

Гени кумулюсних клітин як потенційні біомаркери для діагностики стану розвитку ооцитів та ембріонів

О.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ, Україна, Київ; e-mail: elena-shepel@ukr.net

В цьому огляді представлені сучасні дані про гени, що є потенційними біомаркерами для селекції ооцитів та ембріонів у програмі екстракорпорального запліднення (ЕКЗ). Морфологічна оцінка, яка ґрунтується на таких показниках, як швидкість росту, раннє дроблення, ступінь фрагментації, формування бластоцисти, є суб'єктивною і не дає точного прогнозу розвитку ембріона. Потрібні об'єктивні, швидкі та доступні тести для визначення потенціалу розвитку статевих клітин, які б збільшили шанс успішної вагітності та знизили кількість ембріонів для підсадки. З виникненням нових технологій у кумулюсних клітинах виявлені гени, які характеризують здатність ооцитів до мейотичного дозрівання, фертилізації та ембріонального розвитку і можуть бути використані під час ЕКЗ для відбору ооцита або ембріона з більш високим потенціалом імплантації. Серед них циклооксигеназа 2 (ЦОГ2), гремлін 1 (ГРЕМ1) і гіалуранансинтаза 2 (ГС2).

Ключові слова: якість ооцитів; експресія генів у кумулюсних клітинах; циклооксигеназа 2; гремлін 1; гіалуранансинтаза 2.

На фоні збереження тенденції до скорочення населення особливо гострою є проблема безпліддя. Важливу роль у досягненні вагітності в процесі *in vitro* запліднення і перенесення ембріонів відіграє вибір найбільш перспективного клітинного матеріалу (ооцитів, зигот, ембріонів). Нині цей відбір ґрунтується на таких морфологічних показниках, як швидкість росту, раннє дроблення, ступінь фрагментації, формування бластоцисти [1–4]. Однак прогностична можливість цього підходу обмежена, оскільки він є суб'єктивним і недостатньо точним [1, 2, 4–6]. Морфологічний зовнішній вигляд ооцита і ембріона не дає адекватного прогнозу їх розвитку. У 70-80% морфологічно аномальних ембріонів виявлені генетичні порушення, тоді у 40% ембріонів з нормальною морфологією також виявлені хромосомні аберації [3]. Таким чином, для підтримки високих показників вагітності здійснюють трансфер 3-4 ембріонів на

ранніх стадіях розвитку або 2-3 бластоцист. Однак це часто призводить до багатоплідної вагітності, яка пов'язана з підвищеною захворюваністю плода і його смертністю [3, 6, 7].

Трансфер одиничного ембріона стає все більш поширеним при екстракорпоральному заплідненні (ЕКЗ), оскільки означає редукцію багатоплідної вагітності. Відбір ембріонів з більш високим потенціалом імплантації – найважливіше завдання у допоміжних репродуктивних технологіях [1, 6, 8]. Таким чином, будь-який об'єктивний метод оцінки компетентності ооцита і потенціалу імплантації й розвитку ембріона збільшив би успішність допоміжних репродуктивних технологій [2, 3]. З їх виникненням виявлені нові біомаркери, які можуть бути використані самостійно або у комбінації з морфологічними критеріями при ЕКЗ для селекції ооцита і / або ембріона [1, 4–6, 9, 10].

Відомо, що преовуляторні фолікули мі-

стять субпопуляції гранулярних клітин, включаючи пристінкові і кумулюсні (КК). Перші вистилають стінку фолікула, знаходяться в тісній близькості до текальних клітин і експресують гени, потрібні для фолікулярного розриву. КК залишаються пов'язаними з ооцитом протягом фолікулярного розвитку та овуляції. Ооцити і КК ростуть і розвиваються строго координовано і взаємозалежно. Вони є медіаторами розвитку ооцита і фертилізації, а, ооцит у свою чергу регулює розвиток кумулюса [1, 3, 8, 9, 11]. У мишей кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси (КОКК) відіграють центральну роль в овуляції, і здатність ооцитів підтримувати експресію генів у кумулюсі пов'язана з компетентністю ооцитів до розвитку [2, 11, 12]. Для вивчення зв'язку між профілем генної експресії в КК та компетентністю ооцитів, якістю ембріонів і результатом вагітності застосовують технології на основі ДНК-мікрочіпів, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) в реальному часі [2, 6, 12], генетичну діагностику за допомогою порівняльної геномної гібридизації, одонуклеотидний поліморфізм генів. Результатом аналізу геномних і транскриптомних даних є визначення генів, які диференційно експресуються в різних експериментальних умовах [6]. Згідно з сучасною концепцією, КК можуть бути надійною моделлю для з'ясування якості ооцита та ефективності протоколу оваріальної гіперстимуляції і опосередковано прогнозувати анеуплоїдію ооцитів, ембріональний розвиток і результат вагітності [2, 8, 13]. Крім того, аналіз генної експресії в КК може допомогти зрозуміти механізми, які знижують репродуктивну здатність [4, 14]. Нині широко використовується ПЛР в реальному часі як чутливий і ефективний метод для кількісного визначення окремих транскриптів. З іншого боку, використання ДНК-мікрочіпів для визначення профілю експресії в масштабі геному відкрило нові перспективи для дослідників, даючи можливість ідентифікувати транскриптомні сигнатури життєздатних ембріонів. Однак за-

