhy nefunkční, snižuje se šance oocytu vyvinout se v kompetentní embryo. Například chyby v segregaci během meiózy vedou k aneuploidii, která je hlavní příčinou potratů a vrozených vad. Pochopení signálních drah může pomoci určit původ chyb, které mají za následek vznik aneuploidií, a tím přispět ke zlepšení reprodukčního zdraví žen.

Klíčová slova:

aneuploidie, dělicí vřeténko, *in vitro* fertilizace, kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka, kvalita oocytů, segregace chromozomů

Abstract

According to statistics in the Czech Republic, up to 20 % of couples experience infertility, which is still rising. One of the infertility treatment options is to undergo one of the assisted reproduction methods. In vitro fertilization (IVF) is among the most commonly used methods. In order to increase the success rate of fertilization, it is preferable to have a quality oocyte with specific characteristics. Such an oocyte is then a prerequisite for a good quality embryo, a correct course of pregnancy, and proper fetal development. Meiosis, a key step in oocyte formation, is regulated by complex signalling pathways. If these pathways are dysfunctional, the chances of the oocyte developing into a competent embryo are reduced. For example, errors in segregation during meiosis lead to aneuploidy, which is a major cause of miscarriages and birth defects. Therefore, understanding the signaling pathways can help identify the origin of the errors that result in aneuploidy and thus contribute to improving women's reproductive health.

Key words:

aneuploidy, spindle, in vitro fertilization, spindle assembly checkpoint, oocyte quality, chromosome segregation

Obsah

Seznam ilustrací.....	6
Seznam zkratk.....	7
Úvod.....	10
1 Kvalita oocytů a embryí v metodách asistované reprodukce	11
1.1 In vitro fertilizace	11
1.2 Kvality oocytů/vývojové kompetence oocytů a raných embryí.....	12
2 Morfologické a buněčné faktory při hodnocení kvality oocytů.....	13
2.1 Polární tělísko.....	13
2.2 Zona pellucida.....	13
2.3 Komplex kumulus-oocyt.....	14
2.4 Meiotické vřetenko.....	14
2.5 Vliv apoptózy	16
2.6 Remodelace extracelulární matrix.....	18
3 Molekulární faktory ovlivňující kvalitu oocytů a raných embryí.....	19
3.1 Složení folikulární tekutiny	19
3.2 Vnitřní faktory ovlivňující kvalitu oocytu.....	19
3.2.1 Vliv mitochondrií na kvalitu oocytů a raných embryí.....	19
3.2.2 Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza.....	20
3.3 Metabolismus steroidů	20
4 Signální dráhy ovlivňující kvalitu oocytu a embrya.....	22
4.1 Udržení oocytu v diktyotenním stadiu profáze I.....	22
4.2 Znovuzahájení meiózy I.....	23
4.3 Segregace chromozomů	24
4.4 Signální dráhy regulující výstavbu dělicího vřetenka	24
4.4.1 RanGTP dráha	25
4.4.2 CPC dráha.....	26
4.4.3 Sestavení dělicího vřetenka	27
4.4.4 Role Aurora kináz.....	28
4.5 Kontrolní bod sestavení vřetenka.....	29
Závěr.....	30
Použitá literatura.....	31

Seznam ilustrací

Obr. 1 Lokalizace folikulárních buněk a oocytu	16
Obr. 2 Rozdíl mezi mitotickým a meiotickým dělicím vřeténkem	25
Obr. 3 Signální dráhy regulující výstavbu dělicího vřeténka	26

Seznam zkratek

ADAMTS-1	ADAM-metalopeptidáza s trombospondinovými motivy typu 1
aMTOC	Acentriolární mikrotubuly organizující centra (z angl. acentriolar microtubule organizing center)
APC/C	Anafázi podporující komplex/cyklozom (z angl. anaphase-promoting complex/cyclosome)
ART	Metody asistované reprodukce (z angl. assisted reproductive technology)
ATP	Adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
AURK	Aurora kinázy
AURKA	Aurora kináza A
AURKB	Aurora kináza B
AURKC	Aurora kináza C
BAX	z angl. Bcl-2-associated X protein
BCB	z angl. Brilliant cresyl blue
BicD2	z angl. bicaudal D cargo adaptor 2
BUB1	z angl. budding uninhibited by benzimidazoles 1
BUBR1	z angl. BUB-related protein 1
BUB3	z angl. budding uninhibited by benzimidazoles 3
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát (z angl. cyclic adenosine monophosphate)
CC	Kumulární buňka (z angl. cumulus cell)
CDC20	Aktivátor APC (z angl. cell division cycle 20)
CDC25B	z angl. cell division cycle 25 B
CDK1	Cyklin-dependentní kináza 1 (z angl. cyclin-dependent kinase)
CGC	Kumulární granulózní buňka (z angl. cumulus granulosa cell)
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát (z angl. cyclic guanosine monophosphate)
cKO	Kondicionální knock-out (z angl. conditional knockout)
COC	Komplex kumulus-oocyte (z angl. cumulus oocyte complex)
CPC	z angl. chromosomal passenger complex
Cx43	Konexin 43
EGF	Epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor)
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. epidermal growth factor receptor)
FF	Folikulární tekutina (z angl. follicular fluid)
FRET	Fluorescenční rezonanční přenos energie (z angl. fluorescence resonance energy transfer)
FSH	Folikulostimulační hormon
G6PDH	Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza
GC	Granulózní buňka (z angl. granulosa cell)
GTP	Guanosintrifosfát (z angl. guanosine triphosphate)
GV	Zárodečný váček (z angl. germinal vesicle)

GVBD	Rozpad zárodečného váčku (z angl. germinal vesicle breakdown)
HURP	z angl. hepatoma upregulated protein
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermií (z angl. intracytoplasmic sperm injection)
IGF	z angl. insulin-like growth factor
IGFBP4	z angl. insulin-like growth factor binding protein 4
INCENP	Vnitřní centromerický protein
IVF	Mimotělní oplodnění (z angl. in vitro fertilization)
KIF11	z angl. kinesin family member 11
KNL1	z angl. kinetochore scaffold 1
KO	Genový knock-out
LC3-II	z angl. mikrotubule associated protein 1 light chain 3
LH	Luteinizační hormon (z angl. luteinizing hormone)
LHCGR	z angl. luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
MAD1	z angl. mitotic arrest deficient 1
MAD2	z angl. mitotic arrest deficient 2
MCC	Komplex mitotického kontrolního bodu (z angl. mitotic checkpoint complex)
MGC	Murální granulózní buňka (z angl. mural granulosa cell)
MII	Meióza II
MPF	Faktor podporující zrání (z angl. maturation promoting factor)
MPS1	z angl. monopolar spindle 1
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
MTOC	Mikrotubuly organizující centra
MYT1	z angl. myelin transcription factor 1
NEBD	Rozpad jaderné membrány (z angl. nuclear envelope breakdown)
NPPC	z angl. natriuretic peptide precursor C
NPR2	z angl. natriuretic peptide receptor 2
NuMa	Protein jaderného mitotického aparátu (z angl. nuclear mitotic apparatus protein)
PAPPA	Pappalysin-1
PCM	Pericentriolární matrix
PDE3A	Fosfodiesteráza typu 3A
PDE5	Fosfodiesteráza typu 5
PKA	Proteinkináza A
PLK1	Polo-like kináza 1 (z angl. polo-like kinase 1)
Ran	GTPáza Ran (z angl. Ras-related nuclear protein)
RCC1	z angl. regulator of chromosome condensation 1

RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
SAC	Kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka (z angl. spindle assembly checkpoint)
SAF	Faktor sestavení dělicího vřeténka (z angl. spindle assembly factor)
SERPINE2	Inhibitor serinové proteázy
Thr14	Threonin 14
TPX2	z angl. targeting protein for Xklp2
Tyr15	Tyrosin 15
WEE1	z angl. western equine encephalitis

Úvod

Kvalitní oocyt, který vykazuje specifické vlastnosti, přispívá ke zlepšení reprodukčních výsledků. Je tedy předpokladem pro kvalitní embryo, správný průběh těhotenství a vývoj plodu. Pokud oocyt či embryo nedosahují určitých kompetencí pro správnou funkčnost, mohou se vyskytnout problémy, jakými jsou například aneuploidie (stav, kdy se v buňce nenachází správný počet chromozomů) nebo neplodnost. Problematika neplodnosti je palčivým tématem již několik desítek let. Podle dostupných dat se s touto nemocí v dnešní době potýká až 15 % párů po celém světě (Gerrits et al., 2017). Infertilita je definována jako neschopnost počít během jednoho roku a déle. Jednou z možností dostupné léčby je podstoupit některou z metod asistované reprodukce (ART, z angl. assisted reproductive technology). ART zahrnuje lékařské léčebné techniky, při kterých se manipuluje se zárodečnými buňkami nebo embryi. Nejčastější a velmi známou metodou je *in vitro* fertilizace (IVF, z angl. In vitro fertilization). Výzkum zaměřený na identifikaci potenciálních příčin špatné kvality oocytů má význam pro zlepšení úspěšnosti v metodách asistované reprodukce.

Cílem této práce je popsat specifické vlastnosti, které určují kvalitu oocytů a embryí, a také popsat metody, které se v současné době používají v centrech asistované reprodukce k hodnocení kvality oocytů a embryí. Tato práce se zaměří na molekulární podstatu kvality oocytů a embryí, zejména na popis jednotlivých signálních drah, které by ji mohly ovlivnit.

1 Kvalita oocytů a embryí v metodách asistované reprodukce

1.1 *In vitro* fertilizace

In vitro označuje v překladu z latiny „ve skle“. IVF tedy znamená umělé oplodnění ve zkumavce. Obecně jde o proces, kdy se z vaječnicků odeberou oocyty, které jsou oplodněny spermii mimo tělo v laboratorních podmínkách a výsledné embryo se transferuje přímo do dělohy. IVF jako jeden z prvních použil v 50. letech 20. století vědec M. C. Chang, který tímto způsobem oplodnil králičí oocyty (Chang M C, 1959). V roce 1978 se v Anglii díky IVF narodilo první dítě jako výsledek spolupráce Patricka Steptoe a Roberta Edwardse (Steptoe, Edwards 1978)). Použití IVF se začalo rapidně rozšiřovat a zdokonalovat a našlo řešení i pro ženy, u kterých se objevovaly i jiné indikace k IVF než onemocnění vejcovodů, a to zejména pokročilý věk a endometrióza (Warshaviak et al., 2019).

IVF je nejběžnější a nejpoužívanější technologií asistované reprodukce. Prvním krokem IVF je hormonální stimulace vaječnicků. Původně se do průběhu menstruačního cyklu nezasahovalo a stále se přirozený cyklus v praxi využívá, ale častěji se provádí řízená stimulace vaječnicků kvůli maximalizování počtu získaných oocytů za jeden cyklus. Tento způsob umožňuje vyšší šanci na úspěšnou fertilizaci (J. J. Zhang et al., 2016). V současné době se pro stimulaci vaječnicků používá lidský menopauzální gonadotropin, rekombinantní folikulostimulační hormon nebo rekombinantní luteinizační hormon (Shahrokh Tehraninejad et al., 2017). Podávání exogenních gonadotropinů udržuje hladiny folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) nad kritickou hranicí potřebnou pro stimulaci vývoje mnoha preovulačních (Graafových) folikulů, což umožňuje získat více oocytů v jednom IVF cyklu. Současné působení agonisty nebo antagonisty gonadoliberinu zabraňuje předčasnému zvýšení LH, které může nastat při vývoji více dominantních folikulů (průměr folikulu ≥ 16 mm) (Allegra et al., 2007). Před odebráním oocytů se jejich konečné dozrání a následná ovulace obvykle indukuje vlivem lidského choriogonadotropinu (Gunnala et al., 2017).

Původně se oocyty získávaly laparotomií nebo laparoskopii. Dnes se standartně odběr provádí vaginálně s pomocí ultrazvuku, který navádí aspirační jehlu do folikulů, odkud je nasáta folikulární tekutina obsahující oocyt. Optimální objem folikulů, ze kterých je oocyt získán, by měl být v rozmezí 1-6 ml, což odpovídá průměru 13-23 mm. Podobnou míru oplození však naměřili i u oocytů pocházejících z menších folikulů o objemu 0,3-0,9 ml (8-12 mm v průměru). Dokonce pozorovali větší počet živě narozených dětí po přenosu blastocyst pocházejících z menších folikulů. To naznačuje význam aspirace folikulů o objemu 0,3-0,9 ml (Wirleitner et al., 2018). Tento způsob odběru je využíván u lidských oocytů. Technika, která se ve výzkumu v případě myších zralých ovulovaných oocytů používá, vyžaduje eutanazii myši samice, odstranění vejcovodů a sběr oocytů spolu s kumulárními buňkami, které tvoří tzv. kumulus-oocyt komplexy (COC, z angl. cumulus oocyte complex). Existují však chirurgické techniky, které nevyžadují eutanazii a umožňují odebrat více oocytů od jednotlivé myši samice a zachovat tak její reprodukční schopnost (Byers et al., 2009).

