

EKSPANSJA KOMÓREK ZIARNISTYCH WZGÓRKA JAJONOŚNEGO – PROCES NIEZBĘDNY DO PRAWIDŁOWEGO PRZEBIEGU OWULACJI I ZAPŁODNIENIA

CUMULUS OOPHORUS EXPANSION:
INDISPENSABLE PROCESS FOR PROPER OVULATION
AND FERTILIZATION

Katarzyna KOTARSKA

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,
Kraków

Streszczenie: Ekspansja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego (*cumulus oophorus*) zachodzi w dojrzłym pęcherzyku jajnikowym w odpowiedzi na przedowulacyjny wzrost stężenia hormonu luteinizującego (LH) we krwi. W wyniku intensywnej syntezy substancji pozakomórkowej komórki folikularne *cumulus oophorus* rozsuwają się, cała struktura wielokrotnie zwiększa początkową objętość, w końcu odrywa się wraz z oocytem od warstwy ziarnistej ściany pęcherzyka. Ponieważ komórki wieńca promienistego praktycznie nie mają receptorów LH, sygnał pobudzający je do ekspansji dociera do nich za pośrednictwem innych molekuł. Molekułami tymi okazały się przede wszystkim prostaglandyna E₂ i naskórkowe czynniki wzrostu (EGF) wydzielane przez komórki ziarniste ściany pęcherzyka oraz pochodzące z oocytu peptydy z nadrodziny transformujących czynników wzrostu β (TGF- β). Substancja międzykomórkowa w pełni rozproszonego wieńca promienistego zbudowana jest głównie z łańcuchów kwasu hialuronowego, z którymi wiążą się pozostałe składniki macierzy. Składniki te wydzielane są przez komórki ziarniste pęcherzyka (wersikan, TSG-6, pentraksyna 3) lub pochodzą z osocza krwi (łańcuchy ciężkie inter-alfa-inhibitorów tripsyny). Stworzenie myszy pozbawionych funkcjonalnych genów odpowiedzialnych za ekspansję komórek somatycznych *cumulus oophorus* pozwoliło wykazać, że proces ten jest niezbędny do prawidłowego przebiegu owulacji. Połączone obfitą, glikoproteinową substancją komórki pęcherzykowe towarzyszą oocytowi podczas wędrówki do jajowodu wchodząc w interakcje z wyścielającym go nabłonkiem. Ułatwiają także zapłodnienie dzięki wiązaniu plemników, kierowaniu ich w stronę oocytu oraz sprzyjaniu kapacytacji i reakcji akrosomowej.

Słowa kluczowe: wzgórek jajonośny, wieńiec promienisty, owulacja, zapłodnienie, substancja pozakomórkowa.

Summary: Cumulus oophorus expansion takes place in matured ovarian follicles in response to preovulatory increased concentration of luteinizing hormone (LH) in blood. As a result of intensive extracellular matrix synthesis cumulus granulosa cells expand, the whole structure multiplies its volume and finally

separates together with the oocyte from the follicle wall. Because cumulus cells practically do not have LH receptors, expansion inducing signal reach them through the medium of other molecules. These molecules are above all prostaglandin E_2 and epidermal growth factors (EGF) secreted by mural granulosa cells as well as transforming growth factor β (TGF- β) superfamily members deriving from the oocyte. Extracellular matrix of fully expanded cumulus oophorus consists of hyaluronic acid chains to which other components are bound. These components are synthesized by granulosa cells (versican, TSG-6, pentraxin 3) or derive from serum (heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitors). Creation of mice with knockouts of genes responsible for cumulus expansion allowed to prove that this process is absolutely indispensable for successful ovulation. Moreover, cumulus cells together with reach extracellular matrix surround the oocyte while it pass through the oviduct interacting with oviductal epithelium. They also facilitate fertilization by trapping spermatozoa, guiding them to the oocyte, favoring capacitation and acrosomal reaction.