стосування мікрочіпів потребує спеціалізованого обладнання і підготовленого персоналу, що може коштувати непомірно дорого і не зможе давати результати достатньо швидко, щоб використовувати інформацію в клініці в обмежений проміжок часу, прийнятний для ембріонального трансферу. Тому навряд чи для КК від окремих ооцитів доцільно застосовувати такий аналіз, щоб отримати повний профіль транскриптів. Замість цього обмежене число генів, які були ідентифіковані у дослідженнях з використанням мікрочіпів як біомаркерів життєздатності ооцитів та ембріонів, може бути оцінено за допомогою ПЛР у реальному часі. Але в цьому разі важливо встановити чи необхідне визначення абсолютної кількості або лабораторія просто відбере ембріони з найвищою і найнижчою експресією і скільки генів краще досліджувати, оскільки визначення продукту одиничного гена навряд чи передбачить результат [4, 6].

Взаємодія КК і ооцита відбувається через щільні контакти [6, 15] за допомогою паракринних сигнальних факторів. Ці міжклітинні канали забезпечують трансфер малих молекул і сприяють обміну метаболітів глюкози та іонів між ооцитом і КК [1, 4]. Генетичні модуляції в КК (як і в гранулярних клітинах) можуть призвести до репродуктивної недостатності [14]. Аналіз КК має переваги порівняно з прямою оцінкою ооцита. Ооцити на стадії метафази 2 є делікатними клітинами, які можуть бути легко пошкоджені морфологічними дослідженнями [1, 15]. КК, як правило, не використовуються під час класичного ЕКЗ та інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в яйцеклітину. Ці клітини легко доступні і численні [2], їх відділяють від ооцитів безпосередньо після виділення, тому такий аналіз не заповдіє ніякого додаткового стресу ооцитам [1, 4, 15, 16]. Ізольовані КК - це відносно гомогенна фракція, практично не забруднена іншими клітинами. У той час як більшість ізольованих гранулярних клітин містять домішки текальних і кров'яних клітин, що пояснюється методами їх отримання. Все

вищезазначене свідчить про те, що кумулює є зручним матеріалом для неінвазивного методу визначення потенціалу розвитку статевих клітин. Проте слід враховувати, що збір КК може бути пов'язаний з додатковим часом для кожного ооцита за межами інкубатора. Крім того, для підтримки ідентичності кожного зразка КК відносно певного ембріона потрібна індивідуальна культура, а це – додаткова робота і фінансові витрати у лабораторії. Ці аспекти також повинні бути вивчені і проаналізовано співвідношення ризиків і вигоди до реалізації такого підходу у клініці [6].

Серед генів, які експресуються в КК і активно вивчаються, можна виділити циклооксигеназу 2 (ЦОГ2), гремлін 1 (ГРЕМ1) і гіалуронансинтазу 2 (ГС2). Встановлено, що всі вони залучені в фолікулярний розвиток, зокрема, кумулюсне розширення [16–20], що ініціюється хвилею лютеїнізуючого гормону і відіграє надзвичайно важливу роль під час розвитку ооцита, овуляції і фертилізації (тобто сприяє ефективному заплідненню, успішному відриву КОКК від фолікулярної стінки і наступної овуляції, їх транспорту через яйцепровід і підтримці життєздатності ооцита в матковій трубі) [4, 17–19, 21]. Ооцити, виділені із фолікулів з порушенням кумулюсним розширенням, мають обмежений потенціал для імплантації [6]. Альтерації в кумулюсному розширенні можуть відбуватися з віком у жінок і відповідати за їх репродуктивну недостатність як безпосередня причина або як відображення зниження функціональної і структурної якості ооцитів [3]. Враховуючи залучення цих генів у процес кумулюсного розширення, можна припустити, що вони будуть досить надійними маркерами мейотичного дозрівання і якості ооцита, фертилізації і раннього ембріонального розвитку [21].