1.2 Kvality oocytů/vývojové kompetence oocytů a raných embryí

Z obecného hlediska je pro vznik nového jedince zásadní jak kvalitní spermie, tak kvalitní oocyt. Nicméně vývojový osud embrya určuje především oocyt (Rana et al., 2023). Dle studie, která hodnotí morfologii oocytu, jeho cytoplasmu, perivitelinního prostoru, zona pellucida, polárního tělíska a velikost oocytu, predikují tyto parametry kvalitu embrya. Oocyty, které dosahovaly vyššího skóre v jednotlivých kategoriích viz. výše, vedou k vyššímu počtu buněk embrya a jeho vyšší kvalitě (Lazzaroni-Tealdi et al., 2015). Vývojová kompetence oocytu, která se charakterizuje jako oocyt, který může dosáhnout zralosti, projít úspěšným oplodněním a vyvinout se do stadia blastocysty (Duranton & Renard, 2001), je v průběhu oogeneze získávána prostřednictvím interakce s folikulárními buňkami obklopující oocyt. Schopnost znovuzahájit meiózu I a projít preimplantačním vývojem je postupně určována během folikulogeneze. Meióza zahrnuje dvě specializovaná buněčná dělení, nazývaných meióza I a II. První meiotické dělení spočívá v separaci mateřské a otcovské kopie každého chromozomu. Tím dojde k redukci genomu z diploidního počtu chromozomů na haploidní počet chromozomů. Až při druhém meiotickém dělení se segregují sesterské chromatidy. Savčí oocyty vstupují do meiózy I v průběhu vývoje plodu a postupují meiotickou fází I, dokud se nezastaví v diplotene fázi profáze I. V tomto stavu můžeme pozorovat germinální váček (GV, z angl. germinal vesicle), proto se tato fáze někdy nazývá GV fáze. V ní oocyty setrvávají až do sexuální zralosti samice (He et al., 2021).

Analýza několika aspektů dle morfologie oocytu pomocí konvenční mikroskopie s fázovým kontrastem přinesla rozdílné poznatky o možnosti stanovení spolehlivých kritérií pro predikci vývojového potenciálu (Revelli et al., 2017). Zavedení nově vyvinuté mikroskopické techniky založené na detekci polarizovaného světla generovaného dvojlomnými buněčnými strukturami nabídlo možnost neinvazivní vizualizace meiotického vřeténka (oocytu v metafázi II), jehož přítomnost je kritická pro oplození a pozdější vývojová stadia (Tomari et al., 2018; W. H. Wang et al., 2001). Ke standardizaci a interpretaci informací dostupných prostřednictvím této techniky jsou však zapotřebí další studie. Přestože invazivní techniky nejsou schopny zachovat životaschopnost buněk, a tudíž poskytnout metodu, pomocí níž by bylo možné vybírat oocyty s vyšší vývojovou kompetencí, mohou přispět k definování objektivních kritérií kvality oocytů. Zejména imunofluorescenční analýza, která je schopna identifikovat kritické anomálie meiotického vřeténka a organizace cytoskeletu, jež mohou odpovídat za kvalitu oocytů, je důležitou metodou pro hodnocení účinnosti systémů zrání *in vitro* (Chen et al., 2018; C. Zhang et al., 2020).

2 Morfologické a buněčné faktory při hodnocení kvality oocytů

Hodnocení kvality oocytů na základě morfologických projevů je převážně subjektivní a mezi jednotlivými pracovišti se liší, což může být považováno za nevýhodu. Doposud nebyl vytvořen jednotný systém klasifikující morfologická kritéria, nicméně jsou k analýze běžně využívána a poskytují důležité informace rozhodující o selekci oocytů. Naopak výhodou je neinvazivní charakter použitých metod, jakými jsou pozorování pod mikroskopem (Hardarson et al., 2012).

2.1 Polární tělísko

Výsledkem asymetrického dělení během první a druhé meiózy je velký oocyt a dvě drobná polární tělíska, která obsahují 23 chromozomů a malé množství cytoplazmatických organel. První polární tělísko je vyloučeno po nástupu vlny luteinizačního hormonu, což je důležitým znakem meiotického zrání oocytu (Cahill et al., 1998). Několik studií ukázalo, že celistvost, tvar nebo velikost polárního tělíska lze použít k posouzení kvality oocytu (Ebner, 2002; Navarro et al., 2009; Y. Yang et al., 2022). Míra oplození a kvalita embryí jsou vyšší, pokud je polární tělísko neporušené, má správný tvar a hladký povrch. Oocyty s neporušeným polárním tělískem vykazují vyšší míru oplození, zatímco oocyty s velkým, nepravidelným nebo fragmentovaným polárním tělískem poskytují horší výsledky (Balaban & Urman, 2006). Na rozdíl od výše uvedených studií Verlinsky a jeho kolegové odhalili, že abnormální morfologie polárního tělíska zahrnující fragmentaci a nepravidelný tvar nekoreluje s mírou oplození, kvalitou embryí, schopností dosáhnout stadia blastocysty, úspěšností přenosu embryí a aneuploidii (Verlinsky et al., 2003). Souběžně s touto studií nebyl zjištěn žádný vztah mezi fragmentací polárního tělíska a následujícími parametry: mírou oplození a rýhování, kvalitou embryí, mírou otěhotnění a implantací (Ciotti et al., 2004). Různorodost studií a jejich závěrů týkajících se morfologie polárního tělíska naznačuje, že se stále jedná o sporné kritérium pro hodnocení kvality oocytů.

2.2 Zona pellucida

Zona pellucida je speciální extracelulární matrix, která obklopuje oocyt. Je vylučována primárním oocytem ve stadiu preantrálního folikulu. Využití polarizační světelné mikroskopie umožňuje neinvazivní způsob vizualizace různých vrstev zona pellucida na základě dvojglomu. Tloušťka vnitřní vrstvy zona pellucida je spojena s lepším vývojem oocytu a kvalitou embrya (Raju et al., 2007). Jiná studie však dospěla k závěru, že tloušťka zona pellucida nemá vliv na vývoj embrya (Świątecka et al., 2014). Tenčí zona pellucida může být navíc spojena s lepší mírou oplození v souvislosti s usnadněním průniku spermií (Bertrand et al., 1995). Další studie se zaměřila na oocyty obklopené tmavou zona pellucida a porovnávala je s oocyty obklopenými normální (světlou) zona pellucida. Tmavá zona pellucida neměla vliv na oplodnění. Naopak procento kvalitních embryí, implantací, a těhotenství se snížilo (Shi et al., 2014).

2.3 Komplex kumulus-oocyt

Je všeobecně známo, že mezi lidským oocytem a kumulárními buňkami (CC, z angl. cumulus cell) existuje obousměrná komunikace, která je nezbytná pro produkci kompetentních oocytů. CC vznikají z granulózových buněk (GC, z angl. granulosa cell), které se během tvorby folikulárního antru diferencují na murální GC a CC. CC jsou biologicky odlišné (např. rozdílná exprese genu *Slc38a3*, kódujícího transmembránový přenašeč neutrálních aminokyselin) od GC a plní specializované úlohy, přenášejí signály uvnitř vaječníku a podporují růst a zrání oocytů v pozdějších fázích folikulárního vývoje (Eppig et al., 2005). Pochopení toho, jak CC ovlivňují vývoj oocytu a chrání ho před systémovými onemocněními, má zásadní význam pro léčbu neplodnosti. Poškození těchto buněk v rámci různých patogenezí má navíc potenciál snižovat šanci na oplození (Kong et al. 2021).

Morfologie COC se nejčastěji klasifikuje dle počtu vrstev kumulárních buněk, jejich kompaktnosti a charakterem ooplasmu. Bovinní COC rozděleny dle následujících skupin: 1) COC s více než třemi kompaktními vrstvami CC a homogenní cytoplasmou; 2) COC s maximálně třemi kompaktními vrstvami CC a homogenní cytoplasmou; 3) COC s více než třemi lehce expandovanými vrstvami CC a lehce granulovanou cytoplasmou, ukázaly rozdíly v embryonálním vývoji. Ačkoliv skupina 3) byla považována za méně kvalitní, vykazovala lepší výsledky než skupina 2), ale podobné skupině 1). Mezi skupinami však nebyly zjištěny rozdíly mezi počtem buněk blastocysty. Tyto výsledky ukazují, že morfologická klasifikace může ovlivnit procento vzniklých blastocyst, nikoliv však jejich kvalitu (De Bem et al., 2014). Naopak jiná studie došla k závěru, že se hodnoty mezi jednotlivými skupinami neliší, co se týče procent boviních oocytů dosahujících stádia blastocysty (Angel-Velez et al., 2023; Ohlweiler et al., 2013). Bovinní embrya vzniklá z oocytů plně obklopené kumulem s několika vrstvami CC dosáhly rychleji stádia 4 buněk a navíc projevily zvýšenou schopnost dosáhnout stádia 8 buněk. Pokud ale embrya překročila toto stádium, nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi oocyty s větším počtem vrstev CC, jednou až dvěma vrstvami CC nebo expanzním kumulem (Emanuelli et al., 2019). Nicméně rýhování blastocyst vzniklých ze skupin COC s více než pěti vrstvami CC bez nebo s mírnou expanzí buněk bylo významně vyšší než u skupin, které měly méně než 5 vrstev CC a žádný nebo mírně expanzní kumulus (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002). Proto by bylo ideální se při výběru COC zaměřit na ty, které mají 5 nebo více vrstev CC, kompaktní nebo mírně rozšířený kumulus a homogenní cytoplasmu (Bilodeau-Goeseels & Panich, 2002; De Bem et al., 2014).

2.4 Meiotické vřeténko

Meiotické vřeténko má zásadní význam pro uspořádání a rozdělení chromozomů během meiózy, a proto je velmi důležité pro studium kvality oocytů. Vizualizace meiotického vřeténka se často provádí pomocí polarizovaného světla. Metoda polarizační světelné mikroskopie dokáže zobrazit meiotická vřeténka díky vlastnosti jejich paralelně uspořádaných mikrotubulů rozdělit světelný paprsek na dva, tzv. dvojlom světla (Tilia et al., 2020; W. H. Wang, 2001). Výsledky této studie ukazují, že u

oocytů, u kterých bylo detekováno dělicí vřeténko pomocí polarizovaného světla, je vyšší míra oplození a vývoje embrya, což naznačuje možnost predikce kvality oocytů (W. H. Wang, 2001).

Dvojlom meiotických vřetének v živých lidských oocytech lze zobrazit pomocí technologie LC PolScope. Tato technologie mikroskopie s polarizovaným světlem je vybavena zařízením z tekutých krystalů pro kontrolu polarizace. V jedné studii byla velikost meiotického vřeténka kvantifikována pomocí PolScope a byla rozdělena do tří skupin podle plochy průřezu meiotického vřeténka (Tomari et al., 2018). Plocha průřezu meiotického vřeténka 90-120 μm^2 předpovídala nejen vyšší míru oplození, ale také vyšší míru tvorby blastocyst. To potvrdilo, že existuje úzký vztah mezi velikostí meiotického vřeténka v lidských oocytech v metafázi II (MII) a vývojovým potenciálem embrya po intracytoplazmatické injekci spermií (ICSI, z angl. intracytoplasmic sperm injection). Studie ukázala, že míra tvorby blastocysty byla podobná u oocytů s velikostí meiotického vřeténka 90-120 μm^2 a >120 μm^2 . Podíl klinických těhotenství ve vztahu k oocytům s velikostí meiotického vřeténka 90-120 μm^2 byl však vyšší než u oocytů s velikostí meiotického vřeténka >120 μm^2 (Tomari et al., 2018). Kvantitativní měření velikosti meiotických vřetének by mohlo mít přínos v určení vývojového potenciálu lidských embryí.

Jiná studie také uvedla, že některé charakteristiky meiotického vřeténka lidských MII oocytů, pozorované pomocí PolScope, jsou spojeny s vyšší mírou oplození a vývojem embrya. Byla zkoumána přítomnost a lokalizace meiotického vřeténka vůči polárnímu tělísku, která zřejmě ovlivňuje míru oplození. Ta byla významně vyšší u *in vivo* ovulované oocytů s vřeténkem v blízkosti prvního polárního tělíska a významně nižší u *in vivo* i *in vitro* zralých oocytů bez viditelného vřeténka (Fang et al., 2007).

