



## التعبير الجيني لخلايا الركام المبيضي (Cumulus Cells) خلال مرحلة إنضاج البويضات وعلاقتها مع قدرة البويضات على التطور بعد الإخصاب المخبري عند الأبقار

### Gene Expression of Cumulus Cells During Maturation Stage and Relationship with Oocyte Developmental Competence in Bovine

د. محمد سلهب (1) د. محمد موسى (2)

Mohammad SALHAB (1) Mohamad MOUSSA (2)

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – دائرة الثروة الحيوانية – اللاذقية – سورية.

(1) General Authority for Scientific Agricultural Research, Lattakia, Syria.

(2) أستاذ مساعد في قسم الجراحة والولادة – مختبر التلقيح الاصطناعي ونقل الأجنة، كلية الطب البيطري – جامعة حماه- حماه- سوريا.

(2) Associate Prof. Department of Surgery and Obstetrics, Laboratory of Artificial Insemination and Embryos Transfer, Fac. Vet. Medicine, University of Hama, Hama – Syria.

#### المخلص

يهدف هذا البحث إلى الكشف عن مؤشرات جينية تعكس مقدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب المخبري وذلك من خلال دراسة التعبير الجيني لجينات في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة أعلى أو أقل على التطور بعد الإخصاب المخبري. أنجز هذا البحث في المعهد الوطني للبحوث العلمية الزراعية (INRA) في مدينة تور، فرنسا، خلال عام 2010. استخدام ثلاثة نماذج من قدرة البويضة على التطور استناداً إلى الاختلاف في نسبة الأرومات (Blastocysts) الناتجة بعد الإخصاب والتطور المخبري (1) بويضات ذات مقدرة عالية على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts: 60 إلى 70 %) متمثلة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (In vivo) ومستخلصة من أبقار بالغة، (2) بويضات ذات مقدرة أقل على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts: 30 إلى 40 %) متمثلة ببويضات منضجة مخبرياً (In vitro) ومستخلصة من أبقار بالغة، (3) بويضات ذات مقدرة منخفضة على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts > 20 %) متمثلة ببويضات منضجة مخبرياً (In vitro) ومستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر. تم عزل خلايا الركام المبيضي المحيطة بالبويضات المنضجة ومن ثم تم استخراج RNA من أجل دراسة التعبير الجيني باستخدام تقانة RT-qPCR. تركّزت الدراسة على خمسة جينات (SERPINA5، MMP9، SDC2، HAS2 و CAPG) لها دور في تنظيم بنية المشبك خارج خلايا الركام المبيضي (ECM (Extracellular Matrix) وعلى الجين (GSTA1) الذي له دور في إبطال فعل الجذور الحرة الناتجة عن الإجهاد التأكسدي. تم تحديد معدل خلايا الركام المبيضي المصابة بظاهرة الأوبوتوز Apoptosis (الموت الخلوي المبرمج) بعد الإنضاج باستخدام تقانة TUNEL. أظهرت الدراسة أن مستوى التعبير الجيني لكل جين من الجينات الخمسة المدروسة (MMP9، SERPINA5، SDC2، HAS2 و CAPG) ارتبط بشكل سلبي مع قدرة البويضة على التطور حيث أنه كان أعظماً في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة منخفضة على التطور والمستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر (مستوى التعبير الجيني: الأنموذج 3 < الأنموذج 2 < الأنموذج 1). في حين أن مستوى التعبير الجيني للجين GSTA1 كان متدياً في خلايا الركام المبيضي المحيطة بالبويضات المنضجة مخبرياً (In vitro) بالمقارنة مع خلايا

الركام المبيضي المحيطة بالبويضات المنضجة داخل جسم الحيوان (In vivo). كما أنّ اختلافاً معنوياً تمت ملاحظته في معدل الأوبوتوز بين النماذج الثلاثة حيث أبدى الأنموذج 3 تفوقاً ( $p > 0.05$ ) في نسبة خلايا الركام المبيضي المصابة بالأوبوتوز بالمقارنة مع الأنموذجين 1 و 2 وبلغت القيم 30.3% و 18.1% و 8.7% على التوالي. يستنتج من هذه الدراسة أن مستوى التعبير الجيني العالي للجينات (MMP9، SERPINA5، SDC2، HAS2 و CAPG) وانخفاض مستوى التعبير الجيني للجين GSTA1 يمكن أن يشكل انعكاساً لظواهر الأوبوتوز والإجهاد التأكسدي خلال الإنضاج المخبري. كما أن انخفاض قدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب المخبري قد يعزى إلى معدل الأوبوتوز العالي في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج.

**الكلمات المفتاحية:** بقر، إنضاج، بويضة، ركام مبيضي، قدرة البويضة على التطور، تعبير جيني.

## Abstract

This study aims to identify genes which level of expression in cumulus cells (CC) reflects the developmental competence of the enclosed oocyte. This study was carried out at the National Agronomic Research Institute (INRA)-Tours, France in 2010. Three models of oocyte developmental competence were used: 1) In vivo matured oocytes of adult cows: that present a high developmental competence after in vitro fertilization (Blastocysts: 60-70 %), 2) In vitro matured oocytes of adult cows: that present a moderate developmental competence after in vitro fertilization (Blastocysts: 30-40 %), 3) In vitro matured oocytes of prepubertal calves: that present a low developmental competence after in vitro fertilization (Blastocysts < 20 %). Cumulus cells that surround matured oocytes were mechanically separated and then total RNA has been extracted. The level of genes expression has been analyzed using RT-qPCR technique. The expression of several candidate genes involved in extracellular matrix reorganization (HAS2, SDC2, SERPINA5, MPP9, CAPG) and oxidative stress response (GSTA1) was analyzed. The rate of apoptotic cumulus cells was determined by TUNEL technique. This study demonstrated that expression of HAS2, SERPINA5, MMP9, SDC2 and CAPG in CC is negatively correlated with oocyte developmental competence. The expression level of this genes is maximal in CC that surround in vitro matured oocytes of prepubertal calves (expression : model 3 > model 2 > model 1). The expression of GSTA1 is low in CC that surround in vitro matured oocytes. The rate of apoptotic cumulus cells showed significantly different between the three models of oocyte developmental competence. It was ( $8.7\% \pm 2.2$ ) in CC that surround in vivo matured oocytes of adult cows and ( $18.1\% \pm 3.1$ ) in CC that surround in vitro matured oocytes of adult cows and ( $30.3\% \pm 2.2$ ) in CC that surround in vitro matured oocytes of prepubertal calves. In conclusion, the activation of SERPINA5, HAS2, SDC2, MMP9 and CAPG, and the repression of GSTA1 during in vitro culture, reflects the apoptosis events and the oxidative stress induced by in vitro culture, and the high rate of apoptosis in CC has a negative effect on oocyte developmental competence.