У пацієнтів, які проходили процедуру ЕКЗ або інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда в яйцеклітину, за допомогою кількісної ПЛР встановлено, що експресія ЦОГ2 та ГС2 була вище в 6 разів, а ГРЕМ1 –

в 15 разів в КК, відокремлених від ооцитів, що дали початок ембріонам високої якості [3]. Показано, що профіль експресії ЦОГ2 і ГС2 в КК мишей був подібний до такого у людини: нижчий у клітин, що були пов'язані з ооцитами із слабким потенціалом розвитку [22]. Наведені результати узгоджуються з даними, отриманими в інших дослідженнях [23]. Значна кореляція була виявлена між ембріональним розвитком на 3-тю добу та експресією ГРЕМ1 [24, 25], а також, проте меншою мірою, між якістю ооцитів та ЦОГ2 і ГС2 [24]. Виявлений взаємозв'язок вмісту мРНК для цих генів і видом гонадотропіну, що використовувався для оваріальної стимуляції [15, 24, 25]. Показано залежність експресії ГС2 в КК від стадії мейотичного дозрівання. Встановлено, що середній вміст мРНК для ГС2 значно вище в КК, пов'язаних з ооцитами, які були запліднені і розвилися у життєздатні бластоцисти [26]. Таким чином, рівень експресії цих генів корелює з морфологічними і фізіологічними характеристиками статевих клітин [3, 19]. Водночас є результати, які демонструють відсутність суттєвих відмінностей між експресією генів, зокрема ЦОГ2, у КК та ГК, які оточували запліднені та незапліднені яйцеклітини, а також між успішно й неуспішно імплантованими ембріонами. Припускають, що причинами розбіжності у результатах можуть бути схема дослідження, протокол стимуляції, фізичний стан пацієнта [8].

Згідно з останніми дослідженнями, у жінок підвищений рівень експресії ГРЕМ1 в КК позитивно корелює з дозріванням ооцитів [23, 27], супроводжується правильним формуванням бластоцисти, високою якістю ембріонів і незначним покращенням показника вагітності [14]. Взаємозалежність якості ооцита і експресії ГРЕМ1 ще треба досліджувати. Але відомо, що ГРЕМ1 – це ген, індукований фактором росту диференціювання-9 (РФД9), який продукується безпосередньо ооцитом. Ще одним таким фактором є кістковий морфогенетичний білок

(БМП). Припускають, що ГРЕМ1 модулює перехресні сигнальні шляхи між РФД9- і БМП-сигналізацією [14, 15], яка потрібна під час фолікулярного розвитку. ГРЕМ1 селективно інгібує БМП-сигналізацію, не порушуючи РФД9-сигналізацію. Тобто ГРЕМ1 є антагоністом БМП, і останні дані показують, що він залучений у внутрішньофолікулярний БМП-сигнальний шлях, який негативно регулює продукцію андрогенів текальними клітинами (як базальну, так і індуковану лютеїнізуючим гормоном) [15]. З одного боку, підвищений вміст андрогенів може сприяти розвитку полікістозу яєчників. З іншого, андрогени потрібні для нормальної оваріальної функції і фертильності [28]. Припускають, що селективне інгібування сигналізації сприяє лютеїнізації пристінкових ГК, підтримуючи при цьому кумулюсне розширення. Якщо це так, то безперервна експресія ГРЕМ1 в КК повинна представляти зрілий ооцит і прогнозує покращений розвиток ембріона [3, 25]. Зниження ж експресії ГРЕМ1 може вказувати на пошкоджену ооцитарну функцію і кумулюсне розширення і, відповідно, свідчить про слабку репродуктивну здатність. Спостерігаються значні варіації експресії ГРЕМ1 у пацієнтів, а, враховуючи те, що нині обмежені знання про функціонування цих генів в кумулюсних клітинах, складно повністю зрозуміти причини їх біологічної кореляції [14].