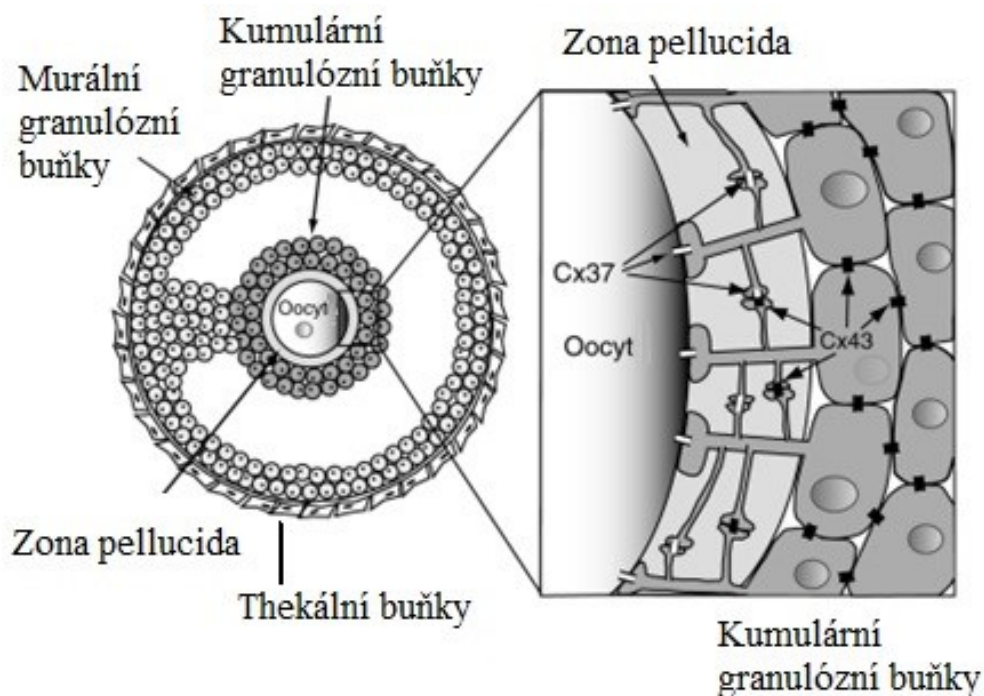
Prokázána byla souvislost mezi morfologií meiotického vřeténka při vizualizaci při ICSI s použitím polarizované světelné mikroskopie a výslednou ploidií blastocysty (Tilia et al., 2020). V této studii jsou morfologická kritéria meiotického vřeténka rozdělena do pěti skupin: 1) soudkovitý tvar s jasně viditelnými hranicemi a rovnoměrným rozložením dvojlomu; 2) dysmorfni s nepravidelným ohraničením a nerovnoměrným rozložením dvojlomu; 3) průsvitné bez patrného tvaru vřeténka; 4) telofazické s viditelně spojeným prvním polárním tělískem s oocytem vlákny vřeténka; 5) a bez přítomnosti dvojlomu v cytoplasmě. První skupina se považovala za normální morfologii, další 4 skupiny za abnormální. U oocytů s normálním meiotickým vřeténkem je významně vyšší pravděpodobnost, že výsledkem bude euploidní blastocysta, než u oocytů s abnormálním vřeténkem. Kromě toho po analýze skupin s abnormální morfologií meiotických vřetének se ukázala i různá pravděpodobnost vzniku euploidní blastocysty. Konkrétně pozorovali, že oocyty s průsvitným nebo neviditelným vřeténkem mají výrazně nižší pravděpodobnost vzniku euploidních blastocyst než oocyty s normálním nebo dysmorfním vřeténkem. Z oocytů s vřeténky v telofázi nevznikala embrya s vysokým implantačním potenciálem; z žádného z nich se nevytvořila euploidní blastocysta. Souhrnně tato zjištění naznačují, že je možné, že některé z těchto podtříd morfologie představují narušenou integritu vřeténka v době ICSI v důsledku buď fyziologického stadia meiózy, nebo buněčné poruchy. Závěrem lze

konstatovat, že hodnocení morfologie meiotického vřeténka pomocí polarizované světelné mikroskopie může pomoci při standardním výběru blastocysty.

2.5 Vliv apoptózy

Je známo, že apoptóza neboli programovaná buněčná smrt hraje roli při ovlivňování procesu zrání oocytů. Apoptotické události v granulózniích buňkách způsobují narušení komunikace mezi GC a oocyty, což omezuje přísun faktorů indukujících zrání (hormonů, proteinů a metabolitů), které jsou nezbytné pro dosažení meiotické kompetence oocytů (Chaube et al., 2014). GC bez přístupu ke všem potřebným metabolitům postupně podstupují autofagii a apoptózu. Byla pozorována zvýšená hladina proteinu LC3-II, biomarkeru autofagie, v GC kultivovaných v mediu bez přítomnosti FSH. Stejně tak byla zvýšená hladina proapoptického faktoru kaspázy 3 (J. Y. Choi et al., 2010).

Mezerové spoje umožňují komunikaci mezi buňkami a nacházejí se mezi intrafolikulárními buňkami, tj. murálními granulózniimi buňkami (MGC, z angl. mural granulosa cell), kumulárními granulózniimi buňkami (CGC, z angl. cumulus granulosa cell) a oocyty (Obr. 1). Konexiny jsou nezbytné při tvorbě mezibuněčných membránových kanálů mezerových spojů. Zejména konexin Cx43 je exprimován v granulózniích buňkách a je spojen s buněčnou smrtí a přežíváním a zráním oocytů u modelových zvířat (Krysko et al., 2004).



Obr. 1 Lokalizace buněk théky, murálních granulózniích buněk a kumulárních granulózniích buněk a jejich spojení s oocytem skrze mezerové spoje (převzato a upraveno z Simon et al., 2006)

Wang a kolektiv zjistili, že úroveň exprese Cx43 má pozitivní korelaci s kvalitou embryí, pokud jde o morfologii a míru otěhotnění. Předpokládali, že nízká exprese Cx43 bude znamenat omezenou dostupnost základních živin, což vytváří metabolický nedostatek v oocytech, který by měl dopad na oocyty v pozdějších vývojových stádiích (H.-X. Wang et al., 2009). Tyto výsledky jsou v rozporu s výsledky vědce Hasegawy a jeho kolegů, podle nichž byla exprese Cx43 nižší ve skupině embryí s dobrou morfologií (počtem blastomer větší než 7 buněk) ve srovnání s ostatními skupinami (Hasegawa et al., 2007). Tento důkaz je podpořen skutečností, že nárůst LH, který má význam pro znovuzahájení meiózy, inhibuje translaci proteinů tvořící mezerové spoje (Kalma et al., 2004). Inhibice exprese proteinů tvořící mezerové spoje pravděpodobně omezuje přenos faktorů zastavujícího meiotické zrání, cAMP a cGMP, z kumulárních buněk do oocytů (Norris et al., 2008). Není zjevné, jestli má snížená či zvýšená exprese Cx43 souvislost s příznivou kvalitou oocytů. Proto se bez dalšího výzkumu Cx43 nemůže používat jako biomarker kvality oocytů.

Kaspázy jsou jedny z dalších proapoptotických faktorů exprimovaných v GC, které by se mohly stát potenciálními biomarkery. Kaspázy řadíme do rodiny proteáz s cysteinovým zbytkem v aktivním místě, které hydrolyticky štěpí peptidovou vazbu za aspartátem. Způsobuje inaktivaci složek pro fyziologické procesy a morfologické změny během apoptózy. Bylo zjištěno, že exprese kaspázy-3 a kaspázy-7 je vyšší zejména u syndromu polycystických vaječníků a má negativní korelaci s kvalitou embrya (Salehi et al., 2017). Je zřejmé, že kaspáza-3 je hlavním faktorem apoptózy díky svému spojení s kondenzací chromatinu, fragmentací DNA, rozpadem jádra a vyklenutím plazmatické membrány, zatímco kaspáza-7 přispívá především k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. reactive oxygen species) a odpojení buněk od extracelulární matrix (Brentnall et al., 2013). *Foxo3* je dalším genem, který je vysoce exprimován během apoptózy a pozitivně koreloval s nízkou kvalitou oocytů u pacientek se syndromem polycystických vaječníků (Mikaeili et al., 2016).

Vědci objevili, že existuje úzký vztah mezi expresí proapoptotických proteinů včetně BAX (z angl. Bcl-2-associated X protein) a kaspázy 3 v kumulárních buňkách a kvalitou embrya (Salehi et al., 2017; M. Y. Yang & Rajamahendran, 2002). Vyšší hladiny messengerové RNA (mRNA) pro BAX a kaspázu 3 byly pozorovány v kumulárních buňkách ovulovaných oocytů, které daly vzniknout embryím s nerovnoměrnými blastomerami, než v buňkách oocytů, které vytvořily embrya s rovnoměrnými blastomerami. Tato studie naznačuje, že lepší vývojový potenciál vykazují oocyty, jejichž kumulární buňky mají nižší míru apoptózy a nižší expresi proteinů souvisejících s apoptózou (jako BAX a kaspáza 3) (Faramarzi et al., 2019). Výsledky z této studie naznačují, že výskyt apoptózy kumulárních buněk se významně zvyšuje u žen starších 40 let ve srovnání s ženami ve věku do 30 let. Zároveň se míra oplození ve věkové skupině nad 40 let výrazně snižuje (Lee et al., 2001). Proto by mohla být míra apoptózy kumulárních buněk využita jako marker kvality oocytů, výsledku IVF a poklesu plodnosti v souvislosti s věkem (Faramarzi et al., 2019; Lee et al., 2001).

2.6 Remodelace extracelulární matrix

Integrita extracelulární matrix COC je klíčová pro účinnou komunikaci mezi oocyty a okolními buňkami během zrání. Dynamické změny hladin gonadotropinů a parakrinních faktorů během tohoto procesu stimulují expresi genů kumulárních buněk zapojených do expanze kumulu. Exprimované proteiny se podílejí na vzniku mezerových spojů a produkci proteáz, které regulují remodelaci tkáně během vývoje ovariálních folikulů. Jedním takovým proteinem je SERPINE2 kumulárních buněk, inhibitor serinových proteáz, který hraje roli při degradaci matrixových proteinů a na ni navazující expanzi kumulu. Studie prokázaly významný rozdíl v hladinách mRNA SERPINE2 mezi nezralými a zralými lidskými oocyty, přičemž ve zralých oocytech je jeho hladina nižší (Li et al., 2015). Podobné výsledky byly zjištěny na myším modelu, kdy nadměrná exprese SERPINE2 v CC zhoršila expanzi kumulu, což vedlo k významnému snížení zrání oocyty (Lu et al., 2013). Dalším zajímavým proteinem se zabýval Wyse a jeho kolegové, kteří zaznamenali vyšší expresi ADAM-metalopeptidázy s trombospondinovými motivy typu 1 (ADAMTS-1) v COC zralých oocytů vykazující kumulární expanzi (Wyse et al., 2020).

3 Molekulární faktory ovlivňující kvalitu oocytů a raných embryí

V následujícím textu se zaměříme na vybrané molekulární faktory, u kterých byla popsána souvislost s kvalitou embryí. Tyto faktory mohou ovlivnit například zrání oocytu, míru oplození a tvorbu blastocyst a dohromady hrají roli ve vývoji oocytů.

3.1 Složení folikulární tekutiny

V pozdějších fázích vývoje sekundárního folikulu se mezi granulózními buňkami hromadí folikulární tekutina (FF, z angl. follicular fluid), která je produkována konkrétně MGC, CC a thekálními buňkami. Nachází se v těsné blízkosti COC a je složena ze směsi látek, jako jsou steroidní hormony, metabolity, polysacharidy, proteiny, ROS a antioxidanty (Ambekar et al., 2013). Složení FF může být ovlivněno různými faktory jako jsou hormonální, parakrinní a autokrinní signální dráhy (Moreno et al., 2015).

Složení FF se liší od složení séra a prochází fyziologickými změnami během folikulárního vývoje, což naznačuje, že může být dostatečné pro zásobování vyvíjejících se oocytů. Byly zaznamenány změny ve folikulárních hladinách ROS/antioxidantů, hormonů a metabolitů v různých fázích folikulárního vývoje (Hennet & Combelles, 2012). ROS jsou nezbytné pro ovulaci u myši (Shkolnik et al., 2011), nicméně nadměrné hladiny ROS mohou způsobit aberace v organizaci mikrotubulů a uspořádání chromozomů meiotickým vřeténkem v metafázi II (MII) myších oocytů (W.-J. Choi et al., 2007).

Koncentrace hormonů ve FF může ovlivňovat diferenciaci oocytů. Vyšší koncentrace estradiolu, testosteronu a progesteronu byla naměřena ve folikulech, ze kterých byly získány oocyty s vyšší mírou oplození (Carpintero et al., 2014; Lamb et al., 2010). Také bylo prokázáno, že zvýšené hladiny antimülleriánského hormonu a progesteronu korelují se schopností oocytu vyvinout se do stadia blastocysty (nezávisle na míře oplození). Blastocysty, které se vyvinuly do 5. dne, pocházely z folikulů s vyššími hladinami obou hormonů (O'Brien et al., 2019). Na koncentraci hormonů může mít vliv řízená stimulace vaječnicků. Ženy podstupující řízenou ovariální stimulaci během IVF měly nižší folikulární hladiny antimülleriánského hormonu, testosteronu, androstendionu, estradiolu a LH, ale vyšší hladinu FSH ve srovnání s ženami podstupujícími IVF v přirozeném cyklu, což naznačuje, že řízená ovariální stimulace významně mění hormonální prostředí FF (von Wolff et al., 2014).

3.2 Vnitřní faktory ovlivňující kvalitu oocytu

3.2.1 Vliv mitochondrií na kvalitu oocytů a raných embryí

Mitochondrie hrají důležitou roli v různých buněčných funkcích, včetně produkce energie, řízení hladiny reaktivních forem kyslíku a regulace buněčné smrti. Primárně jsou zodpovědné za tvorbu adenosintrifosfátu (ATP, z angl. adenosine triphosphate), primárního zdroje energie pro buňky, prostřednictvím procesu známého jako oxidativní fosforylace. Energie produkovaná mitochondriemi má

zásadní význam pro dozrávání oocytů (při sestavování meiotického vřeténka a segregaci chromozomů), oplození a následnou embryogenezi (Rodríguez-Varela et al., 2021). Výzkum naznačil, že vyšší hladina ATP v oocytech a embryích může souviset s lepšími reprodukčními výsledky (Zhao & Li, 2012). Dysfunkce mitochondrií je též spojována se sníženou kvalitou oocytů, což pravděpodobně přispívá k poklesu plodnosti s přibývajícím věkem (Bentov et al., 2011). Základní mechanismy tohoto vztahu nejsou dosud zcela objasněny.