**Keywords:** Cow, Oocyte, Maturation, Cumulus cells, Competence, Expression.

## المقدمة

تخضع البويضة المحاطة بخلايا الركام المبيضي لعملية إنضاج نهائي استجابة لذروة الهرمون الملوتن (LH)، والتي يتم الوصول إليها نتيجة إفراز هذا الهرمون من قبل الغدة النخامية بشكل نبضي وبوتيرة متسارعة ليصل إلى مستوى ما يسمى بذرورة ما قبل الاباضة (Fair، 2003). يتميز هذا الإنضاج النهائي باستكمال البويضة لانقسامها الميوزي لتصل إلى الطور الاستوائي من الانقسام الميوزي الثاني (MII) مع ملاحظة خروج الكرية القطبية الأولى، وهذا ما يسمى بالإنضاج

النوي للبيضة، حيث تبقى البيضة في هذا الطور (MII) إلى حين تنشيطها من قبل النطفة أثناء الإخصاب لتستكمل الانقسام الميوزي بشكل كامل وتعطي الكرية القطبية الثانية. يتراكم خلال الإنضاج كميات من RNA والبروتينات والليبيدات وغيرها من المركبات في سيتوبلازم البيضة التي سيتم استخدامها من أجل سير عملية الإخصاب ودعم المراحل المبكرة للتطور الجنيني وهذا ما يسمى بالإنضاج السيتوبلازمي للبيضة، حيث يعتمد الجنين بشكل أساسي في مراحل تطوره المبكرة على مخزون البيضة من هذه المركبات إلى حين تفعيل جينومه ويصبح مستقلاً وقادراً على دعم نشاطه ومراحل تطوره المتتابعة (Gosden، 2002، Kawamura وزملاؤه، 2004، Richard، 2007). خلال الإنضاج تفرز خلايا الركام المبيضي المحيطة بالبيضة مكونات بروتينية وسكرية ترتبط ببعضها البعض على شكل معقدات ذات طابع لزج مشكّلة ما يسمى بالمشبك خارج خلوي (ECM) (Extracellular Matrix)، مما يؤدي إلى ازدياد حجمي جذري مسبباً تباعد خلايا الركام المبيضي عن بعضها البعض من جهة وعن البيضة من جهة أخرى، وهذا ما يسمى بظاهرة انتشار خلايا الركام المبيضي (Cumulus expansion) (Richards، 2005). أمكن تحقيق عملية إنضاج البيضة مخبرياً وأصبحت من أهم تقانات التناسل عند الأبقار إلا أن البيضة المنضجة مخبرياً (In vitro) لا تزال قدرتها على التطور بعد الإخصاب المخبري أقل من قدرة البيضة المنضجة داخل جسم الحيوان الحي (In vivo) (Leibfried-Rutledge وزملاؤه، 1987، Lonergan و Fair، 2008). أثبتت دراسات عديدة أن خلايا الركام المبيضي دوراً أساسياً في إنضاج البيضة وإعطائها المقدرة على التطور بعد الإخصاب المخبري (Furnus وزملاؤه، 1998، Tanghe وزملاؤه، 2002، Van Soom وزملاؤه، 2002). تتصل خلايا الركام المبيضي فيما بينها من جهة ومع البيضة من جهة أخرى بوساطة أفتية بين خلوية تسمح بمرور الجزيئات والأيونات ذات الوزن الجزيئي الصغير (أقل من 3 كيلو دالتون) (Kidder و Mhawi، 2002). هذه البنية المتماصة التي تشكلها خلايا الركام المبيضي مع البيضة من خلال هذه الأفتية بين خلوية تسمح لخلايا الركام المبيضي بممارسة دورها الفعال في الإنضاج السيتوبلازمي للبيضة. حيث أنه من المعروف أن خلايا الركام المبيضي تستقلب مركب السيستين (Cysteine) إلى مركب السيستين (Cystine)، وهو الشكل الذي يمكن انتقاله إلى البيضة واستخدامه من قبلها في تصنيع مادة بروتينية تدعى الغلوتاثيون (GSH) والتي لها دور أساس في حماية البيضة ضد الجذور الحرة (De Matos وزملاؤه، 1997، Tatemoto وزملاؤه، 2000) وتهيئة البادئة النووية للنطفة بعد الإخصاب من أجل اندماجها مع البادئة النووية للبيضة (Tanghe وزملاؤه، 2002). يشكل المشبك خارج خلوي ECM (المكوّن من قبل خلايا الركام المبيضي في نهاية الإنضاج) بيئة ميكرونية تحيط بالبيضة وتحميها من تأثيرات الوسط المحيط وبشكل خاص عوامل الإجهاد التأكسدي أو الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) الملاحظة خلال فترة الإنضاج. كما يسهم المشبك خارج خلوي (ECM) في الحفاظ على اندماجية خلايا الركام المبيضي مع البيضة وبالتالي استمرارية خلايا الركام بتمرير الإشارات والجزيئات إلى البيضة واستكمال تحقيق الإنضاج النهائي للبيضة فضلاً عن دور المشبك في حدوث عملية الاباضة ومرور البيضة في القناة الناقلة وإعطاء المقدرة الإخصابية للنطفة (Buccione وزملاؤه، 1990، Tanghe وزملاؤه، 2002، Russell و Salustri، 2006).

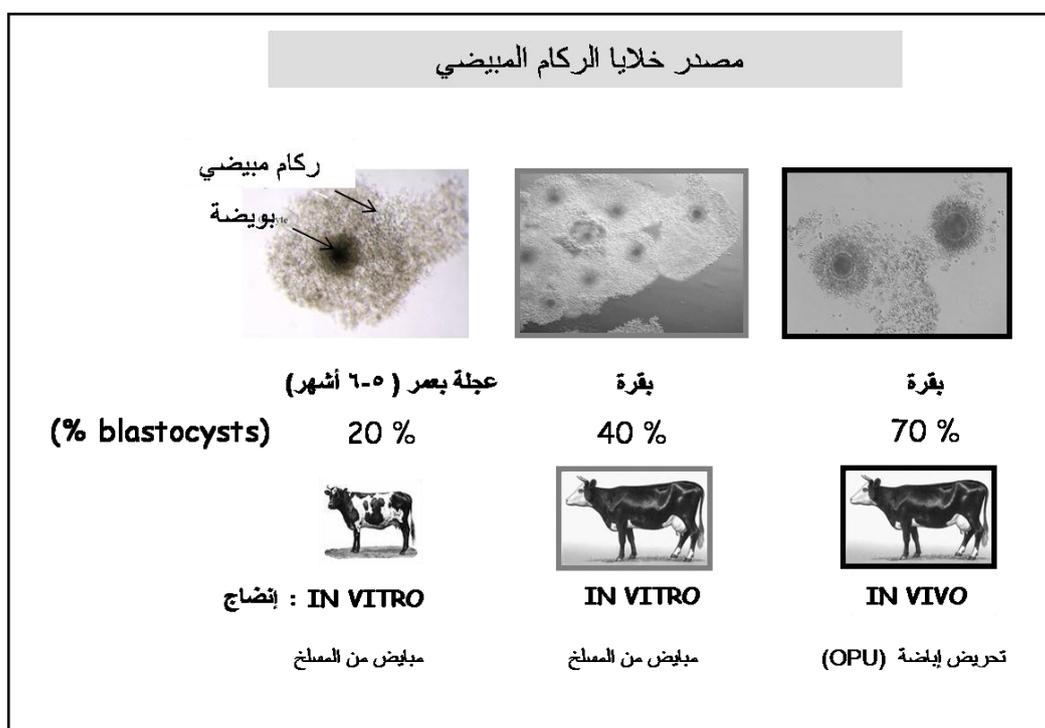
أوضحت الدراسة المخبرية التي أجريت حديثاً من قبل Auclair وزملاؤه (2013) أن إنضاج بويضات عارية من خلايا الركام المبيضي أعطت نسبة أقل من الأرومات (Blastocyst) بعد الإخصاب والتطور المخبري مقارنةً بالبويضات التي أنضجت مع خلايا الركام المبيضي المحيطة بها (20% مقابل 40%). كما أن المستوى المرتفع لظاهرة الموت الخلوي (Apoptosis) في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج كان يرافقه دوماً نسبة أقل من الأرومات (Blastocyst) (Ikeda وزملاؤه، 2006، Balboula وزملاؤه، 2010، Salhab وزملاؤه، 2011). حيث أن نسبة الخلايا الركامية المصابة بالأبوتوز ازدادت بشكل معنوي بعد 12 ساعة من الإنضاج المخبري ووصلت إلى مستوى أعظمي في نهاية الإنضاج (بعد 24 ساعة) (Ikeda وزملاؤه، 2003) كما أن التعبير الجيني لبعض الجينات التي لها دور في ظاهرة الأبوتوز (كالجينين BAX و CLU) تم إثباتها في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج المخبري (Salhab وزملاؤه، 2011). أثبتت دراسات عديدة أن نسبة البويضات التي استكملت انقسامها الميوزي حتى الطور الاستوائي من الانقسام الميوزي الثاني (MII) بعد الإنضاج المخبري وصلت إلى 75 إلى 80% إلا أنه فقط 30 إلى 40% من البويضات تطورت بعد الإخصاب المخبري إلى مرحلة الأرومة (Blastocyst) (المرحلة التي يتم عندها نقل وزراعة الجنين في رحم الأبقار) في حين أن نسبة الأرومات وصلت إلى 70% في حال الإخصاب والتطور المخبري لبويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (Mermillod وزملاؤه، 1999، Rizos وزملاؤه، 2002، Salhab وزملاؤه، 2011). بينت هذه