ГС2 експресується КК у відповідь на спільний ефект фолікулостимулювального гормону і РФД9, як фермент, який відповідає за синтез гіалуронової кислоти, одного з головних компонентів позаклітинного матриксу [1, 15], утворення якого потрібне для кумулюсного розширення у відповідь на овуляторний викид лютеотропіну. Отже, зниження експресії ГС2 порушує синтез гіалуронової кислоти, і відповідно, формування матриксу та пошкоджує процес овуляції. Значний вміст ГС2 транскриптів наявний в ооцитах з субоптимальною морфологією, які розвинулися в ембріони високої якості на відміну

від ооцитів, ізольованих від КК, і ооцитів, що зазнали невдачі при заплідненні [15, 23].

ЦОГ2 запускає сигналізацію простагландинів (ПГ) у яєчнику, які синтезуються з арахідонової кислоти [29]. ПГ є загальними медіаторами запальних реакцій, включаючи й овуляцію. З двох ізоформ циклооксигенази розрізняють конститутивну - ЦОГ1 (функціонує постійно і виконує фізіологічно важливі функції) та індукбельну - ЦОГ2 (функціонує в певних умовах, наприклад, при запаленні). В яєчнику ЦОГ1 конститутивно експресується в текальних клітинах, а ЦОГ2 індукується лютеотропіном або хоріонічним гонадотропіном в пристінкових ГК і КК. Встановлено регуляторний вплив РФД9 на активацію ЦОГ2 в КК [1, 3]. Самиці мишей нульові (нокаутні) за ЦОГ2 або по ПГЕ2 рецептору EP2 є безплідними, у них пошкоджено кумулюсне розширення і порушений процес овуляції. ПГ відіграють надзвичайно важливу внутрішньофолікулярну роль у регуляції генів, залучених у формування матриксу і кумулюсне розширення [15]. ЦОГ2 пов'язаний із стабілізацією матриксу під час кумулюсного розширення [22]. Виявлено кореляцію між експресією ЦОГ2 в КК та дозріванням ооцитів [1, 23]. Хоча механізми, за допомогою яких ПГ опосередковують кумулюсне розширення і подальшу овуляцію, до кінця не зрозумілі.

Припускають, що в механізм може бути задіяний білок TSG6 (ФНПа-стимульований ген 6), який є мішенню дії ПГ [30, 31], оскільки у мишей, нокаутних по ЦОГ2 і EP2 експресія мРНК TSG6 (але не ГС2) знижується. Ланцюг може бути таким: в преовуляторному фолікулі хвиля лютеїнізуючого гормону індукує мРНК ЦОГ2 і ГС2. ЦОГ2 відповідає за синтез ПГ, а ті в свою чергу за експресію мРНК TSG6; ГС2 забезпечує синтез ГК. Остання пов'язує білок TSG6. А далі запускається процес формування матриксу і кумулюсне розширення [30].

Таким чином, порушення експресії кожного з цих трьох генів призводить до пошкодження кумулюсного розширення та форму-

вання матриксу і, як наслідок, – порушення овуляції. Відповідно, аналіз їх експресії в КК може бути непрямую ознакою чи показником мікрооточення, в якому дозріває ооцит, і допомогти ембріологові краще оцінити якість ембріона [2]. В основі порушення експресії ЦОГ2, ГРЕМ1 або ГС2 можуть бути гормональні зміни, які супроводжують ту чи іншу патологію, ушкодження продукції РФД9 [14], який регулює їх активацію.

Загалом точна природа і різноманітність ооцит-КК сигнальних молекул є складною і динамічною, але вони мають величезний вплив на якість ооцитів [1]. Врешті решт, численні гени в КК могли б бути потенційними маркерами для діагностики здатності розвитку ооцитів та ембріонів [3, 5, 8, 32, 33]. Треба визначити профіль їх експресії, важливий для селекції ембріона, провести дослідження, щоб виявити зв'язок між зміненою експресією мРНК в КК і розвитком ембріона, його життєздатністю. Однак слід визнати, що нині не існує загально визнаних біомаркерів. Причиною розходження в результатах можуть бути різні фактори, що впливають на експресію генів: план дослідження, протокол стимуляції та фізичні дані пацієнта, етіологія, лікування, вік тощо [4, 8, 32]. Безумовно, застосування передових транскриптомних і біоінформативних інструментів у лабораторії ЕКЗ є доцільним, а початкові висновки обнадійливими, однак залишаються питання, які треба вирішити перед тим, як вводити ці технології в клінічну практику. Важливим етапом також є проведення рандомізованих контрольованих досліджень, щоб підтвердити клінічний ефект від застосування генів-біомаркерів.