Dysfunkční mitochondrie mají nižší schopnost čelit produkci ROS, což vede k oxidačnímu stresu. Ten vyvolává poškození DNA a iniciuje apoptózu. Studie ukázaly, že zvýšení ROS bylo spojeno se sníženou schopností oplodnění, kvalitou embryí a schopností implantace oocytů (Borowiecka et al., 2012; Jana et al., 2010). Intrafolikulární ROS vede k nedostatečné antioxidační obranyschopnosti v pokročilém věku matky a mění funkci mitochondrií CC během vývoje oocytů prostřednictvím tvorby volných radikálů nebo snížené produkce ATP (Belli et al., 2019; Simsek-Duran et al., 2013). Vzhledem k tomu, že mitochondrie jsou důležité pro zásobování embrya energií, lze kvantifikaci mtDNA použít jako biomarker správného vývoje oocytu.

3.2.2 Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza

Glukóza-6-fosfátdehydrogenáza (G6PDH), součást pentózofosfátového cyklu, je syntetizována v oocytech během oogeneze. Na základě schopnosti G6PDH měnit barvivo BCB (z angl. Brilliant cresyl blue) z modré na bezbarvou bylo barvení BCB použito k měření aktivity G6PDH. Nezralé myši, potkaní a hovězí oocyty vykazovaly vysokou úroveň aktivity G6PDH, která se po dozrání výrazně snížila (Calanni-Pileri et al., 2022; Ferrandi et al., 1993). Aktivita G6PDH se snížila také během zrání a oplození prasečích oocytů (Manjunatha et al., 2007). V poslední době stále více studií odhaluje, že nízká aktivita G6PDH ve zralých bovinních oocytech, jak byla zjištěna pomocí BCB testu, je spojena s vysokou mírou oplození a tvorby blastocyst (Silva et al., 2013). Důležité je, že nebyly pozorovány škodlivé účinky barvení BCB před zráním *in vitro* na vývoj blastocysty. Proto může být detekce aktivity G6PDH na základě barvení BCB dobrým praktickým prediktorem kvality oocytů.

3.3 Metabolismus steroidů

Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že steroidogeneze přímo ovlivňuje meiózu oocytů a přispívá ke spontánnímu zrání savčích oocytů (Jamnongjit & Hammes, 2005). Ačkoli jejich přesné regulační mechanismy jsou stále poměrně nejasné, bylo zjištěno, že steroidy vylučované buňkami théky a GC v reakci na růstové faktory působí jako sekundární poslové v drahách, které vedou k expanzi kumulů, a tím i ke zrání oocytů. Mimořádně zajímavé jsou studie, které zkoumají metabolomiku kumulárních buněk a odhalily mRNA pappalysinu-1 (PAPPA) jako potenciální prediktor stavu zrání oocytů a do jisté míry i stavu euploidie embryí a výsledků těhotenství při IVF. PAPPA je zodpovědný za expresi metaloproteináz, které aktivně štěpí protein IGFBP4 (z angl. insulin-like growth factor binding protein 4) a zajišťují tak přísun intrafolikulárních peptidů IGF (z angl. insulin-like growth

factor), které následně stimulují steroidogenezi. Kordus a jeho kolegové zaznamenali vyšší hladiny exprese PAPPa v kumulárních buňkách zralých oocytů, které se nakonec vyvinuly v euploidní embrya, ve srovnání se skupinou nezralých oocytů, které vyústily v embrya s pozastaveným vývojem. Závěry studie rovněž naznačily souhru mezi expresí PAPPa a dalšími mRNA souvisejícími se zráním oocytů, jako je amfiregulin a LHCGR (receptor pro luteinizační hormon/choriogonadotropin), což je naděje pro konstrukci ideálního prediktivního modelu, který by mohl měřit prognózu IVF (Kordus et al., 2019).

4 Signální dráhy ovlivňující kvalitu oocyty a embrya

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují maturaci oocytů a embryí, jejich správný vývoj, fertilizaci a následný průběh těhotenství. Proces maturace oocytů a embryí je komplexní a zahrnuje účast různých signálních drah. Porozumění zapojení těchto drah a jejich funkce by mohlo přispět k identifikaci příčin potenciálních chyb a sloužit jako ukazatele kvality oocytů a embryí. Z důvodu nestability dělicího vřeténka v lidských oocytech se tato bakalářská práce věnuje také dělicímu vřeténku, jeho vzniku a následné segregaci chromozomů. Pochopení příčin nestability vřeténka by mohlo vést k identifikaci nových terapeutických cílů a strategií pro zlepšení reprodukčního zdraví žen (So et al., 2022).

Oocyty nacházející se ve vaječníku jsou zastaveny v profázi I v důsledku nízké aktivity faktorů podporujících zrání (MPF, z angl. maturation promoting factors), které se skládají ze dvou proteinů tvořící komplex, a to cyklin-dependentní kinázy 1 (CDK1, z angl. cyclin-dependent kinase) a cyklinu B1. Fyziologicky je nízká aktivita MPF indukována přítomností cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP, z angl. cyclic adenosine monophosphate) produkovaného intrafolikulárními somatickými buňkami nebo samotnými oocyty (Edry et al., 2006) a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP, z angl. cyclic guanosine monophosphate) produkovaného folikulárními somatickými buňkami (Norris et al., 2009). Obě tyto molekuly jsou transportovány do oocytu přes mezerové spoje, které umožňují komunikaci mezi granulózními buňkami a oocytem i mezi samotnými granulózními buňkami. LH potlačuje inhibiční signální molekuly tím, že omezuje expresi proteinu Cx43, který je nezbytným proteinem pro výstavbu mezerových spojů (Kalma et al., 2004a). Po snížení exprese proteinu Cx43, který mění komunikaci mezi intrafolikulárními somatickými buňkami, se sníží hladiny cAMP a cGMP uvnitř oocytů; tím indukuje pokračování meiózy v profázi I až do zástavy metafáze II (Norris et al., 2008).

4.1 Udržení oocytu v diktyotenním stadiu profáze I

Jak již bylo zmíněno výše, cAMP a cGMP jsou dvě zásadní molekuly, které regulují maturaci oocytů (Vaccari et al., 2009). Zvýšená hladina cAMP uvnitř oocytu aktivuje proteinkinázu A (PKA), která udržuje oocyt v profázi I ovlivněním několika proteinů. PKA fosforyluje kinázy WEE1/MYT1, které svojí inhibiční fosforylací na Thr14 a Tyr15 inaktivují CDK1. Studie s mutantními CDK1, které nebylo možné inhibovat fosforylací, způsobovali v myších oocytech znovuzahájení meiózy I. Jelikož tyto oocyty byly meioticky nekompetentní, přerušení zástavy profáze I způsobovalo jejich předčasnou ztrátu. Neustálé potlačování aktivity CDK1 je tedy nezbytné pro udržení oocytu v profázi I (Adhikari et al., 2016). PKA také fosforyluje přímo inaktivuje fosfatázu CDC25B, která tak nemůže defosforylovat CDK1 a tím ji aktivovat. Mimo jiné fosforylace CDC25B způsobí konformační změnu CDC25, která umožňuje vazbu s proteinem 14-3-3 β , čímž je lokalizována mimo buněčné jádro a MPF komplex (Pirino et al., 2009).

Důležitou molekulou, která zachovává vysokou hladinu cAMP, je cGMP. Ta je produkována receptorem s guanylátcyklázovou aktivitou NPR2 (z angl. natriuretic peptide receptor 2) v CGCs, který je aktivovaný prekurzorem NPPC (z angl. natriuretic peptide precursor C) produkovaný MGCs (M. Zhang et al., 2010). Vzniklý cGMP tedy prochází z CGCs skrze mezerové spoje do oocyty, zde inhibuje aktivitu fosfodiesterázy 3A (PDE3A), která tak nehydrolyzuje cAMP. Tato inhibice udržuje vysokou koncentraci cAMP, aktivní PKA a zástavu oocyty v profázi I (Norris et al., 2009). Tento model je podpořen studií, která zkoumala NPR2 mutantní myši. Ukázalo se, že NPR2 mutantní myši jsou neplodné v důsledku předčasné obnovy meiózy způsobené nedostatečnou produkcí cGMP v CGC, což vede k fragmentaci oocytů a špatnému vývoji embryí (Geister et al., 2013).

4.2 Znovuzahájení meiózy I

Klíčovým krokem při znovuzahájení meiózy je nárůst luteinizačního hormonu v ovariálním folikulu. LH se váže na receptor luteinizačního hormonu, který je přítomný na thekálních buňkách a vnějších MGCs folikulu (Baena et al., 2020). Aktivovaný receptor luteinizačního hormonu snižuje hladinu cGMP prostřednictvím defosforylace a inaktivace NPR2 a uzavřením mezerových spojů. Rychlá defosforylace NPR2 je také doprovázena rychlou fosforylací cGMP fosfodiesterázy PDE5, což pravděpodobně zvyšuje její hydrolytickou aktivitu (Egbert et al., 2014; Shuhaibar et al., 2016). Redukce cGMP ve folikulu způsobuje jeho difuzi z oocyty, tím se zmírní inhibice PDE3A v oocyty a sníží hladina cAMP (Norris et al., 2009). Signalizace LH navíc zvyšuje aktivitu EGF receptoru (EGFR, z angl. epidermal growth factor receptor), který dosud neznámým způsobem přispívá k poklesu cGMP, a je nezbytná pro rychlé obnovení meiózy v reakci na LH (Norris et al., 2010). Peptidy podobné epidermálnímu růstovému faktoru (EGF, z angl. epidermal growth factors), jako jsou amfiregulin a epiregulin, potlačují *Nppc* mRNA hladiny ve folikulech (Liu et al., 2014). Dále LH zprostředkovaná signalizace receptoru EGFR zvyšuje intracelulární koncentraci vápníku v CGC a snižuje interakci NPPC/NPR2, což vede ke snížení aktivity NPR2 a produkce cGMP (Hao et al., 2016). V oocyty snížená hladina cAMP aktivuje MPF, který následně fosforyluje některé proteiny, iniciuje rozpad zárodečného váčku (GVBD, z angl. germinal vesicle breakdown) a segregaci chromozomů. Konkrétně aktivní MPF fosforyluje kontrolní bod sestavení dělicího vřetenka (SAC, z angl. spindle assembly checkpoint), anafázi podporující komplex/cyklozom (APC/C, z angl. anaphase-promoting complex/cyclosome) a další proteiny, které přispívají k maturaci oocyty, tedy GVBD, chromozomální kondenzaci a segregaci chromozomů (He et al., 2021).

Dalším konzervovaným regulátorem buněčného cyklu, který podporuje obnovení meiotického cyklu, je kináza PLK1 (z angl. polo-like kinase). Aktivní PLK1 je detekována v centrech organizující mikrotubuly (MTOC, z angl. microtubule organizing center) během zrání oocytů (Solc et al., 2015). Zatímco myši oocyty s nedostatkem PLK1 nevykazují žádné defekty v načasování GVBD, *Plkl* cKO (podmíněné vyřazení genu, z angl. conditional knockout) oocyty nejsou schopné vydělit první polární tělísko. Tyto oocyty vykazují abnormální kompaktnost chromozomů, nevytvářejí normální bipolární

vřeténka metafáze I a vykazují defekty při tvorbě MTOC (Little & Jordan, 2020). PLK1 je tedy nezbytný spíše pro dokončení zrání oocytů než pro jeho zahájení. Bylo také prokázáno, že PLK1 aktivuje APC/C degradací inhibitoru EMI1, a tím reguluje vstup do anafáze I (Solc et al., 2015).

4.3 Segregace chromozomů

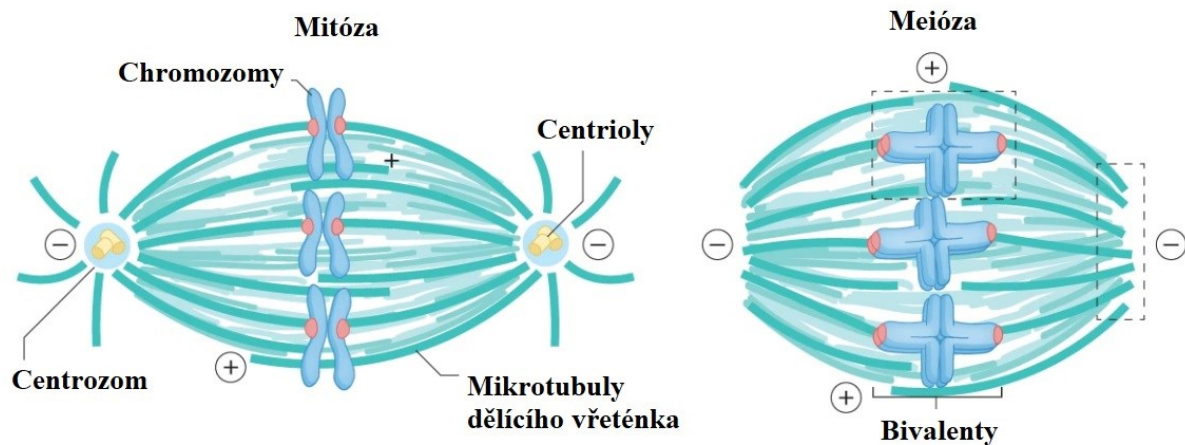
Pohlavně se rozmnožující organismy produkují gamety s polovičním počtem somatických chromozomů, aby se zachovala velikost genomu v každé generaci. Toho je dosaženo v meióze procesem tzv. chromozomové segregace. Aby tato segregace proběhla správně, musí se homologní chromozomy nejprve spárovat a poté fyzicky spojit tak, aby se společně orientovaly na meiotickém vřeténku. Meióza u žen je obzvláště náchylná k chybám, které ovlivňují lidské zdraví: odhaduje se, že přibližně 20 % lidských oocytů je chromozomálně abnormálních (Kuliev et al., 2011) a naprostá většina těchto vad vzniká v důsledku problémů s oocyty (Rana et al., 2023). U lidských oocytů se často objevují dělicí vřeténka s nestabilními póly, což zvyšuje pravděpodobnost chyb v segregaci chromozomů (Holubcová et al., 2015). Aneuploidní oocyty se také mohou vyskytnout při narušení regulace meiózy Aurora kinázami, které regulují segregaci chromozomů. Byly identifikovány genetické varianty u těchto kináz, které měly vliv na aneuploidii oocytů u pacientek v různých věkových kategoriích. Mutantní AURKB p.L39P (záměna leucinu za prolin na pozici 39) vyskytující se u starší pacientky (> 35 let), u které byla míra aneuploidních embryí nižší než 50 %, zvyšovala pravděpodobnost správného zarovnání chromozomů v ekvatoriální rovině. Zjistilo se, že mnohem méně myších oocytů exprimující lidskou AURKB p.L39P mělo chybně zarovnané chromozomy v ekvatoriální rovině, než oocyty exprimující lidskou AURKB bez mutace. Další variantou je AURKC p.I79V (záměna isoleucinu za valin na pozici 79), vyskytující se u mladší pacientky (< 35 let), jejíž mutace vykazovala normální lokalizaci i kinázovou aktivitu AURKC. Tato varianta neměla na meiózu škodlivý vliv. (Nguyen et al., 2017).