الدراسات أن نسبة الأرومات الناتجة عن إخصاب وتطور مخبري لبويضات منضجة مخبرياً (In vitro) أقل مما هي عليه في حال إخصاب وتطور مخبري لبويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (In vivo).  
تهدف هذه الدراسة إلى:

- 1- الكشف عن مؤشرات جينية تعكس مقدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب المخبري وذلك عن طريق دراسة مستوى التعبير الجيني (خلال الإنضاج) لجينات في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة أعلى أو أقل على التطور بعد الإخصاب المخبري. تركزت الدراسة على خمسة جينات (MMP9، SERPINA5، SDC2، HAS2 و CAPG) لها دور في تنظيم بنائية المشبك خارج خلايا الركام المبيضي (ECM) وعلى الجين (GSTA1) الذي له دور في إبطال فعل الجذور الحرة الناتجة عن الإجهاد التأكسدي.
- 2- تحديد معدل الموت الخلوي المبرمج أو الأبوتوز (Apoptosis) بعد الإنضاج في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة أعلى أو أقل على التطور بعد الإخصاب المخبري، لمعرفة مدى العلاقة بين درجة الأبوتوز وقدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب وربطها بمستوى التعبير الجيني للجينات السابقة الذكر.

### مواد البحث وطرائقه

أنجز هذا البحث في المعهد الوطني للبحوث العلمية الزراعية الفرنسي (INRA) بالتعاون مع جامعة فرانسوا رابيليه في مدينة تور، (فرنسا)، حيث تم استخدام ثلاثة نماذج من قدرة البويضة على التطور استناداً إلى الاختلاف في نسبة الأرومات (Blastocysts) الناتجة بعد الإخصاب والتطور المخبري: (1) بويضات ذات مقدرة عالية على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts: 60 إلى 70 %) متمثلة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (In vivo) ومستخلصة من أبقار بالغة، (2) بويضات ذات مقدرة أقل على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts: 30 إلى 40 %) متمثلة ببويضات منضجة مخبرياً (In vitro) ومستخلصة من أبقار بالغة، (3) بويضات ذات مقدرة منخفضة على التطور بعد إخصابها مخبرياً (Blastocysts > 20 %) متمثلة ببويضات منضجة مخبرياً (In vitro) ومستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر (الشكل 1). إن جميع المواد المستخدمة في هذا البحث والتي لم يذكر اسم مصدرها التجاري هي حصراً مشتتة من شركة (Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).



الشكل 1. مصدر خلايا الركام المبيضي المستخدمة في التجربة.

**1. جمع البويضات****أ- من أبقار حية:**

جُمعت البويضات المنضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*) وفقاً لبروتوكول تحريض الإباضة الفائقة حسب (Guyader-Joly وزملاؤه، 1997). حيث تمت مزامنة مجموعة من الأبقار البالغة من سلالة الهولشتاين بوساطة كبسولات من البروجسترون وضعت على الأذن لمدة 10 أيام. استبعدت في اليوم الثامن من وضع الكبسولات الجريبات ذات القطر 8 إلى 14 مم بعملية شفط مهبطي إيكوغرافي باستخدام تقانة OPU (Ovum Pick-Up) وتم في اليوم العاشر من وضع الكبسولات تحريض الأبقار هرمونياً عن طريق حقنها عضلياً بمادة الستيروفول (LH-FSH) (Stimoful) (ULg FMV-Liège Belgique) حيث أعطيت كل بقرة 32 ملغ من الستيروفول في 7 جرعات متناقضة خلال أربعة أيام. اعتباراً من الجرعة الخامسة من الستيروفول حقنت الأبقار عضلياً بالبروستاغلاندين (PG<sub>2</sub>)، ومن ثم تم نزع كبسولات البروجسترون في اليوم التالي. بعد حوالي 60 ساعة من حقن البروستاغلاندين تم شفط الجريبات التي يزيد قطرها عن 8 مم، تلك الجريبات التي تحوي على بويضات محاطة بالركام المبيضي والتي يفترض أن تكون ناضجة. حيث استقبل محتوى هذه الجريبات في أنبوب يحتوي على محلول الفوسفات الوافي (PBS) درجة حرارته 32 م° مضافاً إليه الهيبارين والجنتاميسين.