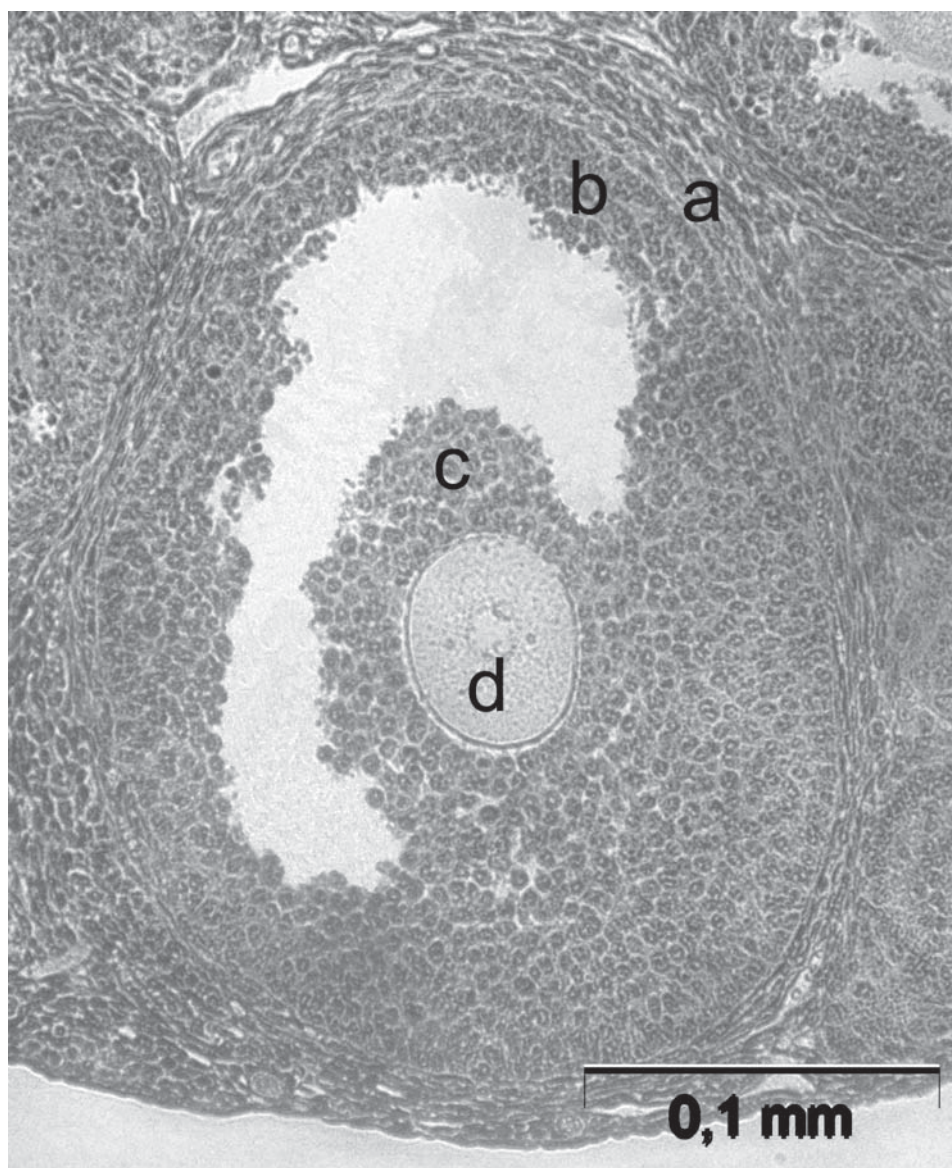
Key words: cumulus oophorus, granulosa cells, ovulation, fertilization, extracellular matrix.