Розвиток неінвазивних методів оцінки ооцитів на основі транскриптомного дослідження фолікулярних соматичних клітин має не тільки клінічне, а й наукове значення. Застосування неінвазивного аналізу КК допоможе поглибити розуміння взаємозалежності зовнішніх і внутрішніх факторів, що впливають на фолікуло- і оогенез, з'ясувати складні

молекулярні механізми, що регулюють розвиток ооцитів та ембріонів. Ці знання у свою чергу можуть бути використані в клініці для вдосконалення протоколів *in vitro* дозрівання ооцитів або індивідуалізації методики контрольованої оваріальної стимуляції.

Е.А.Шепель, Т.Ю.Вознесенская, Т.В.Блашків, Р.И.Янчий

ГЕНЫ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАЗВИТИЯ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ

В этом обзоре представлены современные данные о генах, которые являются потенциальными биомаркерами для селекции ооцитов и эмбрионов в программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Морфологическая оценка, основанная на таких показателях, как скорость роста, раннее дробление, степень фрагментации, формирование бластоцисты, является субъективной и не дает точного прогноза развития эмбриона. Необходимы объективные, быстрые и доступные тесты для определения потенциала развития половых клеток, которые бы увеличили шанс успешной беременности и снизили количество эмбрионов для подсадки. С возникновением новых технологий в кумулюсных клетках обнаружены гены, характеризующие способность ооцитов к мейотическому созреванию, фертилизации и эмбриональному развитию и могут быть использованы при ЭКО для отбора ооцита или эмбриона с более высоким потенциалом имплантации. Среди них циклооксигеназа 2 (ЦОГ2), гремлин 1 (ГРЕМ1) и гиалуронансинтаза 2 (ГС2).

Ключевые слова: качество ооцитов; экспрессия генов в кумулюсных клетках; циклооксигеназа 2; гремлин 1; гиалуронансинтаза 2.

E.A. Shepel, T.Yu. Voznesenskaya, T.V. Blashkiv, R.I. Yanchii

CUMULUS CELL GENES AS POTENTIAL BIOMARKERS OF OOCYTE AND EMBRYO DEVELOPMENTAL COMPETENCE

Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Ukraine, Kiev The selection of embryos with high implantation potential is the most important task in assisted reproductive technologies. Today, this selection is based on subjective morphological criteria such as growth rate, early cleavage, the degree of fragmentation, blastocyst formation. However, the morphological assessment alone does not accurately predict oocyte/early stage *embryo* competence. Thus, the development of an objective, accurate, fast and affordable tests to determine oocyte quality and embryo viability could increase the chance

of a successful pregnancy and reduce the number of embryos to transfer. The advent of new technologies, the so-called OMIKS, has allowed to identify novel biomarkers that can be used in cycle of in vitro fertilization (IVF) for oocyte and / or embryo selection. During folliculogenesis oocyte plays a dominant role in regulation of cumulus (CC) and granulosa cell (GC) functions, and it is consequently believed that functions of GC and CC indirectly reflect oocyte's competence. Cell functions and active cell processes are regulated through gene expression therefore, gene expression analysis in GC and/or CC could provide a non-invasive method for identification of the most competent oocytes and embryos. In cumulus cells, genes have been identified that characterize the oocyte ability to undergo meiotic maturation, successful fertilization and early embryonic development. Among them cyclooxygenase 2, gremlin 1 and hyaluronan synthase-2, which play an important roles during oocyte development, ovulation and fertilization. This article reviews the recent data regarding these genes as potential biomarkers for selection of oocytes and embryos in the IVF program.

Key words: oocyte quality; cumulus cell gene expression; cyclooxygenase 2; gremlin 1; hyaluronic acid synthase 2.