**ب- من أبقار مذبوحة:**

جُمعت مبايض أبقار بالغة ومبايض عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر من مسالخ تجارية ومن ثم نُقلت مباشرة إلى المخبر ضمن محلول ملحي (0,9% NaCl) درجة حرارته 32 إلى 35 م° وشفطت الجريبات ذات القطر 2 إلى 6 مم باستخدام آلة شفط خاصة وتم استقبال محتوى هذه الجريبات في أنبوب يحتوي محلول الفوسفات الوافي (PBS) درجة حرارته 32 م° مضافاً إليه الهيبارين والجنتاميسين. تمت عملية فرز البويضات تحت المجهر وغسلها عدة مرات في الوسط (199-TCM)، حيث اختيرت البويضات ذات المظهر المتجانس والمحاطة بأكثر من 3 طبقات من خلايا الركام المبيضي، ومن ثم أُخضعت للإنضاج المخبري في حاضنة درجة حرارتها 38,8 م° ضمن هواء رطب بنسبة 5% من CO<sub>2</sub> ولمدة 24 ساعة ضمن وسط إنضاج تم وصفه مسبقاً من قبل Donnay وزملائه (1998) يحوي المكونات التالية:

Fibroblast growth + Insulin-like growth factor (19ng/ml) + EGF (10ng/ml) + TCM199  
Transferrin + Insulin (5µg/ml) +PMSG (10IU/ml) + hCG (5IU/ml) +factor (2,2ng/ml)  
Glycine + β-mercaptoethanol (0,1mM) + Cysteine (90µg/ml) + Selenium (5ng/ml) + (5µg/ml)  
Ascorbic acid (75 µg/ml) + Pyruvate (110µg/ml) + Glutamine (0,1mg/ml) + (720µg/ml)  
(كل 50 بويضة تم وضعها في حفرة تحوي 500 ميكرو ليتر من وسط الإنضاج).

**2. استخلاص RNA الكلي من خلايا الركام المبيضي:**

تم فصل خلايا الركام المبيضي عن البويضات المنضجة بطريقة ميكانيكية باستخدام المايكروبايبيت ومن ثم وضعت خلايا الركام المبيضي في محلول Trizol. أضيف الكلوروفورم وتمت عملية مزج جيدة بهدف تفكيك وتهشيم خلايا الركام المبيضي وفصلها إلى 3 طبقات:  
- طبقة سفلى تحوي المكونات البروتينية.  
- طبقة وسطى تحوي DNA.  
- طبقة عليا تحوي RNA.  
تم رشف الطبقة العلوية التي تحوي RNA، ومن ثم تم ترسيبه باستخدام الإيزوبروبانول.

**3. تقانة RT-PCR:**

بعد استخلاص RNA الكلي من خلايا الركام المبيضي تمت معالجته بأنزيم DNase من شركة (Promega, Charbonnieres, France) لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 37 م° بهدف تحطيم الـDNA في العينة في حال كان هناك عملية تلوث بالـDNA. استُخدم 400 نانوغرام من الـRNA الكلي والمعالج بالـDNase من أجل تطبيق تقانة النسخ العكسي (Reverse transcription) (RT). تهدف تلك التقانة إلى تركيب شريط DNA اعتباراً من شريط RNA الرسول بوجود أنزيم النسخ العكسي (Reverse Transcriptase) واليوادئ النكليوتيدية [oligo-(dT)].

primer يسمى DNA المتشكل بالـ DNA المكمل ويرمز له بالـ cDNA حيث يُستخدم كمادة بيولوجية أساسية للكشف عن الجينات المعبر عنها في الخلية. وبهدف التأكد من صحة سير تقانة RT وفعالية البودائ oligo-(dT) تم إجراء التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR باستخدام مزيج الـ PCR (SYBR Green) من شركة (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) والبودائ النكليوتيدية الخاصة بالجينات المراد دراستها (الجدول 1) و1% من الـ cDNA الناتجة من أجل كل جين. تم إجراء التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR في جهاز التدوير الحراري من شركة Bio-Rad Eppendorf وفق البرنامج الحراري التالي:

A. فصل حراري أولي (Initial Denaturation) لسلاسل الـ cDNA على درجة حرارة 94 م لمدة 5 دقائق.

B. إجراء 35 دورة حيث تتضمن كل دورة:

- فصل السلاسل (Denaturation) لمدة 30 ثانية على درجة حرارة 94 م.

- التحام البادئ (Annealing) لمدة 30 ثانية على درجة حرارة 60 م.

- استطالة (Extension) لسلسلة الـ DNA الجديدة لمدة 20 ثانية على درجة حرارة 72 م.

C. استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 72 م لإنهاء جميع التفاعلات. تم ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR في هلامة الأغاروز بتركيز 1,5% مع تحميل مؤشر قياسي للـ DNA (DNA ladder) ذو حزم ثابتة ومحددة الأوزان الجزيئية، وشوهدت الحزم الظاهرة بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light.

#### 4. تقانة Real time PCR:

استُخدم جهاز التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR من نوع MyiQ شركة (Bio-Rad) من أجل قياس كمية الـ mRNA الخاصة بالجين المراد قياس مستوى التعبير عنه. تم إجراء التفاعل لكل عينة بحجم كلي 20 ميكرو ليتر يحوي مزيج الـ PCR (SYBR Green) من شركة (Bio-Rad)، 0.25 بيكو مول من البادئة و5 نانو غرام من الـ cDNA وفقاً للبرنامج الحراري التالي:

I. فصل حراري أولي (Initial Denaturation) لسلاسل الـ cDNA على درجة حرارة 94 م لمدة 5 دقائق.

II. إجراء 40 دورة حيث تتضمن كل دورة:

• فصل السلاسل (Denaturation) لمدة 30 ثانية على درجة حرارة 94 م.

• التحام البادئ (Annealing) لمدة 30 ثانية على درجة حرارة 60 م.

• استطالة (Extension) لسلسلة الـ DNA الجديدة لمدة 20 ثانية على درجة حرارة 72 م.

III. استطالة نهائية لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 72 م لإنهاء جميع التفاعلات.

تم رسم الخط المنحني القياسي لكل جين انطلاقاً من تمديدات متدرجة للبلازميد المحتوي على قطعة الـ cDNA الخاصة بالجين المدروس. وهذه التمديدات تدرجت من 1 بيكو غرام حتى 0,0001 بيكو غرام. وكان معامل الارتباط أكثر من 0,99 وفعالية الـ PCR أكثر من 92%. تم حساب مستوى التعبير الجيني لكل جين على الشكل التالي: تم اعتماد القيمة الوسطى من قيم المكررات الثلاث لكل عينة، ومن ثم قُسمت هذه القيمة على القيمة الوسطى المقابلة لها للجين RPL19 (Ribosomal Protein L19) والذي يُعدّ جيناً معيارياً مرجعياً لا تتغير كميته خلال الإنضاج.

#### 5. تقانة TUNEL:

تم تطبيق تقانة TUNEL بهدف الكشف عن خلايا الركام المبيضي الميتة نتيجة ظاهرة الأوبوتوز (Apoptosis) أو ما يسمى بظاهرة الموت الخلوي المبرمج، حيث يتم بموجب هذه التقانة الكشف عن تهشم وتقطع الحمض النووي (DNA) والتي تُعدّ العلامة المميزة للموت الخلوي نتيجة ظاهرة الـ Apoptosis. تم تثبيت خلايا الركام المبيضي في محلول البارافورمالدهيد 4% لمدة 20 دقيقة، وبعد عملية الغسيل عدة مرات بمحلول الفوسفات الوافي PBS تم تحضين خلايا الركام المبيضي مع نيكليوتيدات مشعة + أنزيم Tdt من شركة (Promega, France) على درجة حرارة 37 م لمدة 60 دقيقة. وخلال فترة التحضين يقوم الأنزيم Tdt بتحريض عملية ارتباط النيكليوتيدات المشعة على الطرف 3-OH من الـ DNA المهشم (المقطوع) مما يسمح فيما بعد بسهولة كشف الخلية الميتة تحت المجهر، وذلك بملاحظة إشعاع النيكليوتيد

دالاً على تهشم وتقطع الـDNA (موت الخلية). حيث تم تحديد نسبة خلايا الركام المبيضي المصابة بظاهرة الأوبوتوز في 500 خلية بالنسبة لكل أنموذج.