1. WSTĘP

Gamety żeńskie ssaków wzrastają i dojrzewają w obrębie pęcherzyków jajnikowych. U człowieka oraz wielu innych gatunków ssaków struktury te tworzą się w trakcie rozwoju płodowego, u gryzoni natomiast – w okresie okołoporodowym [14]. Folikulogeneza rozpoczyna się, gdy proliferujące w jajnikach oogonia zakończą aktywność mitotyczną i wkraczając w podział mejotyczny stają się oocytami I rzędu. Oocyty zatrzymane w stadium diktiotenu profazy pierwszego podziału mejotycznego otaczane są przez kilka spłaszczonych komórek somatycznych oraz błonę podstawną. W ten sposób formują się tzw. pęcherzyki pierwotne [14, 24, 43]. Większość spośród wyjściowej puli pęcherzyków pierwotnych ulega degeneracji. Pozostałe pęcherzyki rozpoczynają sukcesywnie dalszy rozwój, jednak tylko nieliczne z nich osiągają pełną dojrzałość. Atrezja wzrastających pęcherzyków jajnikowych w różnych stadiach rozwojowych jest zjawiskiem naturalnym, wpisanym w prawidłowe funkcjonowanie gonady żeńskiej [14, 22, 24, 36]. Badania ostatnich lat wykazały, że w dojrzałych jajnikach myszy oraz ludzi występują komórki macierzyste podtrzymujące oogenezę i folikulogenezę. Dzięki ich aktywności zasób pęcherzyków pierwotnych zdolnych do podjęcia dalszego rozwoju może być odtwarzany podczas trwania okresu reprodukcyjnego, a nie jest, jak wcześniej sądzono, ostatecznie ustalany przed lub w momencie narodzin [14, 20, 24].

Rozwój pierwotnego pęcherzyka jajnikowego w pęcherzyk przedowulacyjny trwa u myszy około dwóch tygodni, u ludzi – ponad trzy miesiące [22]. Okres ten wielokrotnie przekracza czas trwania pojedynczego cyklu płciowego. Pęcherzyk pierwotny przekształca się stopniowo w pęcherzyk pierwszorzędowy. Oocyt rozpoczyna fazę intensywnego wzrostu, podczas której wielokrotnie zwiększa początkową objętość oraz gromadzi białka, lipidy i cząsteczki RNA potrzebne do prawidłowego przebiegu zapłodnienia i rozwoju zarodka. Wraz ze wzrostem oocytu i tworzeniem się wokół niego glikoproteinowej osłony przejrzystej (*zona pellucida*) przemianom ulega także somatyczna część pęcherzyka [43]. Komórki folikularne zmieniają kształt ze spłaszczonego na kubiczny i zaczynają intensywnie proliferować. Kiedy rosnący oocyt zostaje otoczony przez więcej niż jedną warstwę komórek ziarnistych,

pęcherzyk przyjmuje postać pęcherzyka drugorzędowego. Równocześnie na powierzchni pęcherzyka z komórek zrębu jajnika formuje się osłonka (*theca*). W dalszym etapie rozwoju w obrębie litej warstwy komórek ziarnistych pojawia się wypełniona płynem jamka (*antrum*) [8, 22]. Powstaniu antrum towarzyszy rozdział komórek ziarnistych na dwie odmienne subpopulacje: 1) komórki wyściełające od wewnątrz ścianę pęcherzyka zwane komórkami muralnymi oraz 2) komórki wieńca promienistego (*corona radiata*) bezpośrednio otaczające oocyt i tworzące wraz z nim



RYCINA 1. Przedowulacyjny pęcherzyk antralny w jajniku myszy: a – osłonka (*theca*), b – komórki ziarniste ściany pęcherzyka, c – komórki ziarniste wzgórka jajonośnego uwypuklającego się do wypełnionej płynem jamki (*antrum*), d – oocyt

wzgórek jajonośny (*cumulus oophorus*) [6, 8, 12, 31, 32, 69]. Dzięki sąsiedztwu oocytu komórki folikularne wzgórka jajonośnego zaczynają wykazywać cechy wyraźnie odróżniające je od warstwy muralnej. Przede wszystkim wydzielane przez oocyt czynniki hamują w komórkach wieńca promienistego ekspresję receptorów dla hormonu luteinizującego (LH), które pojawiają się pod wpływem innego hormonu przysadki – folikulotropiny (FSH) na powierzchni komórek ziarnistych ściany pęcherzyka. Oprócz bardzo niskiej ekspresji receptorów LH komórki ziarniste *cumulus oophorus* odznaczają się też wysokim poziomem proliferacji, słabym natężeniem steroidogenezy oraz zdolnością syntezy dużej ilości kwasu hialuronowego i innych składników substancji międzykomórkowej [6, 8, 12, 14, 17]. W wyniku swoich szczególnych własności komórki wieńca promienistego tworzą mikrośrodowisko dogodne do prawidłowego rozwoju oocytu. Środowisko to jest utrzymywane dzięki temu, iż komórki wieńca promienistego kontaktują się z sobą, z komórkami ziarnistymi ściany pęcherzyka oraz z oolemmą poprzez liczne złącza szczelinowe, a także oddziaływania auto- i parakryne [14, 65, 69].