4.4 Signální dráhy regulující výstavbu dělicího vřeténka

Správně sestavené dělicí vřeténko zajišťuje přesnou segregaci chromozomů, aby se zabránilo aneuploidii embrya. Správná tvorba vřeténka zahrnuje nukleaci mikrotubulů vřeténka, bipolární uspořádání vřeténka a seřazení chromozomů do ekvatoriální roviny, což umožňuje jejich přesnou segregaci. Podobně jako mitotické vřeténko je i meiotické vřeténko bipolární; vřeténka se však liší v procesu organizace mikrotubulů. V somatických buňkách je bipolarita vřeténka určena přítomností dvou centrozomů. Segregace chromozomů v savčích oocytech je řízena dělicím vřeténkem bez centrozomů. Sestavení bipolárního mikrotubulárního vřeténka je závislé na acentriolárních organizačních centrech mikrotubulů (aMTOC, z angl. acentriolar microtubule organizing center) (Obr. 2). Ukázalo se, že u lidských oocytů je pro nukleaci mikrotubulů nezbytný gradient RanGTP lokalizovaný v blízkosti chromozomů (Holubcová et al. 2015). Během samičí meiózy u většiny živočišných druhů segregaci chromozomů předchází dřívější krok eliminace centrozomů. Elektronová mikroskopie ukazuje, že meiotická vřeténka oocytů postrádají centrozomy obsahující centrioly u *Drosophily*, *Caenorhabditis*

elegans, *Xenopa*, hlodavců a člověka (Bennabi et al., 2016). Naproti tomu samčí gamety si obvykle centrozomy zachovávají, což umožňuje obnovení správného počtu centrozomů po oplození. Meiotická vřeténka oocytů jsou tedy sestavována způsobem nezávislým na centrozomech. Molekulární detaily procesu eliminace centrozomů jsou stále nejasné. Začínají být však objasňovány mechanismy, které regulují výstavbu acentrozomálních vřetének v oocytech a segregaci homologních chromozomů (během meiózy I) a sesterských chromatid (během meiózy II) na těchto vřeténkách.

Předčasnou segregaci chromozomů blokují proteiny kontrolního bodu sestavení vřeténka (SAC, z angl. spindle assembly checkpoint). Mechanismus kontrolního bodu sestavení vřeténka byl považován za specifický pro mitózu; později však byla potvrzena jeho funkce při prevenci nástupu anafáze během meiózy. V myších oocytech byla potvrzena přítomnost několika proteinů SAC (MAD1, MAD2, BUB1, BUBR1, BUB3 a MPS1) (Hached et al., 2011; Homer et al., 2005; Touati et al., 2015). Udržování přesnosti zarovnání chromozomů v ekvatoriální rovině během meiotických dělení hraje tedy významnou roli v prevenci aneuploidie (Baker et al., 2004).



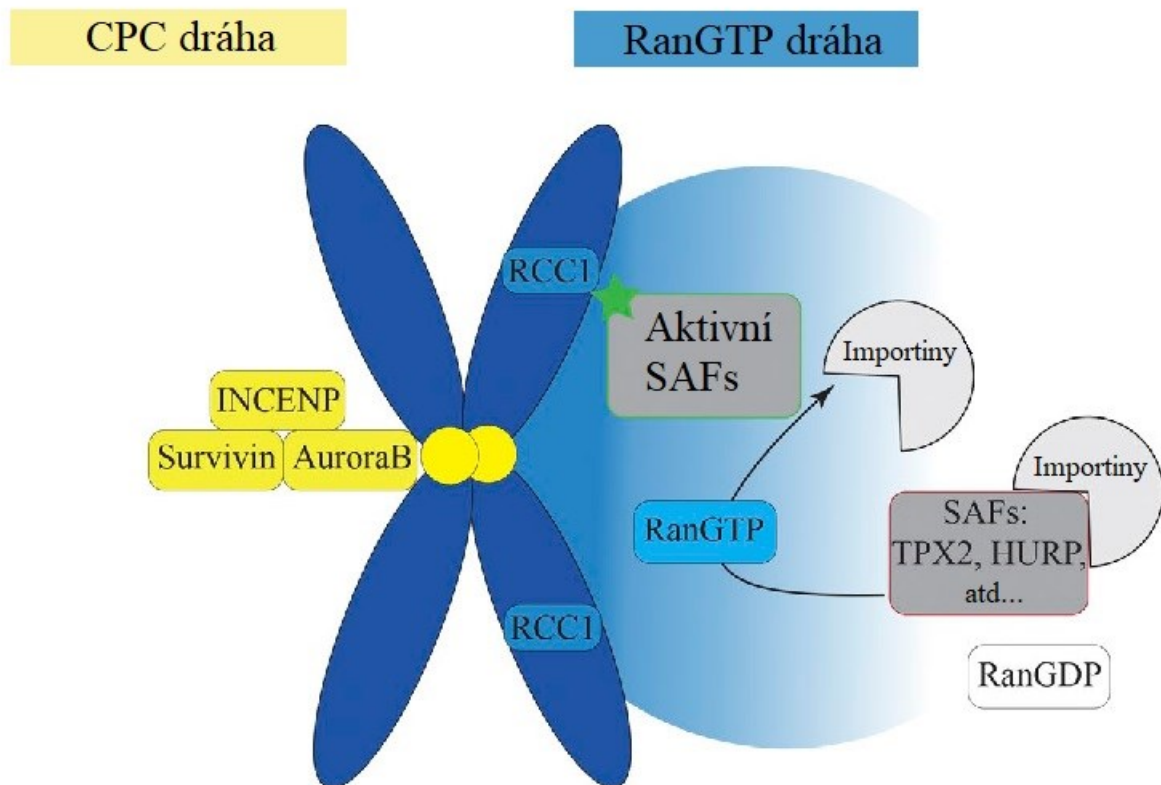
Obr. 2 Rozdíl mezi mitotickým dělicím vřeténkem, které obsahuje centrozomy, a meiotickým vřeténkem bez centrozomů (převzato a upraveno z Charalambous et al., 2023)

4.4.1 RanGTP dráha

První molekulární aktivitou, která se podílí na tvorbě mikrotubulů kolem meiotického chromatinu, je GTPáza Ran (z angl. Ras-related nuclear protein), jejíž aktivní stav vázaný na GTP (z angl. guanosine triphosphate) je indukován proteinem RCC1 (z angl. regulator of chromosome condensation 1) lokalizovaným v blízkosti chromatinu. RCC1 je faktor pro výměnu nukleotidu guaninu. Vysoká koncentrace RanGTP v jádře reguluje směr transportu. Přímá pozorování pomocí biosenzoru založeného na metodě fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET, z angl. fluorescence resonance energy transfer) v myších oocytech prokázala přítomnost podobné kompartmentalizace RanGTP, která tvoří gradient aktivního Ran s centrem na chromozomech po rozpadu jaderného obalu (NEBD, z angl. nuclear envelope breakdown)(Dumont et al., 2007). Gradient RanGTP obklopující

chromozomy aktivuje lokální faktory sestavení vřeténka (SAF, z angl. spindle assambly factors) zodpovědné za polymerizaci mikrotubulů (Clarke & Zhang, 2008). Zablokování jeho funkce má za následek nestabilitu vřeténka a nesprávné spojení kinetochoru s mikrotubuly, po kterém následují defekty segregace chromozomů (Holubcová et al., 2015). Kinetochor je specializovaný komplex proteinů v oblasti centromer, který má za úkol vázat mikrotubuly dělicího vřeténka s chromozomy. SAF, mezi které patří TPX2 a NuMa (z angl. nuclear mitotic apparatus), se podílejí na nukleaci mikrotubulů, jejich interakci a stabilizaci. Aktivita SAF je regulována vazbou importinů na jejich jaderné lokalizační sekvence. Předpokládá se, že vysoká koncentrace RanGTP v okolí chromatinu způsobuje lokální uvolnění SAF z importinů a aktivaci SAF k nukleaci mikrotubulů a řízení jejich organizace (Obr. 3Obr. 2) (Brunet et al., 2008).

4.4.2 CPC dráha



Obr. 3 Signální dráhy regulující výstavbu dělicího vřeténka. RanGTP dráha a CPC dráha se podílejí na sestavení meiotického vřeténka s absencí centriol. Tyto dráhy nezávislé na centrozomech tvoří příznivé prostředí pro sestavení mikrotubulů (převzato a upraveno z Bennabi et al., 2016)

Druhou alternativní dráhou, která zajišťuje acentrozomální sestavení vřeténka, je dráha závislá na CPC (z angl. chromosomal passenger complex). Skládá se z Aurora kinázy B (u obratlovců existuje specifická Aurora kináza C, která nahrazuje Aurora kinázu B), vnitřního centromerového proteinu (INCENP), proteinů Survivin a Borealin, které se zaměřují na chromatin. Během mitózy, brzy po rozpadu jaderného obalu, je CPC lokalizován na chromatinu; následně je jeho lokalizace omezena na

okolí vnitřní centromery chromozomů až do začátku anafáze, kdy se koncentruje na mikrotubuly vřeténka. Zatímco CPC se u většiny druhů během metafáze meiózy lokalizuje také v centromerických oblastech chromozomů, byla popsána druhově specifická lokalizace. V myších oocytech zůstává Aurora B/C lokalizována na ramenech chromozomů a centromerách až do začátku anafáze. Její inhibice vede k signifikantnímu narušení tvorby vřeténka (K.-T. Yang et al., 2010). Také bylo pozorováno, že výsledkem deplece INCENP v myších oocytech je chybné uspořádání chromozomů, což naznačuje důležitost CPC při chromozomové segregaci (Sharif et al., 2010).

4.4.3 Sestavení dělicího vřeténka

Mechanismus, kterým aMTOC zprostředkovávají sestavení vřeténka, je nejlépe znám u myší. Jejich oocyty sestavují bipolární vřeténko fragmentací několika acentriolárních MTOC na vysoký počet malých aMTOC, aby je pak mohly přeskupit do dvou pólů vřeténka. Účast aMTOCs na sestavování meiotického vřeténka byla naznačena v prvních imunofluorescenčních studiích myších oocytů (Van Blerkom, 1991) a později byla potvrzena mikroskopii živých buněk (Schuh & Ellenberg, 2007). Po znovuzahájení meiózy začnou četné aMTOCs vytvářet jádra mikrotubulů v celé cytoplazmě a na jaderném obalu. Poté se sbíhají k jádru oocytu, kde aktivují nukleaci mikrotubulů, které polymerují podobnou rychlostí jako mitotické mikrotubuly. Na jaderném obalu jsou aMTOC vystaveny rozsáhlým silám zapříčiňující jejich roztahování a určitému stupni fragmentace působením mikrotubulů a dyneinu, který je směřován na minus konec. Depolymerizace mikrotubulů, zablokování aktivity dyneinu nebo odpojení dyneinu od jaderného obalu odstraněním jeho adaptéru BicD2 zabraňuje protahování aMTOC. Po NEBD se aMTOC dále fragmentují a redistribuují na mnoho menších aMTOC, tentokrát řízených mikrotubulárními motory KIF11 (z angl. kinesin family member 11) (Clift & Schuh, 2015). Krátce po NEBD se v závislosti na Ran prudce zvýší nukleární aktivita fragmentovaných aMTOC, čímž vznikne mikrotubulární klubko, na které se kruhově distribuují chromozomy. Pomocí antiparalelního KIF11 jsou pak aMTOC vypuzeny na povrch mikrotubulárního klubka. Postupné shlukování více pólů aMTOC do dvou dominantních pólů pak přemění tento multipolární meziproduct na bipolární strukturu. Na třídění aMTOC do pólů vřeténka se podílí protein HURP (z angl. hepatoma upregulated protein) asociovaný s mikrotubuly, který stabilizuje mikrotubuly v blízkosti chromozomů. Jeho deplece v myších oocytech snižuje hustotu mikrotubulů během sestavování vřeténka a vede k selhání třídění aMTOC a bipolarizaci vřeténka (Breuer et al., 2010). Podobně jako v mitóze stabilizuje NuMa acentriolární póly vřeténka ukotvením minusových konců mikrotubulů v myších oocytech (Kolano et al., 2012). Defekty v sestavení vřeténka (asymetrické a monopolární vřeténko), které jsou následkem nedostatečné fragmentace MTOC, vedou k opožděné tvorbě bipolárního vřeténka a zarovnání chromozomů do ekvatoriální roviny, což může vést k aneuploidii oocytů (Clift & Schuh, 2015).