### الجدول 1. البادئات النيكلوتيدية الخاصة بالجينات المدروسة

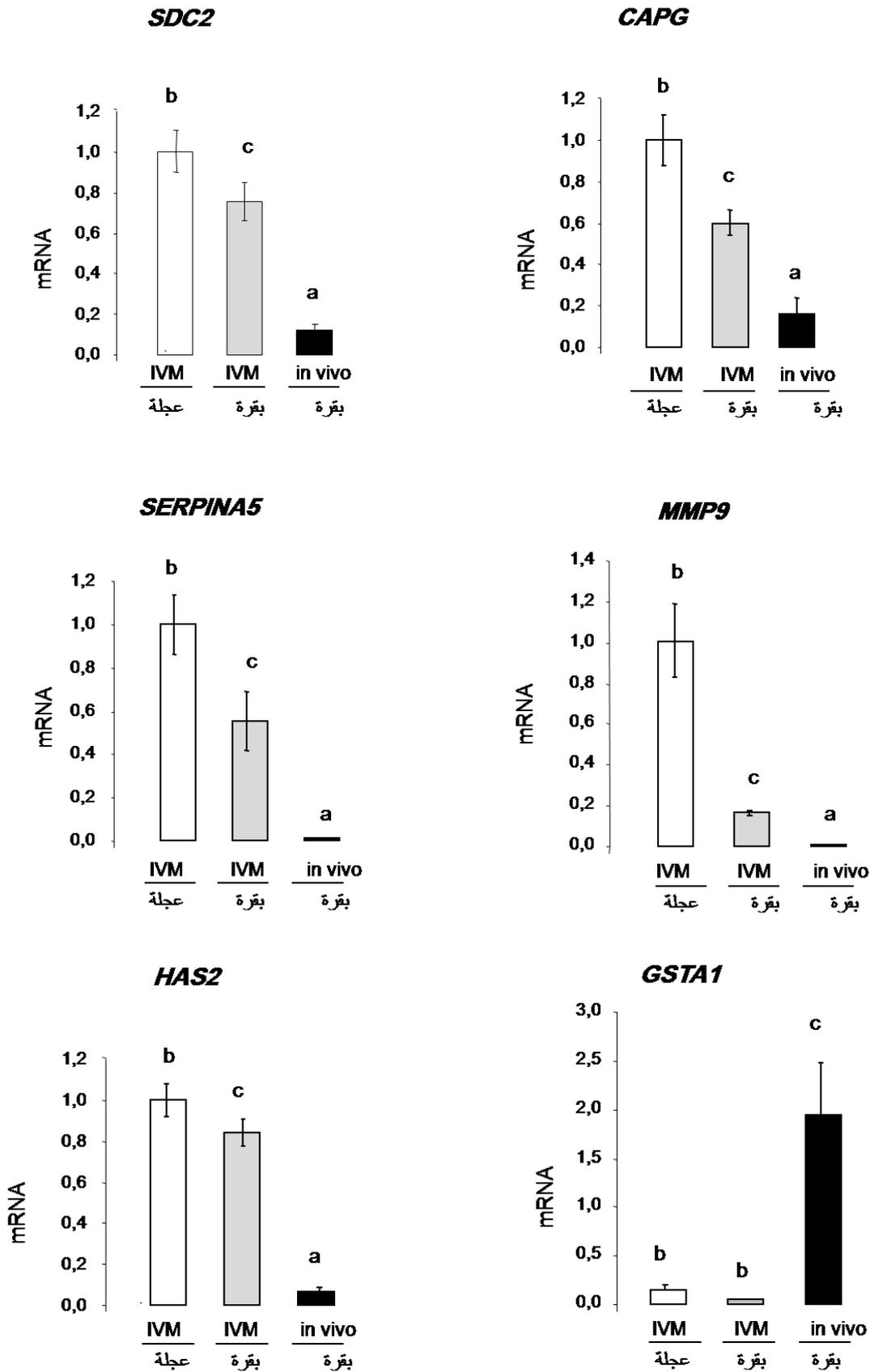
الحجم (Pb)	الرقم	التسلسل النيكلوتيدي (3' → 5') Forward / Reverse	رمز الجين
251	NM_178574	F- ATATTGGCCGTGCACCTCAACA R- TTGAAACTGTCCCAGCTCAGCA	CAPG
203	NM_176646	F- TTCAACCTCAAAGCACCCACG R- TTTTCCACCTGCTCCATTTC	SERPINA5
305	NM_177515	F- AATGGACGTGGCAGAATGGAGT R- GGGCACAGTGGTAAATGCATGA	GSTA1
328	NM_174744	F- CGCTTGCATTTCTTCAAGGCTG R- TCTTCACGTGGAACCTCCAGAA	MMP9
197	NM_174079	F- CGCCACC AAAGGAAACATATCG R- GGGCAAACACTGTTAGGCAGA	HAS2
257	NM_001034788	F- ATGCGATACACCAACAGCAGGA R- GAAACCACAACGCTGAGCAAGA	SDC2

### 6. التحليل الإحصائي:

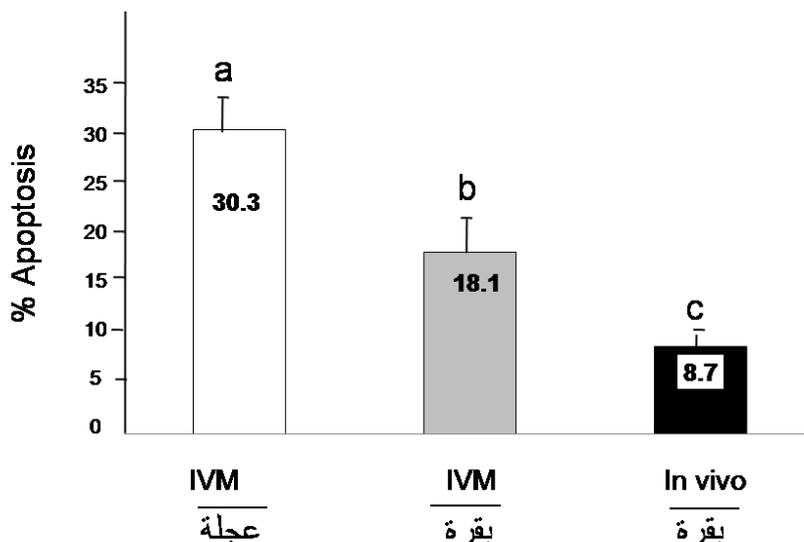
أجري التحليل الإحصائي باستخدام اختبار التباين باتجاه وحيد (ANOVA) One way-Analysis of Variance. تم استخدام 4 عينات cDNA من كل أنموذج من خلايا الركام المبيضي، وتم حساب المتوسط (Mean ± SEM). استخدم برنامج الإحصاء SYSTAT10 واعتبرت القيم التي أقل من  $P < 0.05$  إحصائياً مختلفة معنوياً.