Aktywacja i początkowe fazy wzrostu pęcherzyka jajnikowego regulowane są przede wszystkim poprzez odpowiednie stężenia różnorodnych czynników wzrostu. Należą do nich: ligand kit – KL, czynnik hamujący białaczkę – LIF (*leukemia inhibitory factor*), stromalny czynnik wzrostu 1 – SDF1 (*stromal-derived factor 1*), a także białka z nadrodziny transformujących czynników wzrostu β – TGF- β (*transforming growth factor β*), wśród których szczególne znaczenie mają: hormon antymüllerowski – AMH, czynnik wzrostu i różnicowania 9 – GDF-9 (*growth differentiation factor 9*) oraz białko morfotyczne kości 15 – BMP-15 (*bone morphogenetic protein 15*) [8, 14, 22, 36]. Pierwszo- i drugorzędowe pęcherzyki mogą wzrastać bez udziału hormonów gonadotropowych przysadki: folikulotropiny (FSH) i lutropiny (LH). Uważa się jednak, iż hormony te wpływają optymalizująco na warunki rozwoju pęcherzyków przedantralnych [8, 14, 22]. Dzięki wyposażeniu w odpowiednie receptory, pęcherzyki antralne są już bardzo wrażliwe na działanie gonadotropin [14, 22]. Ich dalszy rozwój uzależniony jest ściśle od zmieniających się podczas każdego cyklu płciowego stężeń FSH i LH. Podwyższony na początku cyklu poziom FSH stymuluje grupę pęcherzyków antralnych do szybkiego wzrostu przedowulacyjnego i syntezy estrogenów. Pojawiająca się natomiast w środku cyklu fala LH zapoczątkowuje dojrzewanie mejotyczne oocytu, owulację i uformowanie wydzielającego progesteron ciała żółtego [22].

2. ISTOTA PROCESU EKSPANSJI KOMÓREK ZIARNISTYCH WZGÓRKA JAJONOŚNEGO

Jednym z procesów bezpośrednio poprzedzających owulację i niezbędnych do jej prawidłowego przebiegu jest tzw. ekspansja (rozproszenie) komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. Proces ten zwany też mucyfikacją polega głównie na intensywnym syntetyzowaniu i wydzielaniu kwasu hialuronowego przez komórki somatyczne otaczające oocyt. W wyniku tego kompleks oocytu z komórkami ziarnistymi zwiększa 20–40 razy swą początkową objętość i odrywa się od warstwy ziarnistej

ściany pęcherzyka. Rozsunięciu się komórek kompleksu i zerwaniu połączeń pomiędzy nimi towarzyszy podjęcie podziału przez oocyt, czego zewnętrznym przejawem jest wyrzucenie ciała kierunkowego [12, 21, 45, 71].

Prawidłowo ukształtowany wzgórek jajonośny zbudowany jest z bardzo licznej populacji wyspecjalizowanych komórek ziarnistych. Ta wysoka liczebność komórek somatycznych *cumulus oophorus* jest niezbędna do uformowania odpowiednio obszernej i stabilnej substancji międzykomórkowej. Samice myszy pozbawione funkcjonalnych genów regulującej cykl komórkowy cykliny D2 wykazują zmniejszoną proliferację komórek ziarnistych pęcherzyków jajnikowych oraz bezpłodność. Stwierdzono, że bardzo nieliczne u nich komórki wzgórka jajonośnego nie są w stanie wytworzyć prawidłowej macierzy pozakomórkowej, przez co oocyt zostaje uwięziony wewnątrz pęcherzyka jajnikowego i nie owuluje. Dowodzi to dobitnie ogromnego znaczenia procesu ekspansji wieńca promienistego w przebiegu owulacji [17, 58].