REFERENCES

1. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod.* 2010 Aug;16(8):531-8.
2. Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Domínguez F, Matzuk M, Franks S, Hamamah S, Simón C, Devroey P, Ezcurra D, Howles CM. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2011 Nov-Dec;17(6):829-47.
3. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2869-74.
4. Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update.* 2014 Jan-Feb;20(1):1-11.
5. Assidi M, Montag M, Sirard MA. Use of both cumulus cells' transcriptomic markers and zona pellucida birefringence to select developmentally competent oocytes in human assisted reproductive technologies. *BMC Genomics.* 2015;16 Suppl 1:S9.
6. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril.* 2013 Mar 15;99(4):979-97.
7. Al-Shukri M, Khan D, Al-Hadrami A, Al-Riyami N, Gowri V, Haddabi R, Abdellatif M, Al-Dughaiishi T. Maternal and fetal outcomes of triplet gestation in a tertiary hospital in oman. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014 May;14(2):e204-10.
8. Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Lovrecic L, Kopitar AN, Maver A. No specific gene expression signature in human granulosa and cumulus cells for prediction of oocyte fertilisation and embryo implantation. *PLoS One.* 2015 Mar 13;10(3):e0115865.
9. Assou S, Al-edani T, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Aït-Ahmed O, Dechaud H, Hamamah S. MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):3038-49.
10. Huang X, Hao C, Shen X, Liu X, Shan Y, Zhang Y, Chen L. Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproduction.* 2013 May 21;145(6):597-608.
11. Moussaddykine S, Assou S, Dechaud H, Hamamah S. Other actors in the oocyte and follicular growth: the role of microRNAs in the cumulus-oocyte dialog. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 Mar;40(3):170-3.
12. Haouzi D, Assou S, Monzo C, Vincens C, Dechaud H, Hamamah S. Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012 Dec;27(12):3523-30.
13. Iager AE, Kocabas AM, Otu HH, Ruppel P, Langerveld A, Schnarr P, Suarez M, Jarrett JC, Conaghan J, Rosa GJ, Fernández E, Rawlins RG, Cibelli JB, Crosby JA. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):745-752.
14. Jindal S, Greenseid K, Berger D, Santoro N, Pal L. Impaired gremlin 1 (GREM1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet.* 2012 Feb;29(2):159-62.
15. Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction.* 2007 Nov;134(5):645-50.
16. Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX, Yang DZ. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Aug 20;12:81.
17. Du M, Fu X, Zhou Y, Zhu S. Effects of trichostatin A on cumulus expansion during mouse oocyte maturation. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2013 Nov;26(11):1545-52.
18. Blaha M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P, Prochazka R. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Oct 6;13:113.
19. Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Host T, Borup R, Grondahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum Reprod.* 2014 May;29(5):997-1010.
20. Lin ZL, Li YH, Xu YN, Wang QL, Namgoong S, Cui XS, Kim NH. Effects of growth differentiation factor 9

- and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2014 Apr;49(2):219-27.
21. Gui LM, Joyce IM. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol Reprod.* 2005 Jan;72(1):195-9.
 22. Vigone G, Merico V, Prigione A, Mulas F, Sacchi L, Gabetta M, Bellazzi R, Redi CA, Mazzini G, Adjaye J, Garagna S, Zuccotti M. Transcriptome based identification of mouse cumulus cell markers that predict the developmental competence of their enclosed antral oocytes. *BMC Genomics.* 2013 Jun 7;14:380.
 23. Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA, Pickering S. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction.* 2009 Oct;138(4):629-37.
 24. Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, Coucke W, Devroey P, Smitz J. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Hum Reprod.* 2010 May;25(5):1259-70.
 25. Assou S, Haouzi D, Dechaud H, Gala A, Ferrieres A, Hamamah S. Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:354582.
 26. Ekart J, McNatty K, Hutton J, Pitman J. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):2930-42.
 27. Machado MF, Caixeta ES, Sudiman J, Gilchrist RB, Thompson JG, Lima PF, Price CA, Buratini J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology.* 2015 Aug;84(3):390-8.
 28. Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa-E-Silva AC. The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstet Gynecol.* 2014 Apr 10;2014:818010.
 29. Gershon E, Hourvitz A, Reikhav S, Maman E, Dekel N. Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *FASEB J.* 2007 Jun;21(8):1893-901.
 30. Ochsner SA, Russell DL, Day AJ, Breyer RM, Richards JS. Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology.* 2003 Mar;144(3):1008-19.
 31. Richards JS. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29;234(1-2):75-9.
 32. Huang X, Hao C, Shen X, Zhang Y, Liu X. RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Nov 26;11:109.
 33. Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sillard MA Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology.* 2015 Jan 15;83(2):228-37.

Матеріал надійшов до редакції 05.08.2015