### النتائج والمناقشة

أظهرت الدراسة أن مستوى التعبير الجيني لكل جين من الجينات الخمسة المدروسة (SDC2، SERPINA5، MMP9، CAPG و HAS2) كان معنوياً في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة منخفضة على التطور والمستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر (مستوى التعبير الجيني: الأنموذج 3 < الأنموذج 2 < الأنموذج 1). في حين أن مستوى التعبير الجيني للجين GSTA1 كان منخفضاً وبشكل معنوي ( $p < 0.05$ ) في خلايا الركام المبيضي المحيطة بالبويضات المنضجة مخبرياً (*In vitro*) بالمقارنة مع خلايا الركام المبيضي المحيطة بالبويضات المنضجة داخل جسم الحيوان (*In vivo*) (الشكل 2). كما لوحظ اختلاف معنوي في معدل الأوبوتوز بين النماذج الثلاثة حيث أبدى الأنموذج 3 تفوقاً ( $p < 0.05$ ) في نسبة خلايا الركام المبيضي المصابة بظاهرة الأوبوتوز بالمقارنة مع الأنموذجين 1 و 2 و بلغت القيم 30.3% و 18.1% و 8.7% على التوالي. (الشكل 3)



الشكل 2. مستوى تعبير الجينات المدروسة في خلايا الركام المبيضي بعد الإنضاج في 3 نماذج من قدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب المخبري.



الشكل 3. نسبة الأبوتوز في خلايا الركام المبيضي بعد الإنضاج في 3 نماذج من قدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب المخبري.

تم تحليل مستوى التعبير الجيني في هذه الدراسة لسنة جينات في 3 نماذج من خلايا الركام المبيضي. إن مقدرة البويضة على التطور بعد إخصابها مخبرياً مختلفة بين النماذج الثلاثة سابقة الذكر. حيث أن البويضات المنضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*) أعطت نسبة أعلى (أكثر من 60%) من الأرومات (Blastocyst) بعد إخصابها مخبرياً مقارنةً بالبويضات المستخلصة من أبقار بالغة والمنضجة مخبرياً (*In vitro*). (Lonergan وزملاؤه، 2001؛ Dieleman وزملاؤه، 2002؛ Rizos وزملاؤه، 2002؛ Humblot وزملاؤه، 2005)، في حين أن البويضات المنضجة مخبرياً والمستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر أعطت أدنى نسبة من الأرومات (أقل من 20%) (Revel وزملاؤه، 1995) نتيجة عدم اكتمال نضج البويضة (Mermillod وزملاؤه، 1999؛ Salamone وزملاؤه، 2001) أو ضعف النشاط الاستقلابي للغلوكوز داخل البويضة (Steeves و Gardner، 1999). يوجد ضمن الجينات المدروسة، ثلاثة جينات (HAS2، SDC2 و CAPG) لها دور في تشكيل المشبك خارج خلايا الركام المبيضي (ECM) وجينين اثنين (SERPINA5 و MMP9) لهما دور في تهديم المشبك (ECM). تُعدّ عمليتي تشكيل وتهديم المشبك (ECM) ظاهرة مهمة جداً تخدم حركية وانتقال البويضة (Migration) لحظة الإباضة ضمن القناة التناسلية فضلاً عن أهميتها في تنظيم بنائية وإعادة هيكلة المشبك (Berkholtz وزملاؤه، 2006). حيث أثبتت دراسات عديدة دور المشبك في استمرارية تبادل الإشارات والجزئيات بين خلايا الركام المبيضي والبويضة وبالتالي استكمال تحقيق الإنضاج النهائي للبويضة فضلاً عن دور النشاط الأنزيمي للمشبك في إعطاء المقدرة الإخصابية للنفطة (Tanghe وزملاؤه، 2002؛ Salustri و Russell، 2006). أبدت الجينات سابقة الذكر في هذه الدراسة مستوى تعبير أعلى في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً (*In vitro*) مقارنةً بخلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*). علماً أن هذه الجينات لم يُدرس تعبيرها في خلايا الركام المبيضي من قبل. من الناحية المورفولوجية، تبدي خلايا الركام المبيضي انتشاراً (Expansion) أقل بعد الإنضاج المخبري (*In vitro*) مقارنةً بمستوى الانتشار بعد الإنضاج داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*). لذا فإن مستوى التعبير العالي للجينات السابقة بعد الإنضاج المخبري (*In vitro*) قد يعكس حالة عدم توازن بين عملية تشكيل المشبك وعملية تهديمه مما قد يؤثر سلباً في درجة انتشار خلايا الركام المبيضي وبالتالي في وظائف المشبك (ECM) ودوره في إخصاب وتطور البويضة. وقد يعزى مستوى التعبير العالي للجينات السابقة عند الإنضاج المخبري (*In vitro*) إلى غياب إشارات خلوية تتواجد عادة ضمن البيئة الجريبية الطبيعية والتي من شأنها ضبط وتنظيم مستوى تعبير هذه الجينات.

يُعدّ الجين SERPINA5 مسؤولاً عن تركيب البروتين (Serpine Peptidase Inhibitor)، الذي يتواجد في أنسجة وسوائل الجسم المختلفة حيث لوحظ تواجده في بلازما السائل المنوي وفي السائل الجريبي عند الإنسان (España وزملاؤه، 2007). وهو يُساهم في تهديم المشبك خارج خلوي (ECM)، وفي تخثر الدم والتنام الجروح والخصوبة (Suzuki، 2008؛ Meijers و Herwald، 2011). أما الجين MMP9، فينتهي إلى عائلة (MMPs Matrix Metalloproteinase -) والتي لها وظيفة تهديمية لمكونات المشبك خارج خلوي (ECM) وتلعب دوراً أساسياً في تحطم