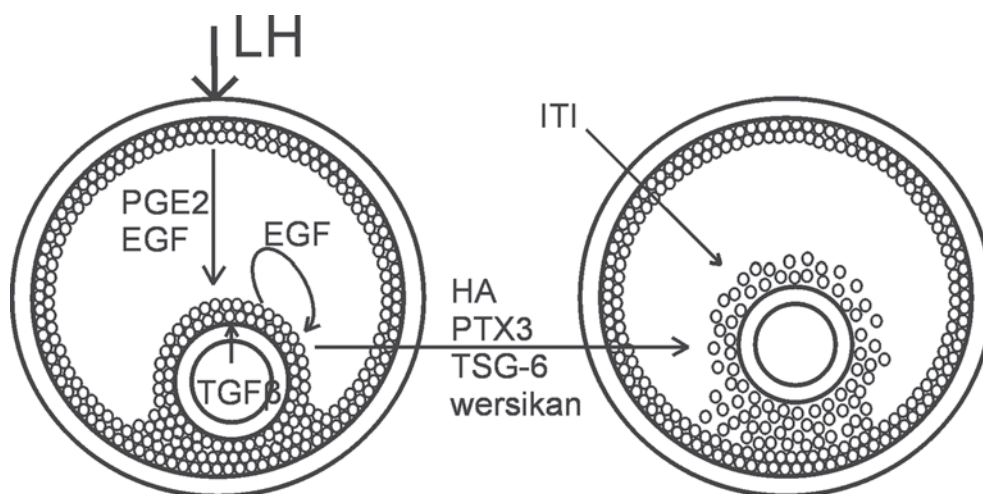
Początkowo sądzono, iż gromadzenie się substancji pozakomórkowej w obrębie wzgórka jajonośnego powoduje mechaniczne przerywanie połączeń pomiędzy budującymi go komórkami. Późniejsze badania wykazały jednak, że zanikanie złącz szczelinowych poprzedza syntezę kwasu hialuronowego, a zablokowanie endocytozy tworzących je koneksonów skutkuje zahamowaniem ekspansji komórek ziarnistych *cumulus oophorus* [30]. Zamykanie złącz szczelinowych w komórkach wieńca promienistego nie tylko daje sygnał do intensywnego wydzielania przez nie substancji pozakomórkowej, lecz także decyduje o dojrzewaniu mejotycznym oocytu [37, 55]. Zostało udowodnione, iż oocyt w pęcherzyku antralnym trwa w stadium diaktotenu dzięki utrzymywaniu się w jego cytoplazmie wysokiego stężenia cyklicznego AMP, który pośrednio działa inaktywująco na czynnik MPF (*M-phase promoting factor*). Wiadomo też, że farmakologiczne zablokowanie połączeń pomiędzy komórkami pęcherzyka lub wyizolowanie oocytu ze wzgórka jajonośnego skutkuje wznowieniem mejozy. Wysznuło stąd wniosek, iż komórki ziarniste hamują przedwczesne dojrzewanie oocytu dzięki przekazywaniu do jego cytoplazmy cAMP poprzez liczne złącza szczelinowe. Związane z rozpraszaniem wieńca promienistego zamykanie tych połączeń powoduje natomiast spadek stężenia cAMP we wnętrzu oocytu, odblokowanie MPF i podjęcie podziału [33, 55, 67]. Ostatnio hipoteza ta została jednak poddana w wątpliwość, gdy okazało się, że decydujący wkład w utrzymanie hamującego stężenia cAMP w oocycie ma jego własna aktywność syntetyczna [33, 67]. Wykazano ponadto, że poprzedzający wznowienie podziału spadek ilości cAMP w cytoplazmie oocytu nie zależy ani od aktywacji białka G_i , ani od wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} [32]. Poszukuje się więc innych dróg oddziaływania komórek ziarnistych na dojrzewanie oocytu. Ogromne znaczenie złącz szczelinowych w tym procesie wydaje się jednak bezsporne.