Bylo zpozorováno, že biorientace chromozomů se objevila v průběhu elongace vřeténka, tedy až po její iniciaci. To poukazuje na vliv aMTOCs, která prostřednictvím postupných kroků sebeorganizace a následného prodlužování vřeténka určuje biorientaci chromozomů. Nakonec vzniká

stabilní soudkovité acentrozomální metafázové vřetenko s oscilujícími chromozomy a astrálními mikrotubuly, které překvapivě vykazuje klíčové vlastnosti centrozomálního vřetenka (Schuh, Ellenberg 2007).

Příčinou nestability lidských vřetenek je pravděpodobně nedostatek molekulárního motoru KIFC1 (z angl. kinesin superfamily protein C1), který stabilizuje póly vřetenka v jiných savčích oocytech a v nádorových buňkách. Dále také zabraňuje fragmentaci vřetenka. Podél paralelních mikrotubulů vytváří příčné vazby na pólech. Pokud vřetenko postrádá aMTOC, KIFC1 zajišťuje seskupení mikrotubulárních minus konců do dvou pólů vřetenka. Pokud se do lidských oocytů postrádajících KIFC1 dodá definované množství tohoto proteinu, může být riziko aneuploidie sníženo (So et al., 2022).

4.4.4 Role Aurora kináz

Aurora kinázy (AURK) tvoří evolučně konzervovanou rodinu serin/treoninových kináz, které se podílejí na mitóze a meióze. Savčí genom kóduje tři izoformy Aurora kináza A, B a C (AURKA, AURKB a AURKC). Zatímco většina mitotických buněk exprimuje první dvě izoformy AURK, savčí zárodečné buňky exprimují také třetí zmíněnou izoformu. Ačkoli je o funkcích těchto kináz v mitóze známo mnoho, méně se ví o tom, jak tyto tři izoformy fungují při koordinaci meiózy. Tyto kinázy fungují jako molekulární spínače a regulují řadu procesů při dělení buněk mitózou, mimo jiné organizaci vřetenka, uspořádání chromozomů, kontrolní bod sestavení vřetenka a cytokinezi. AURKA je exprimována v mitotických a meiotických buňkách a lokalizuje se na pólech vřetenka, kde reguluje jeho mechaniku. AURKB je rovněž exprimována v mitóze a meióze s dynamickou lokalizací proteinu: nejprve se lokalizuje na centromerách chromozomů v metafázi, kde reguluje jejich uspořádání a připojení kinetochoru k mikrotubulům (Shuda et al., 2009), a poté v anafázi se lokalizuje do středu vřetenka, kde pomáhá při cytokinezi. Exprese AURKC je primárně omezena na zárodečné buňky a má větší sekvenční podobnost s AURKB než s AURKA. U oocytů je AURKC lokalizovaná na aMTOCs i na chromozomech v metafázi (Schindler et al., 2012) a v centru vřetenka v anafázi. V myších oocytech zastupuje AURKC funkci CPC (Balboula & Schindler, 2014).

AURKA se v průběhu meiózy nachází na aMTOC a je nutná pro zapojení γ -tubulinu, klíčové součásti MTOC. Inaktivace AURKA v myších oocytech vede ke ztrátě lokalizace γ -tubulinu a pericentrinu, což vede k rozpadu MTOC (Swain et al., 2008). Při depleci nebo inhibici AURKA v myších oocytech nebude meióza dokončena, což je fenotyp podobný *Plk1* cKO u myší (Little & Jordan, 2020). *Aurka* KO (knock-out; delece *Aurka*) v myších oocytech narušuje tvorbu prvního meiotického vřetenka, což vede k zastavení vývoje v meióze I a pravděpodobně může přispívat k neplodnosti žen (Blengini et al., 2021). AURKA je tedy klíčová pro plodnost myších samic a meiotické zrání oocytů.

AURKC lokalizovaná v aMTOC během meiózy I je nezbytná pro shlukování aMTOC. Tato lokalizace je specifická a lze ji pozorovat i v případě, že jsou mikrotubuly depolymerizovány nebo jsou syntetizovány nové aMTOC. Aktivita Haspin kinázy je nezbytná pro lokalizaci AURKC v aMTOC. Ukázalo se, že s inhibicí Haspin se sníží AURKC lokalizovaných na chromozomech i na aMTOC, které se neshlukují. Kromě toho se exogenní Haspin (značený zeleným fluorescenčním proteinem) také lokalizuje na pólech vřeténka, což naznačuje, že Haspin reguluje lokalizaci AURKC na MTOC během meiózy I. Zvýšení exprese AURKC (ale ne AURKB nebo AURKA) částečně zachránilo defekt shlukování aMTOC, což naznačuje význam AURKC v meióze I (Balboula et al., 2016).

4.5 Kontrolní bod sestavení vřeténka

Další z mechanismů, které buňky vyvinuly pro zabránění nesprávné segregaci chromozomů, je mechanismus nazývaný kontrolní bod sestavení vřeténka (SAC). Proteiny SAC dokáží detekovat nepřipojené mikrotubuly ke kinetochorům nebo ztrátu jejich napětí a pozastavit buněčný cyklus v metafázi, dokud nejsou všechny kinetochory připojeny k mikrotubulům vřeténka a chromozomy se nezarovnají do ekvatoriální roviny (Sun & Kim, 2012). Poté je SAC inhibován a aktivován APC/C, což umožňuje pokračovat v buněčném dělení, zahájit segregaci chromozomů a anafázi.

Efektorem SAC je komplex mitotického kontrolního bodu (MCC, z angl. mitotic checkpoint complex), který zahrnuje MAD2, BUB3, BUBR1 a APC aktivátor CDC20. SAC je nejdříve aktivován kinázou MPS1, která indukuje spojení komponentů MCC. MAD2, který se váže s MAD1 na kinetochoru chromozomu, monitoruje spojení mezi mikrotubuly a kinetochorem. Konformační změny MAD2 vyvolané interakcí s MAD1 podporují tvorbu MCC, který přímo inhibuje APC/C a progresi meiotického zrání. (Hara et al., 2015). APC/C je E3 ubikvitin ligáza, velký proteinový komplex složený z 11-13 podjednotek. Katalyzuje přidání několika ubikvitinů na několik cílových proteinů, jako je cyklin B1 a securin, aby došlo k jejich rozpoznání a degradaci proteazomem. Po správném připojení kinetochor k meiotickému vřeténku se MCC oddělí od APC/C (Eytan et al., 2014). Aktivace APC/C^{Cde20} vede k polyubikvilaci a degradaci cyklinu B1 a securinu, inhibitoru proteázy separázy. Degradace těchto substrátů aktivuje separázu, která odstraňuje kohezín z homologních chromozomů (v meióze I) nebo sesterských chromatid (v meióze II), což umožňuje oddělení chromozomů (Kudo et al., 2006).

Nedávná studie myších oocytů potvrdila souvislost proteinu KNL1 (z angl. kinetochore scaffold 1), který je součástí vnějšího kinetochoru, se SAC mechanismem. U *Kn11* KO oocytů nebyl zjištěn signál proteinů BUB3, BUBR1 ani MAD1. Tyto oocyty urychlily meiotický vývoj a předčasně zahájily anafázi I. Dále *Kn11* KO oocyty vykazovaly vyšší procento chybně uspořádaných chromozomů, zřejmě v důsledku nesprávného připojení kinetochorů k mikrotubulům. Výskyt aneuploidních oocytů v MII byl třikrát větší než u kontrolních oocytů. Tato pozorování naznačují, že KNL1 udržuje aktivitu SAC proteinů, které zajišťují včasný vstup do anafáze, přesnou segregaci chromozomů a produkci euploidních oocytů (Yue et al., 2022).

Závěr

Kvalita oocytů a embryí je klíčovým faktorem pro úspěšnou fertilizaci a vývoj plodu v rámci in vitro fertilizace. Oocyt, který má specifické vlastnosti a kvalitu, je nezbytný pro správný průběh těhotenství a vývoj zdravého embrya. Problematika neplodnosti je v současné době významným problémem pro mnoho párů po celém světě, a proto metody asistované reprodukce, jako je IVF, představují jednu z možností léčby. Při této léčebné metodě dochází k umělému oplodnění oocytů a transferu výsledných embryí do dělohy.

Hodnocení kvality oocytů je založeno na různých morfologických kritériích, jako je stav polárního tělíska, zona pellucida a COC. Morfologické hodnocení je však často subjektivní a mezi pracovišti se může lišit. Například polární tělísko s neporušenou strukturou dosahuje lepších výsledků fertilizace a vývoje embrya, zatímco fragmentace polárního tělíska může signalizovat horší kvalitu oocytů. Zona pellucida a COC také poskytují důležité informace o kvalitě oocytů a vývojovém potenciálu embrya. Dalším důležitým faktorem hodnocení oocytů je morfologie meiotického vřeténka. Jeho vizualizace pomocí polarizovaného světla může poskytnout informace o vývojové kompetenci oocytů a předpovědět úspěšnost fertilizace a vývoje embrya.

Segregace chromozomů je klíčovým procesem v meióze, který zajišťuje správné rozdělení genetického materiálu do gamet. Správné sestavení dělicího vřeténka je nezbytné pro segregaci a zahrnuje několik molekulárních drah, včetně RanGTP dráhy a CPC dráhy. Acentrozomální oocyty, které postrádají centrioly, sestavují vřeténka pomocí aMTOC, která nahrazují funkci centrozomů. Proces sestavování vřeténka je důkladně regulován a zahrnuje aktivaci a fragmentaci aMTOC. Kontrolní bod sestavení vřeténka zajišťuje optimální spojení mikrotubulů dělicího vřeténka s kinetochory, proto je také klíčové pro správnou segregaci chromozomů a prevenci chromozomálních vad.

V budoucnosti by měly být prováděny další studie a výzkumy, které se zaměří na objektivizaci hodnocení kvality oocytů a embryí, stejně jako na studium výstavby meiotického vřeténka a segregace chromozomů v oocytech. Cílem je vytvořit standardizovaná kritéria a metody hodnocení, které budou poskytovat spolehlivé informace pro léčbu neplodnosti pomocí IVF a zlepšení reprodukčních výsledků. Důkladné pochopení molekulárních mechanismů a regulace těchto procesů může vést k vývoji nových terapeutických strategií a prevenci genetických vad u lidí, což přispěje k lepšímu porozumění reprodukční biologii a genetickým onemocněním.

Použitá literatura

** Sekundární zdroje

- Adhikari, D., Busayavalasa, K., Zhang, J., Hu, M., Risal, S., Bayazit, M. B., Singh, M., Diril, M. K., Kaldis, P., & Liu, K. (2016). Inhibitory phosphorylation of Cdk1 mediates prolonged prophase I arrest in female germ cells and is essential for female reproductive lifespan. *Cell Research*, 26(11), 1212–1225. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.119>
- Allegra, A., Marino, A., Coffaro, F., Scaglione, P., Sammartano, F., Rizza, G., & Volpes, A. (2007). GnRH antagonist-induced inhibition of the premature LH surge increases pregnancy rates in IUI-stimulated cycles. A prospective randomized trial. *Human Reproduction*, 22(1), 101–108. <https://doi.org/10.1093/humrep/del337>
- Ambekar, A. S., Nirujogi, R. S., Srikanth, S. M., Chavan, S., Kelkar, D. S., Hinduja, I., Zaveri, K., Prasad, T. S. K., Harsha, H. C., Pandey, A., & Mukherjee, S. (2013). Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *Journal of Proteomics*, 87, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>
- Angel-Velez, D., De Coster, T., Azari-Dolatabad, N., Fernández-Montoro, A., Benedetti, C., Pavani, K., Van Soom, A., Bogado Pascottini, O., & Smits, K. (2023). Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. *Scientific Reports*, 13(1), 4765. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31268-6>
- Baena, V., Owen, C. M., Uliasz, T. F., Lowther, K. M., Yee, S.-P., Terasaki, M., Egbert, J. R., & Jaffe, L. A. (2020). Cellular Heterogeneity of the Luteinizing Hormone Receptor and Its Significance for Cyclic GMP Signaling in Mouse Preovulatory Follicles. *Endocrinology*, 161(7). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa074>
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P., & van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature Genetics*, 36(7), 744–749. <https://doi.org/10.1038/ng1382>
- Balaban, B., & Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), 608–615. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61187-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61187-X)
- Balboula, A. Z., Nguyen, A. L., Gentilello, A. S., Quartuccio, S. M., Drutovic, D., Solc, P., & Schindler, K. (2016). Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and

- stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*.
<https://doi.org/10.1242/jcs.189340>
- Balboula, A. Z., & Schindler, K. (2014). Selective Disruption of Aurora C Kinase Reveals Distinct Functions from Aurora B Kinase during Meiosis in Mouse Oocytes. *PLoS Genetics*, *10*(2), e1004194. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004194>
- Belli, M., Zhang, L., Liu, X., Donjacour, A., Ruggeri, E., Palmerini, M. G., Nottola, S. A., Macchiarelli, G., & Rinaudo, P. (2019). Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in in vitro fertilized preimplantation mouse embryos. *Human reproduction (Oxford, England)*, *34*(4), 601–611. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez011>
- ** Bennabi, I., Terret, M.-E., & Verlhac, M.-H. (2016). Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. *Journal of Cell Biology*, *215*(5), 611–619. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607062>
- Bentov, Y., Yavorska, T., Esfandiari, N., Jurisicova, A., & Casper, R. F. (2011). The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*(9), 773–783. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9588-7>
- Bertrand, E., Van Den Bergh, M., & Englert, Y. (1995). Fertilization and early embryology: Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human Reproduction*, *10*(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136116>
- Bilodeau-Goeseels, S., & Panich, P. (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, *71*(3–4), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00188-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00188-9)
- Blengini, C. S., Ibrahimian, P., Vaskovicova, M., Drutovic, D., Solc, P., & Schindler, K. (2021). Aurora kinase A is essential for meiosis in mouse oocytes. *PLOS Genetics*, *17*(4), e1009327. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009327>
- Borowiecka, M., Wojsiat, J., Polac, I., Radwan, M., Radwan, P., & Zbikowska, H. M. (2012). Oxidative stress markers in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *58*(6), 301–305. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.701367>
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, *14*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- Breuer, M., Kolano, A., Kwon, M., Li, C.-C., Tsai, T.-F., Pellman, D., Brunet, S., & Verlhac, M.-H. (2010). HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to

- extra centrosome clustering in cancer cells. *The Journal of cell biology*, 191(7), 1251–1260. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005065>
- Brunet, S., Dumont, J., Lee, K. W., Kinoshita, K., Hikal, P., Gruss, O. J., Maro, B., & Verlhac, M.-H. (2008). Meiotic Regulation of TPX2 Protein Levels Governs Cell Cycle Progression in Mouse Oocytes. *PLoS ONE*, 3(10), e3338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003338>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., & Taft, R. A. (2009). Surgical oocyte retrieval (SOR): a method for collecting mature mouse oocytes without euthanasia. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(1), 44–51.
- Cahill, D. J., Wardle, P. G., Harlow, C. R., & Hull, M. G. R. (1998). Onset of the preovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertility and Sterility*, 70(1), 56–59. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00113-7)
- Calanni-Pileri, M., Weitzel, J. M., Langhammer, M., & Michaelis, M. (2022). Higher quality rather than superior quantity of oocytes determine the amount of fertilizable oocytes in two outbred Dummerstorf high-fertility mouse lines. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(10), 1198–1207. <https://doi.org/10.1111/rda.14194>
- Carpintero, N. L., Suárez, O. A., Mangas, C. C., Varea, C. G., & Rioja, R. G. (2014). Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *Journal of human reproductive sciences*, 7(3), 187–193. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.142479>
- Ciotti, P. M., Notarangelo, L., Morselli-Labate, A. M., Felletti, V., Porcu, E., & Venturoli, S. (2004). First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Human Reproduction*, 19(10), 2334–2339. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh433>
- Clarke, P. R., & Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(6), 464–477. <https://doi.org/10.1038/nrm2410>
- Clift, D., & Schuh, M. (2015). A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nature Communications*, 6(1), 7217. <https://doi.org/10.1038/ncomms8217>
- De Bem, T., Adona, P., Bressan, F., Mesquita, L., Chiaratti, M., Meirelles, F., & Leal, C. (2014). The Influence of Morphology, Follicle Size and Bcl-2 and Bax Transcripts on the Developmental Competence of Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 576–583. <https://doi.org/10.1111/rda.12325>
- Dumont, J., Petri, S., Pellegrin, F., Terret, M.-E., Bohnsack, M. T., Rassiner, P., Georget, V., Kalab, P., Gruss, O. J., & Verlhac, M.-H. (2007). A centriole- and RanGTP-independent

- spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *Journal of Cell Biology*, 176(3), 295–305. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605199>
- Duranthon, V., & Renard, J. P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55(6), 1277–1289. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00482-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00482-4)
- Ebner, T. (2002). First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Human Reproduction*, 17(9), 2415–2418. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.9.2415>
- Egbert, J. R., Shuhaibar, L. C., Edmund, A. B., Van Helden, D. A., Robinson, J. W., Uliasz, T. F., Baena, V., Geerts, A., Wunder, F., Potter, L. R., & Jaffe, L. A. (2014). Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development*, 141(18), 3594–3604. <https://doi.org/10.1242/dev.112219>
- Emanuelli, I. P., Costa, C. B., Rafagnin Marinho, L. S., Seneda, M. M., & Meirelles, F. V. (2019). Cumulus-oocyte interactions and programmed cell death in bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 126, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.028>
- Eppig, J. J., Pendola, F. L., Wigglesworth, K., & Pendola, J. K. (2005). Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity Between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport1. *Biology of Reproduction*, 73(2), 351–357. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041798>
- Eytan, E., Wang, K., Miniowitz-Shemtov, S., Sitry-Shevah, D., Kaisari, S., Yen, T. J., Liu, S.-T., & Hershko, A. (2014). Disassembly of mitotic checkpoint complexes by the joint action of the AAA-ATPase TRIP13 and p31(comet). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12019–12024. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412901111>
- Fang, C., Tang, M., Li, T., Peng, W.-L., Zhou, C.-Q., Zhuang, G.-L., & Leong, M. (2007). Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(11), 547–551. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9171-4>
- Faramarzi, A., Khalili, M. A., & Jahromi, M. G. (2019). Is there any correlation between apoptotic genes expression in cumulus cells with embryo morphokinetics? *Molecular Biology Reports*, 46(4), 3663–3670. <https://doi.org/10.1007/S11033-019-04781-Z>
- Ferrandi, B., Cremonesti, F., Geiger, R., Consiglio, A. L., Carnevali, A., & Porcelli, F. (1993). Quantitative cytochemical study of some enzymatic activities in preovulatory bovine oocytes after in vitro maturation. *Acta Histochemica*, 95(1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80394-6](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80394-6)

- Geister, K. A., Brinkmeier, M. L., Hsieh, M., Faust, S. M., Karolyi, I. J., Perosky, J. E., Kozloff, K. M., Conti, M., & Camper, S. A. (2013). A novel loss-of-function mutation in Npr2 clarifies primary role in female reproduction and reveals a potential therapy for acromesomelic dysplasia, Maroteaux type. *Human Molecular Genetics*, 22(2), 345–357. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds432>
- Gerrits, T., Rooij, F. Van, Esho, T., Ndegwa, W., Goossens, J., Bilajbegovic, A., Jansen, A., Kioko, B., Koppen, L., Migiro, S. K., Mwenda, S., & Bos, H. (2017). Infertility in the Global South: Raising awareness and generating insights for policy and practice. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 9(1), 39. [/pmc/articles/PMC5506768/](https://doi.org/10.1007/s12025-017-0039-0)
- Gunnala, V., Melnick, A., Irani, M., Reichman, D., Schattman, G., Davis, O., & Rosenwaks, Z. (2017). Sliding scale HCG trigger yields equivalent pregnancy outcomes and reduces ovarian hyperstimulation syndrome: Analysis of 10,427 IVF-ICSI cycles. *PloS one*, 12(4), e0176019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176019>
- Hached, K., Xie, S. Z., Buffin, E., Cladière, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P. K., & Wassmann, K. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development*, 138(11), 2261–2271. <https://doi.org/10.1242/dev.061317>
- Hao, X., Wang, Y., Kong, N., Zhang, Y., Zhao, Y., Xia, G., & Zhang, M. (2016). Epidermal Growth Factor-Mobilized Intracellular Calcium of Cumulus Cells Decreases Natriuretic Peptide Receptor 2 Affinity for Natriuretic Peptide Type C and Induces Oocyte Meiotic Resumption in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 95(2), 45–45. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140137>
- Hara, M., Özkan, E., Sun, H., Yu, H., & Luo, X. (2015). Structure of an intermediate conformer of the spindle checkpoint protein Mad2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11252–11257. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512197112>
- Hardarson, T., Ahlstrom, A., Rogberg, L., Botros, L., Hillensjo, T., Westlander, G., Sakkas, D., & Wikland, M. (2012). Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Human Reproduction*, 27(1), 89–96. <https://doi.org/10.1093/humrep/der373>
- Hasegawa, J., Yanaihara, A., Iwasaki, S., Mitsukawa, K., Negishi, M., & Okai, T. (2007). Reduction of connexin 43 in human cumulus cells yields good embryo competence during ICSI. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(10), 463–466. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9155-4>

- ** He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>
- Hennet, M. I., & Combelles, C. M. H. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 819–831. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120133cc>
- Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2015). Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science*, *348*(6239), 1143–1147. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9529>
- Homer, H. A., McDougall, A., Levasseur, M., Yallop, K., Murdoch, A. P., & Herbert, M. (2005). Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes & Development*, *19*(2), 202–207. <https://doi.org/10.1101/gad.328105>
- Chang M C. (1959). Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature*, *184*(4684), 466–467. <https://doi.org/10.1038/184466a0>
- Charalambous, C., Webster, A., & Schuh, M. (2023). Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *24*(1), 27–44. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00517-3>
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Prasad, S., Tiwari, M., Tripathi, A., Pandey, A. N., & Premkumar, K. V. (2014). Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Open Journal of Apoptosis*, *03*(03), 52–58. <https://doi.org/10.4236/ojapo.2014.33006>
- Chen, F., Jiao, X.-F., Zhang, J.-Y., Wu, D., Ding, Z.-M., Wang, Y.-S., Miao, Y.-L., & Huo, L.-J. (2018). Nucleoporin35 is a novel microtubule associated protein functioning in oocyte meiotic spindle architecture. *Experimental Cell Research*, *371*(2), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.09.004>
- Choi, J. Y., Jo, M. W., Lee, E. Y., Yoon, B.-K., & Choi, D. S. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertility and Sterility*, *93*(8), 2532–2537. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.021>
- Choi, W.-J., Banerjee, J., Falcone, T., Bena, J., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2007). Oxidative stress and tumor necrosis factor- α -induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. *Fertility and Sterility*, *88*(4), 1220–1231. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.067>

- Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2005). Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Seminars in Reproductive Medicine*, 23(03), 234–241. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872451>
- Jana, S. K., K, N. B., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B., & Chaudhury, K. (2010). Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reproductive Toxicology*, 29(4), 447–451. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.04.002>
- Kalma, Y., Granot, I., Galiani, D., Barash, A., & Dekel, N. (2004). Luteinizing Hormone-Induced Connexin 43 Down-Regulation: Inhibition of Translation. *Endocrinology*, 145(4), 1617–1624. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1051>
- Kolano, A., Brunet, S., Silk, A. D., Cleveland, D. W., & Verlhac, M.-H. (2012). Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1204686109>
- Kong, P., Yin, M., Tang, C., Zhu, X., Bukulmez, O., Chen, M., & Teng, X. (2021). Effects of Early Cumulus Cell Removal on Treatment Outcomes in Patients Undergoing In Vitro Fertilization: A Retrospective Cohort Study. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.669507>
- Kordus, R. J., Hossain, A., Corso, M. C., Chakraborty, H., Whitman-Elia, G. F., & LaVoie, H. A. (2019). Cumulus cell pappalysin-1, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, amphiregulin and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 mRNA levels associate with oocyte developmental competence and embryo outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(7), 1457–1469. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01489-8>
- Krysko, D. V., Mussche, S., Leybaert, L., & D’Herde, K. (2004). Gap Junctional Communication and Connexin43 Expression in Relation to Apoptotic Cell Death and Survival of Granulosa Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(9), 1199–1207. <https://doi.org/10.1369/jhc.3A6227.2004>
- Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., Ellenberg, J., de Boer, P., & Nasmyth, K. (2006). Resolution of Chiasmata in Oocytes Requires Separase-Mediated Proteolysis. *Cell*, 126(1), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.033>