جدار الجريب لحظة الإباضة (Tsafriri، 1995) فضلاً عن دورها في إنتاج الهرمونات الستيروئيدية في الجريبات المبيضية (Carbajal وزملاؤه، 2011). أما الجين CAPG، فيشفر البروتين Gelsolin-like actin regulatory (protein) الذي يُسهم في تغيير هيكلية ألياف الأكتين داخل الخلية (Silacci وزملاؤه، 2004). في حين يُعدّ الجين SDC2 مسؤولاً عن تركيب بروتين غشائي (Syndecan-2) يشكل صلة الوصل ما بين ألياف الأكتين داخل الخلية ومكونات المشبك خارج خلايا الركام المبيضي أما الجين HAS2، فهو يشفر الأنزيم (Hyaluronan Synthase 2) المسؤول عن تركيب الحمض (Hyaluronic acid) والذي يُعدّ المكون الأساس للمشبك خارج خلوي ECM (Schoenfelder وEinspanier، 2003؛ Russell وRobker، 2007). أثبتت Salhab وزملاؤه (2010) أن مستوى التعبير العالي للجين HAS2 ترافق مع مقدرة عالية للبويضة على التطور عند الأبقار. حيث لاحظ أن مستوى التعبير كان أعلى وبشكل معنوي في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات تطورت مخبرياً إلى مرحلة الأرومات مقارنة بالبويضات التي لم تتطور إلى هذه المرحلة. وفي دراسة أخرى على خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة (*In vivo*) لوحظ أن مستوى التعبير العالي للجين HAS2 ترافق مع معدل أعلى للتطور الجنيني (McKenzie وزملاؤه، 2004). لوحظ في هذه الدراسة أن مستوى التعبير عن الجينات السابقة كان أعلى في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات ذات مقدرة منخفضة على التطور بعد الإخصاب المخبري. حيث أن مستوى التعبير كان أعلى في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً (*In vitro*)، مقارنةً بخلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*). وكان معنوياً ( $p < 0.05$ ) في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً ومستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر. ترافق مستوى التعبير العالي للجينات السابقة مع معدل أبوتوز (موت خلوي مبرمج) مرتفع في خلايا الركام المبيضي حيث لوحظ أن معدل الأبوتوز كان أعلى في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً (*In vitro*) مقارنةً بخلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*). وكان عالياً (30.3%) في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً ومستخلصة من عجلات بعمر 5 إلى 6 أشهر. إن ارتفاع معدل الأبوتوز في خلايا الركام المبيضي بعد الإنضاج المخبري (*In vitro*) قد يعطي تفسيراً لانخفاض مقدرة البويضة على التطور بعد الإخصاب. في حين أن ارتفاع مستوى تعبير الجينات السابقة قد يكون انعكاساً للمستوى المرتفع للأبوتوز. حيث أن المستوى المرتفع للأبوتوز في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج كان يرافقه دوماً نسبة أقل من الأرومات (Blastocyst) (Ikeda وزملاؤه، 2006؛ Balboula وزملاؤه، 2010؛ Salhab وزملاؤه، 2011). أكد Szoltys وزملاؤه (2000) أن ظاهرة الأبوتوز هي ظاهرة مختلفة ناتجة عن الظروف الصناعية الخاصة بالإنضاج المخبري نتيجة عدم ملاحظته لظاهرة الأبوتوز في خلايا الركام المبيضي قبل ساعة من حدوث الإباضة لدى الجرذان. كما أن معدل الأبوتوز في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة في الجسم (*In vivo*) كانت أقل من 3% في دراسة أجريت على بويضات المرأة (Acosta وزملاؤه، 2009) كما أثبت Ikeda وزملاؤه (2003) أن نسبة الخلايا الركامية المصابة بالأبوتوز ازدادت بشكل معنوي بعد 12 ساعة من الإنضاج المخبري ووصلت إلى مستوى أعظمي في نهاية الإنضاج (بعد 24 ساعة). كما أن التعبير الجيني لبعض الجينات التي لها دور في ظاهرة الأبوتوز (كالجينين BAX و CLU) تم إثباتها في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج المخبري (Salhab وزملاؤه، 2011). يمكن أن تحدث ظاهرة الأبوتوز (Apoptosis) كنتيجة لظاهرة الإجهاد التأكسدي (Stress Oxydatif)، والتي ينتج عنها تراكم الجذور الحرة والتي بدورها تقوم بتهشيم وتقطيع الحمض النووي DNA. تمت ملاحظة ظاهرة الإجهاد التأكسدي خلال الإنضاج المخبري من خلال نشاط بعض الأنزيمات المضادة للأكسدة (Superoxyde Dismutase, Catalase,....) في البويضة، كذلك في خلايا الركام المبيضي (Cetica وزملاؤه، 2001). إن التعبير الجيني للجين (PRDX6) المسؤول عن إنتاج الأنزيم (6 Peroxiredoxine) المضاد للأكسدة تم إثباته في خلايا الركام المبيضي البقرية في نهاية الإنضاج المخبري (Leyens وزملاؤه، 2004). إن مستوى التعبير الجيني للجين (Glutathione S-transferase A1) GSTA1 المعروف بدوره في إبطال فعل الجذور الحرة الأوكسجينية انخفض بشكل تدريجي خلال الإنضاج المخبري في خلايا الركام المبيضي وبشكل خاص ومعنوي جداً بعد 10 ساعات من الإنضاج المخبري (Salhab وزملاؤه، 2011). أما في هذه الدراسة فقد لوحظ أن مستوى تعبيره كان أعلى في خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة داخل جسم الحيوان الحي (*In vivo*) بالمقارنة مع خلايا الركام المبيضي المحيطة ببويضات منضجة مخبرياً (*In vitro*) مما قد يعطي تفسيراً لتراجع المقدرة التطورية للبويضة المنضجة مخبرياً.

لوحظ في هذه الدراسة أن مستوى التعبير العالي للجينات (CAPG و HAS2، SDC2، SERPINA5، MMP9) ترافق مع ارتفاع في معدل الأوبوتوز في خلايا الركام المبيضي، وقدرة منخفضة للبيضة على التطور بعد الإخصاب على عكس الجين GSTA1 الذي ترافق مستوى تعبيره العالي مع معدل منخفض من الأوبوتوز وقدرة عالية للبيضة على التطور بعد الإخصاب المخبري.

### الاستنتاجات

يُستنتج من هذه الدراسة أن مستوى التعبير العالي للجينات (CAPG و HAS2، SDC2، SERPINA5، MMP9) وانخفاض مستوى تعبير الجين (GSTA1) بعد الإنضاج المخبري يمكن أن يشكل انعكاساً لظواهر الأوبوتوز والإجهاد التأكسدي الملاحظة في خلايا الركام المبيضي خلال الإنضاج المخبري. كما أن معدل الأوبوتوز العالي في خلايا الركام المبيضي له تأثير سلبي في قدرة البيضة على التطور بعد الإخصاب نتيجة حرمان البيضة من الدور الفعال الذي تمارسه خلايا الركام المبيضي في تحقيق إنضاجها الأمثل وإعطائها المقدرة العالية على التطور. لا تزال تحتاج الآلية الجزيئية لإنضاج البويضات للكثير من الدراسات والأبحاث بهدف الفهم الدقيق لمجريات الإنضاج والعلاقة التبادلية المهمة بين البيضة وخلايا الركام المبيضي والعوامل المؤثرة سلباً على سير تقانة الإنضاج المخبري للبيوضات، مما يفسح المجال لتحسين ظروف تطبيق هذه التقانة باستخدام أوساط إنضاج جديدة تؤدي في نهاية المطاف إلى رفع مردودية الأرومات Blastocysts من الإخصاب والتطور المخبري، إذ لا تزال نسبة الأرومات الناتجة عن الإخصاب والتطور المخبري للبيوضات المنضجة مخبرياً (*In vitro*) أقل مما هي عليه في حال الإخصاب والتطور المخبري للبيوضات المنضجة داخل جسم البقرة (*In vivo*). كما أن إجراء دراسات جينية موسعة ومعقدة تعتمد على مبدأ تحليل ومقارنة مستوى التعبير الجيني (Gene Expression) لجينات معينة بين نماذج مختلفة من إنضاج البويضات (بويضات منضجة مخبرياً *In vitro* وبويضات منضجة داخل جسم البقرة الحية *In vivo*) قد يسهم في تطوير هذه التقانة وتعدد آفاق تطبيقاتها ولاسيما في دراسة وتطوير تقانات تناسلية أخرى كالإستنساخ وإنتاج حيوانات معدلة وراثياً وبالتالي الحل الجذري لمشاكل الخصوبة الملاحظة في قطعان الأبقار في معظم بلدان العالم.