3. CZYNNIKI REGULUJĄCE EKSPANSJĘ KOMÓREK ZIARNISTYCH WZGÓRKA JAJONOŚNEGO

W warunkach *in vitro* ekspansję wyizolowanych kompleksów oocytu z komórkami ziarnistymi wywołać można poprzez zadziałanie FSH [7, 51]. *In vivo* proces

ten indukowany jest jednak poprzedzającym owulację wyrzutem LH. Niezwykle ograniczona ekspresja receptorów LH w komórkach wieńca promienistego [42], a także niereagowanie wyizolowanych kompleksów oocytu z komórkami foliularnymi na stymulację LH *in vitro* [7] sugerują, że gonadotropina ta wywiera swój efekt przede wszystkim w sposób pośredni. Jednym z bardzo istotnych pośredników okazała się prostaglandyna E_2 (PGE_2), która stymuluje komórki ziarniste *cumulus oophorus* do rozpraszania i syntezy kwasu hialuronowego *in vitro* [9]. Samice myszy pozbawione aktywności genu *Cox-2* (cyklooksygenazy 2 kontrolującej syntezę prostaglandyn) lub genu receptora PGE_2 charakteryzują się nieprawidłowym rozpraszaniem wieńca promienistego i poważnymi zaburzeniami owulacji [5, 18], co potwierdza znaczenie prostaglandyny E_2 w przebiegu tych procesów.

Inną drogą rozpowszechniania się sygnału LH w pęcherzyku przedowulacyjnym jest synteza przez muralne komórki ziarniste peptydów, należących do rodziny naskórkowych czynników wzrostu – EGF (*epidermal growth factor*): amfireguliny, epireguliny i β -celuliny. Czynniki te łącząc się ze swoimi receptorami na powierzchni komórek wieńca promienistego pobudzają intensywne wytwarzanie substancji międzykomórkowej oraz wpływają na dojrzewanie oocytu [4, 41, 54]. Analiza ekspresji genów w komórkach ziarnistych pęcherzyka jajnikowego w okresie bezpośrednio poprzedzającym owulację wykazała, że geny amfireguliny, epireguliny i β -celuliny są aktywne nie tylko w warstwie granulozy ściennej, lecz także w komórkach



RYCINA 2. Ekspansja komórek ziarnistych *cumulus oophorus*. Pod wpływem fali LH w przedowulacyjnym pęcherzyku jajnikowym następuje wzmożona synteza prostaglandyny E_2 (PGE_2), naskórkowych czynników wzrostu (EGF) oraz czynników z nadrodziny $TGF-\beta$. Czynniki te stymulują komórki ziarniste wzgórka jajonośnego do wydzielania kwasu hialuronowego (HA), cząsteczek PTX3, TSG-6 i wersikanu, które wspólnie z pochodzącymi z krwi łańcuchami ciężkimi inter-alpha-inhibitorów trypsyny (ITI) tworzą obfitą macierz pozakomórkową. Oocyt otoczony rozproszonymi komórkami wieńca promienistego odrywa się od warstwy ziarnistej ściany pęcherzyka i jest gotowy do owulacji

otaczających oocyt. Te naskórkowe czynniki wzrostu stymulują więc proces ekspansji zarówno poprzez oddziaływania parakryne, jak i autokryne [17].