- Kuliev, A., Zlatopolsky, Z., Kirillova, I., Spivakova, J., & Cieslak Janzen, J. (2011). Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.08.014>
- Lamb, J. D., Zamah, A. M., Shen, S., McCulloch, C., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2010). Follicular fluid steroid hormone levels are associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 94(3), 952–957. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.010>
- Lazzaroni-Tealdi, E., Barad, D. H., Albertini, D. F., Yu, Y., Kushnir, V. A., Russell, H., Wu, Y.-G., & Gleicher, N. (2015). Oocyte Scoring Enhances Embryo-Scoring in Predicting Pregnancy Chances with IVF Where It Counts Most. *PLOS ONE*, 10(12), e0143632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143632>
- Lee, K. S., Joo, B. S., Na, Y. J., Yoon, M. S., Choi, O. H., & Kim, W. W. (2001). Cumulus Cells Apoptosis as an Indicator to Predict the Quality of Oocytes and the Outcome of IVF–ET. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(9), 490–498. <https://doi.org/10.1023/A:1016649026353>
- Li, S.-H., Lin, M.-H., Hwu, Y.-M., Lu, C.-H., Yeh, L.-Y., Chen, Y.-J., & Lee, R. K.-K. (2015). Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0091-3>
- Little, T. M., & Jordan, P. W. (2020). PLK1 is required for chromosome compaction and microtubule organization in mouse oocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 31(12), 1206–1217. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0701>
- Liu, X., Xie, F., Zamah, A. M., Cao, B., & Conti, M. (2014). Multiple Pathways Mediate Luteinizing Hormone Regulation of cGMP Signaling in the Mouse Ovarian Follicle1. *Biology of Reproduction*, 91(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116814>
- Lu, C.-H., Lee, R. K.-K., Hwu, Y.-M., Lin, M.-H., Yeh, L.-Y., Chen, Y.-J., Lin, S.-P., & Li, S.-H. (2013). Involvement of the Serine Protease Inhibitor, SERPINE2, and the Urokinase Plasminogen Activator in Cumulus Expansion and Oocyte Maturation. *PLoS ONE*, 8(8), e74602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074602>
- Manjunatha, B. M., Gupta, P. S. P., Devaraj, M., Ravindra, J. P., & Nandi, S. (2007). Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, 68(9), 1299–1304. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.031>
- Mikaeili, S., Rashidi, B. H., Safa, M., Najafi, A., Sobhani, A., Asadi, E., & Abbasi, M. (2016). Altered FoxO3 expression and apoptosis in granulosa cells of women with polycystic ovary

- syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 294(1), 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4068-z>
- Moreno, J. M., Núñez, M. J., Quiñonero, A., Martínez, S., de la Orden, M., Simón, C., Pellicer, A., Díaz-García, C., & Domínguez, F. (2015). Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertility and Sterility*, 104(4), 1037-1046.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.001>
- Navarro, P. A., de Araújo, M. M., de Araújo, C. M., Rocha, M., dos Reis, R., & Martins, W. (2009). Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 104(3), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2008.11.008>
- Nguyen, A. L., Marin, D., Zhou, A., Gentilello, A. S., Smoak, E. M., Cao, Z., Fedick, A., Wang, Y., Taylor, D., Scott, R. T., Xing, J., Treff, N., & Schindler, K. (2017). Identification and characterization of Aurora kinase B and C variants associated with maternal aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 23(6), 406–416. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax018>
- Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L., Lampe, P. D., & Jaffe, L. A. (2008). Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*, 135(19), 3229–3238. <https://doi.org/10.1242/dev.025494>
- Norris, R. P., Freudzon, M., Nikolaev, V. O., & Jaffe, L. A. (2010). Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(5), 655–662. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0288>
- 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*, 136(11), 1869–1878. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>
- O'Brien, Y., Wingfield, M., & O'Shea, L. C. (2019). Anti-Müllerian hormone and progesterone levels in human follicular fluid are predictors of embryonic development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0492-9>
- Ohlweiler, L. U., Brum, D. S., Leivas, F. G., Moyses, A. B., Ramos, R. S., Klein, N., Mezzalira, J. C., & Mezzalira, A. (2013). Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo

- production from poor quality bovine oocytes. *Theriogenology*, 79(5), 778–783. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.002>
- Pirino, G., Wescott, M. P., & Donovan, P. J. (2009). Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 8(4), 665–670. <https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7846>
- Raju, G. R., Prakash, G., Krishna, K., & Madan, K. (2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(2), 166–174. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60784-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60784-5)
- Rana, B., Lambrese, K., Mendola, R., Xu, J., Garrisi, J., Miller, K., Marin, D., & Treff, N. R. (2023). Identifying parental and cell-division origins of aneuploidy in the human blastocyst. *The American Journal of Human Genetics*, 110(4), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.03.003>
- Revelli, A., Canosa, S., Bergandi, L., Skorokhod, O. A., BIASONI, V., Carosso, A., Bertagna, A., Maule, M., Aldieri, E., D'Eufemia, M. D., Evangelista, F., Colacurci, N., & Benedetto, C. (2017). Oocyte polarized light microscopy, assay of specific follicular fluid metabolites, and gene expression in cumulus cells as different approaches to predict fertilization efficiency after ICSI. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-017-0265-2>
- ** Rodríguez-Varela, C., Herraiz, S., & Labarta, E. (2021). Mitochondrial enrichment in infertile patients: a review of different mitochondrial replacement therapies. *Therapeutic advances in reproductive health*, 15, 26334941211023544. <https://doi.org/10.1177/26334941211023544>
- Salehi, E., Aflatoonian, R., Moeini, A., Yamini, N., Asadi, E., Khosravizadeh, Z., Tarzjani, M. D., Harat, Z. N., & Abolhassani, F. (2017). Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 296(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4523-5>
- Shahrokh Tehraninejad, E., Farshbaf Taghinejad, M., Hossein Rashidi, B., & Haghollahi, F. (2017). Controlled ovarian stimulation with r-FSH plus r-LH vs. HMG plus r-FSH in patients candidate for IVF/ICSI cycles: An RCT. *International journal of reproductive biomedicine*, 15(7), 435–440.
- Sharif, B., Na, J., Lykke-Hartmann, K., McLaughlin, S. H., Laue, E., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2010). The chromosome passenger complex is required for fidelity of chromosome transmission and cytokinesis in meiosis of mouse oocytes. *Journal of cell science*, 123(Pt 24), 4292–4300. <https://doi.org/10.1242/jcs.067447>

- Shi, W., Xu, B., Wu, L.-M., Jin, R.-T., Luan, H.-B., Luo, L.-H., Zhu, Q., Johansson, L., Liu, Y.-S., & Tong, X.-H. (2014). Oocytes with a Dark Zona Pellucida Demonstrate Lower Fertilization, Implantation and Clinical Pregnancy Rates in IVF/ICSI Cycles. *PLoS ONE*, *9*(2), e89409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089409>
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1462–1467. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108>
- Shuda, K., Schindler, K., Ma, J., Schultz, R. M., & Donovan, P. J. (2009). Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Molecular reproduction and development*, *76*(11), 1094–1105. <https://doi.org/10.1002/mrd.21075>
- Shuhaibar, L. C., Egbert, J. R., Edmund, A. B., Uliasz, T. F., Dickey, D. M., Yee, S.-P., Potter, L. R., & Jaffe, L. A. (2016). Dephosphorylation of juxtamembrane serines and threonines of the NPR2 guanylyl cyclase is required for rapid resumption of oocyte meiosis in response to luteinizing hormone. *Developmental Biology*, *409*(1), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.10.025>
- Schindler, K., Davydenko, O., Fram, B., Lampson, M. A., & Schultz, R. M. (2012). Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1120517109>
- Schuh, M., & Ellenberg, J. (2007). Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell*, *130*(3), 484–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.025>
- Silva, D. S., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N. S., & Rodrigues, J. L. (2013). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, *21*(3), 250–255. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000487>
- Simon, A. M., Chen, H., & Jackson, C. L. (2006). Cx37 and Cx43 Localize to Zona Pellucida in Mouse Ovarian Follicles. *Cell Communication & Adhesion*, *13*(1–2), 61–77. <https://doi.org/10.1080/15419060600631748>
- Simsek-Duran, F., Li, F., Ford, W., Swanson, R. J., Jones, H. W., & Castora, F. J. (2013). Age-Associated Metabolic and Morphologic Changes in Mitochondria of Individual Mouse and Hamster Oocytes. *PLoS ONE*, *8*(5), e64955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064955>
- So, C., Menelaou, K., Uraji, J., Harasimov, K., Steyer, A. M., Seres, K. B., Bucevičius, J., Lukinavičius, G., Möbius, W., Sibold, C., Tandler-Schneider, A., Eckel, H., Moltrecht, R.,

- Blayney, M., Elder, K., & Schuh, M. (2022). Mechanism of spindle pole organization and instability in human oocytes. *Science*, 375(6581). <https://doi.org/10.1126/science.abj3944>
- Solc, P., Kitajima, T. S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J., & Ellenberg, J. (2015). Multiple Requirements of PLK1 during Mouse Oocyte Maturation. *PLOS ONE*, 10(2), e0116783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116783>
- Stephens, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet*, 312(8085), 366. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)92957-4)
- Sun, S.-C., & Kim, N.-H. (2012). Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. *Human Reproduction Update*, 18(1), 60–72. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr044>
- Swain, J. E., Ding, J., Wu, J., & Smith, G. D. (2008). Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Molecular Human Reproduction*, 14(5), 291–299. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan015>
- Świątecka, J., Anchim, T., Leśniewska, M., Wołczyński, S., Bielawski, T., & Milewski, R. (2014). Oocyte zona pellucida and meiotic spindle birefringence as a biomarker of pregnancy rate outcome in IVF-ICSI treatment. *Polish Gynaecology*, 85(4). <https://doi.org/10.17772/gp/1722>
- Tilia, L., Chapman, M., Kilani, S., Cooke, S., & Venetis, C. (2020). Oocyte meiotic spindle morphology is a predictive marker of blastocyst ploidy—a prospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 113(1), 105-113.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.070>
- Tomari, H., Honjo, K., Kunitake, K., Aramaki, N., Kuhara, S., Hidaka, N., Nishimura, K., Nagata, Y., & Horiuchi, T. (2018). Meiotic spindle size is a strong indicator of human oocyte quality. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 268–274. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12100>
- Touati, S. A., Buffin, E., Cladière, D., Hached, K., Rachez, C., van Deursen, J. M., & Wassmann, K. (2015). Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nature Communications*, 6(1), 6946. <https://doi.org/10.1038/ncomms7946>
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., & Conti, M. (2009). Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 81(3), 595–604. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077768>
- Van Blerkom, J. (1991). Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(11), 5031–5035. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.5031>

- Verlinsky, Y., Lerner, S., Illkevitch, N., Kuznetsov, V., Kuznetsov, I., Cieslak, J., & Kuliev, A. (2003). Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reproductive BioMedicine Online*, 7(3), 336–341. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61874-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61874-3)
- von Wolff, M., Kollmann, Z., Fluck, C. E., Stute, P., Marti, U., Weiss, B., & Bersinger, N. A. (2014). Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Human Reproduction*, 29(5), 1049–1057. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu044>
- Wang, H.-X., Tong, D., El-Gehani, F., Tekpetey, F. R., & Kidder, G. M. (2009). Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(5), 972–984. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00373.x>
- Wang, W. H. (2001). Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Human Reproduction*, 16(7), 1464–1468. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.7.1464>
- Wang, W. H., Meng, L., Hackett, R. J., Odenbourg, R., & Keefe, D. L. (2001). The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertility and Sterility*, 75(2), 348–353. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01692-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01692-7)
- Warshaviak, M., Kalma, Y., Carmon, A., Samara, N., Dviri, M., Azem, F., & Ben-Yosef, D. (2019). The Effect of Advanced Maternal Age on Embryo Morphokinetics. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00686>
- Wirleitner, B., Okhowat, J., Vištejnová, L., Králíčková, M., Karlíková, M., Vanderzwalmen, P., Ectors, F., Hradecký, L., Schuff, M., & Murtinger, M. (2018). Relationship between follicular volume and oocyte competence, blastocyst development and live-birth rate: optimal follicle size for oocyte retrieval. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 51(1), 118–125. <https://doi.org/10.1002/uog.18955>
- Wyse, B. A., Fuchs Weizman, N., Kadish, S., Balakier, H., Sangaralingam, M., & Librach, C. L. (2020). Transcriptomics of cumulus cells – a window into oocyte maturation in humans. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00696-7>
- Yang, K.-T., Li, S.-K., Chang, C.-C., Tang, C.-J. C., Lin, Y.-N., Lee, S.-C., & Tang, T. K. (2010). Aurora-C Kinase Deficiency Causes Cytokinesis Failure in Meiosis I and Production of Large Polyploid Oocytes in Mice. *Molecular Biology of the Cell*, 21(14), 2371–2383. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0170>

- Yang, M. Y., & Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 159–169. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00186-5)
- Yang, Y., Tan, W., Chen, C., Jin, L., & Huang, B. (2022). Correlation of the position and status of the polar body from the fertilized oocyte to the euploid status of blastocysts. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1006870>
- Yue, W., Wang, Y., Meng, T., Zhang, H., Zhang, X., Ouyang, Y., Hou, Y., Schatten, H., Wang, Z., & Sun, Q. (2022). Kinetochore scaffold 1 regulates SAC function during mouse oocyte meiotic maturation. *The FASEB Journal*, 36(3). <https://doi.org/10.1096/fj.202101586RR>
- Zhang, C., Zhao, L., Leng, L., Zhou, Q., Zhang, S., Gong, F., Xie, P., & Lin, G. (2020). CDCA8 regulates meiotic spindle assembly and chromosome segregation during human oocyte meiosis. *Gene*, 741, 144495. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144495>
- Zhang, J. J., Merhi, Z., Yang, M., Bodri, D., Chavez-Badiola, A., Repping, S., & van Wely, M. (2016). Minimal stimulation IVF vs conventional IVF: a randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(1), 96.e1-96.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.009>
- Zhang, M., Su, Y.-Q., Sugiura, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2010). Granulosa Cell Ligand NPPC and Its Receptor NPR2 Maintain Meiotic Arrest in Mouse Oocytes. *Science*, 330(6002), 366–369. <https://doi.org/10.1126/science.1193573>
- Zhao, J., & Li, Y. (2012). Adenosine Triphosphate Content in Human Unfertilized Oocytes, Undivided Zygotes and Embryos Unsuitable for Transfer or Cryopreservation. *Journal of International Medical Research*, 40(2), 734–739. <https://doi.org/10.1177/147323001204000238>