### المراجع

- Acosta, E., O. Pena, F. Naftolin, J. Avila and A. Palumbo. 2009. Angiotensin II induces apoptosis in human mural granulosa-lutein cells, but not in cumulus cells. *Fertil Steril*, **91**(5):1984-1989.
- Auclair, S., R. Uzbekov, S. Elis, L. Sanchez, I. Kireev, L. Lardic, R. Dalbies-Tran and S. Uzbekova. 2013. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **67**: 599–613.
- Balboula, A. Z., K. Yamanaka, M. Sakatani, A.O. Hegab, S.M. Zaabel and M. Takahashi. 2010. Cathepsin B activity is related to the quality of bovine cumulus oocyte complexes and its inhibition can improve their developmental competence. *Mol Reprod Dev*, **77**(5): 439-448.
- Berkholtz, C. B., L.D. Shea and T.K. Woodruff. 2006. Extracellular matrix functions in follicle maturation. *Semin Reprod Med*, **24**: 262-269.
- Buccione, R., B.C. Vanderhyden, P.J. Caron and J.J. Eppig. 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*, **138**: 16-25.
- Carbajal, L., A. Biswas, L.M. Niswander, H. Prizant and S.R. Hammes. 2011. GPCR/EGFR cross talk is conserved in gonadal and adrenal steroidogenesis but is uniquely regulated by matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ovary. *Mol Endocrinol*, **25**(6):1055-1065.

- **Cetica, P. D., L.N. Pintos, G.C. Dalvit and M.T. Beconi.** 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, **51**: 57-64.
- **De Matos, D. G., C.C. Furnus and D.F. Moses.** 1997. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, **57**: 1420-1425.
- **Dieleman, S. J., P.J. Hendriksen, D. Viuff, P.D. Thomsen, P. Hyttel, H.M. Knijn, C. Wrenzycki, T.A. Kruip, H. Niemann, B.M. Gadella, M.M. Bevers and P.L. Vos.** 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. *Theriogenology*, **57**: 5-20.
- **Donnay, I., P. Auquier, S. Kaidi, C. Carolan, P. Lonergan, P. Mermillod and A. Massip.** 1998. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci*, **52**: 93-104.
- **Espana, F., S. Navarro, P. Medina, E. Zorio and A. Estelles.** 2007. The role of protein C inhibitor in human reproduction. *Semin Thromb Hemost*, **33**(1):41-45.
- **Fair, T.** 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, **78**: 203-216.
- **Furnus, C. C., D.G. de Matos and D.F. Moses.** 1998. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol. Reprod. Dev*, **51**: 76–83.
- **Gosden, R. G.** 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **186**: 149-153.
- **Guyader-Joly, C., S. Ponchon, J. Thuard, M. Durand, M. Nibart, B. Marquant-Leguienne and P. Humblot.** 1997. Effects of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology*, **47**, 157P.
- **Humblot, P., P. Holm, P. Lonergan, C. Wrenzycki, A.S. Lequarre, C.G. Joly, D. Herrmann, A. Lopes, D. Rizos, H. Niemann and H. Callesen.** 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, **63**(4):1149-1166.
- **Ikeda, S., H. Imai and M. Yamada.** 2003. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction*, **125**: 369-376.
- **Ikeda, S., K. Saeki, H. Imai and M. Yamada.** 2006. Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects. *Reproduction*, **132**(4):549-557.
- **Kawamura, K., J. Kumagai, S. Sudo, S.Y. Chun, M. Pisarska, H. Morita, J. Toppari, P. Fu, J.D. Wade, R.A. Bathgate and A.J. Hsueh.** 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 7323- 7328.
- **Kidder, G. M. and A.A. Mhawi.** 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, **123**: 613-620.
- **Leibfried-Rutledge, M. L., E.S. Critser, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First.** 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, **36**:376–383.

- **Leyens, G., B. Verhaeghe, M. Landtmeters, J. Marchandise, B. Knoops and I. Donnay.** 2004. Peroxiredoxin 6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation: role of intercellular communication. *Biol Reprod*, **71**: 1646-1651.
- **Lonergan, P., D. Rizos, F. Ward and M.P. Boland.** 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*, **41**(5):427-437.
- **Lonergan, P. and T. Fair.** 2008. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, **69**:17–22.
- **McKenzie, L. J., S.A. Pangas, S.A. Carson, E. Kovanci, P. Cisneros, J.E. Buster, P. Amato and M.M. Matzuk.** 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, **19**: 2869- 2874.
- **Meijers, J. C. and H. Herwald.** 2011. Protein C inhibitor. *Semin Thromb Hemost*, **37**(4):349-354.
- **Mermillod, P., B. Oussaid and Y. Cognie.** 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, **54**: 449-460.
- **Revel, F., P. Mermillod, N. Peynot, J.P. Renard and Y. Heyman.** 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil*, **103**: 115-120.
- **Richards, J. S.** 2005. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol*, **234**: 75-79.
- **Richard, F.J.** 2007. Regulation of meiotic maturation. *J Anim Sci*, **85**, E4-6.
- **Rizos, D., F. Ward, P. Duffy, M.P. Boland and P. Lonergan.** 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, **61**: 234-248.
- **Russell, D. L. and A. Salustri.** 2006. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med*, **24**: 217-227.
- **Russell, D. L. and R.L. Robker.** 2007. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*, **13**: 289-312.
- **Salamone, D. F., P. Damiani, R.A. Fissore, J.M. Robl and R.T. Duby.** 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod*, **64**: 1761-1768.
- **Salhab, M., P. Papillier, C. Perreau, C. Guyader-Joly, J. Dupont, P. Mermillod and S. Uzbekova.** 2010. Thymosins beta-4 and beta-10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation. *Reprod Fertil Dev*, **22**(8):1206-1221.
- **Salhab, M., L. Tosca, C. Cabau, P. Papillier, C. Perreau, J. Dupont, P. Mermillod and S. Uzbekova.** 2011. Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology*, **75**(1):90-104.

- **Schoenfelder, M. and R. Einspanier.** 2003. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod*, **69**: 269-277.
- **Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H.L. Yin and D. Hayoz.** 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, **61**(19-20):2614-2623.
- **Steeves, T. E. and D.K. Gardner.** 1999. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Mol Reprod Dev*, **54**: 92-101.
- **Suzuki, K.** 2008. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost*, **6**: 2017-2026.
- **Szoltys, M., Z. Tabarowski and A. Pawlik.** 2000. Apoptosis of postovulatory cumulus granulosa cells of the rat. *Anat Embryol (Berl)* **202**: 523-529.
- **Tanghe, S., A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn and A. de Kruif.** 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*, **61**: 414-424.
- **Tatemoto, H., N. Sakurai and N. Muto.** 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod*, **63**: 805-810.
- **Tsafiriri, A.** 1995. Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion. *Adv Exp Med Biol*, **377**: 121-140.
- **Van Soom, A., S. Tanghe, I. De Pauw, D. Maes and A. De Kruif.** 2002. Function of the cumulus oophorus before and during Mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim* **37**(3): 144-151.

N° Ref: 536