Ważną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania strefy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego odgrywa również oocyt, który nie tylko odpowiada na sygnały pochodzące od komórek somatycznych, ale sam wpływa na otoczenie między innymi poprzez sekrecję hormonów peptydowych i czynników wzrostu [4, 6, 31]. Eksperymenty *in vitro* udowodniły, że u myszy obecność oocyta jest absolutnie niezbędna do podjęcia przez komórki wieńca promienistego syntezy kwasu hialuronowego i do ich rozproszenia [49, 50]. Komórki folikularne samic szczura, krowy i świni udało się wprawdzie rozproszyć bez udziału oocytów, lecz wiadomo, że oocyty tych gatunków również wydzielają czynniki sprzyjające mucyfikacji [12]. Prawdopodobnie należą one do nadrodziny transformujących czynników wzrostu β (TGF- β). Wykazano, że będący członkiem tej rodziny czynnik wzrostu i różnicowania 9 (GDF-9) sprzyja właściwemu formowaniu substancji międzykomórkowej *cumulus oophorus* dzięki pobudzeniu ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za ten proces, między innymi *Has-2* (syntazy hialuronianowej 2), *Ptx3* (pentraksyny 3), *Tsg-6* (*tumor necrosis factor stimulated gene 6*) i *Cox-2/Ptgs2* (cyklooksygenazy 2 zwanej również syntazą prostaglandynową 2). GDF-9 zapobiega ponadto luteinizacji komórek ziarnistych otaczających oocyt dzięki blokowaniu w nich ekspresji receptorów LH. Może także stabilizować macierz międzykomórkową wzgórka jajonośnego chroniąc ją przed działaniem proteaz. Wiadomo bowiem, że GDF-9 hamuje ekspresję aktywatora urokinazy plazminogenu – uPA (*urokinase plasminogen activator*), która wzrasta pod wpływem FSH w komórkach warstwy ziarnistej ściany pęcherzyka. Oddziaływanie GDF-9 na strukturę wzgórka jajonośnego wzmacniane jest dzięki innym czynnikom pochodzącym z oocyta. Wymienić tu należy przede wszystkim BMP-15 i 6 oraz aktywinę [6, 12, 31].

4. BUDOWA SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ WIEŃCA PROMIENISTEGO

Podstawowym składnikiem substancji międzykomórkowej w pełni rozproszonego wieńca promienistego jest kwas hialuronowy, który występuje w nim w koncentracji 0,5–1,0 mg · ml⁻¹ [47,71]. Obliczono też, że u chomika syryjskiego w jednym kompleksie oocyta z komórkami ziarnistymi znajduje się około 11 ng tego kwasu [52]. Kwas hialuronowy jest glikozaminoglikanem zbudowanym z powtarzających się jednostek disacharydowych. Pojedyncza jednostka składa się z kwasu glukuronowego (GlcUA) oraz N-acetyloglukozoaminy (GlcNac). Wszystkie wiązania glikozydowe w łańcuchach kwasu hialuronowego są typu β : 1–3 pomiędzy GlcUA a GlcNac oraz 1–4 pomiędzy GlcNac a GlcUA. Kwas hialuronowy tworzy długie, nierozgałęzione, polianionowe łańcuchy, które są syntetyzowane na wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej komórek przy udziale enzymu syntazy hialuronianowej, a następnie wydzielane do

przeźreni międzykomórkowej [47, 59]. Łańcuchy kwasu hialuronowego łączą się z komórkami ziarnistymi poprzez receptory CD44 [71].

Pozostałe glikozaminoglikany (GAG) występujące w substancji pozakomórkowej wieńca promienistego są powiązane kowalencyjnie z białkami tworząc proteoglikany. W grupie tej na szczególną uwagę zasługuje proteoglikan wersikan. Należy on do cząstek, które wiążąc kwas hialuronowy wpływają na prawidłową strukturę, integralność i elastyczność macierzy międzykomórkowej. Zarodki myszy z wyłączoną ekspresją genu kodującego białkowy rdzeń wersikanu zamierają z powodu zaburzeń rozwoju serca. Identyczny fenotyp obserwuje się u myszy pozbawionych aktywnego genu syntazy hialuronianowej 2. Świadczy to o fundamentalnym znaczeniu zarówno kwasu hialuronowego, jak i wersikanu w przebiegu rozwoju zarodkowego, ale także o bliskim powiązaniu funkcjonalnym obu tych molekuł [45, 46]. Białko wersikan wiąże się z kwasem hialuronowym domeną N-końcową, podczas gdy jego lektynopodobna domena C-końcowa ma zdolność łączenia się z powierzchnią komórek lub innymi składnikami macierzy. Białko to kodowane jest przez pojedynczy gen, jednak dzięki alternatywnemu składaniu transkryptu na jego matrycy powstaje kilka izoform. Izofорма V2 charakterystyczna jest dla tkanki nerwowej. Pozostałe trzy warianty wersikanu występują w warstwie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych, szczególnie obficie pomiędzy rozproszonymi komórkami wzgórka jajonośnego. Są to: V0 przyłączający dwa łańcuchy glikozaminoglikanów, V1 przyłączający jeden łańcuch glikozaminoglikanowy oraz V3 w ogóle pozbawiony domen wiążących GAG. Wiele spośród swoich cech wersikan zawdzięcza przyłączonym cząstkom glikozaminoglikanów bogatych w boczne łańcuchy siarczanu chondroityny. Dzięki nim osiąga on bardzo dużą masę cząsteczkową (do 1600 kDa), wykazuje silny ładunek ujemny oraz własności hydrodynamiczne [46].

Ogromną rolę w organizowaniu i stabilizacji substancji międzykomórkowej wieńca promienistego odgrywają także cząstki pochodzące z osocza krwi, należące do rodziny inter-alfa-inhibitorów trypsyny – ITI (*inter-alpha-trypsin inhibitor*). Inter-alfa-inhibitory trypsyny syntetyzowane są w wątrobie, skąd zostają uwolnione do krwi. Składają się z łańcucha lekkiego: bikuniny oraz jednego lub dwóch spośród trzech genetycznie odrębnych łańcuchów ciężkich: HC1, HC2 i HC3. Łańcuchy ciężkie przyłączone są do bikuniny poprzez wiązanie estrowe. Pod wpływem poprzedzającego owulację wyrzutu LH następuje otwarcie bariery krew-pęcherzyk jajnikowy. Umożliwia to szybki napływ cząsteczek ITI do wnętrza pęcherzyka i wbudowanie ich łańcuchów ciężkich w formującą się macierz pozakomórkową wzgórka jajonośnego [1, 2, 61, 70, 71, 72]. Łańcuchy ciężkie inter-alfa-inhibitorów trypsyny wiązane są kowalencyjnie z cząsteczkami kwasu hialuronowego w reakcji katalizowanej przez enzymy osocza krwi [72] oraz enzymy syntetyzowane w komórkach ziarnistych [1]. Przebieg tej reakcji ułatwia proteoglikan wersikan, który tworzy początkowo z cząsteczkami ITI przejściowe połączenia niekowalencyjne [71].

Jak zostało wcześniej wspomniane, komórki ziarniste otaczające oocyt zwartą warstwą można pobudzić *in vitro* do intensywnej syntezy kwasu hialuronowego i rozproszenia działając na nie FSH. Naśladuje się w ten sposób naturalny proces zachodzący w pęcherzyku przedowulacyjnym pod wpływem wysokiego stężenia LH. Jednak

zsyntetyzowane w warunkach *in vitro* łańcuchy kwasu hialuronowego formują stabilną substancję międzykomórkową jedynie w obecności surowicy lub po prostu inter-alfa-inhibitorów trypsyny. W przeciwnym wypadku dyfundują one do pożywki hodowlanej, a kompleksy oocytów z komórkami ziarnistymi pozostają nierozproszone [2, 51].

Wyhodowanie myszy z wyłączoną ekspresją genu bikuniny (*Bik*^{-/-}) dostarczyło dalszych dowodów potwierdzających fundamentalne znaczenie inter-alfa-inhibitorów trypsyny w formowaniu stabilnej substancji międzykomórkowej *cumulus oophorus*. Myszy *Bik*^{-/-}, pomimo braku cząsteczek ITI w krwioobiegu, rozwijają się całkowicie prawidłowo. Jednak samice pozbawione obu funkcjonalnych kopii genu bikuniny są nieplodne. Okazało się, że ekspansja komórek wieńca promienistego w odpowiedzi na wyrzut LH jest u nich poważnie zaburzona. W wyniku tego komórki ziarniste odłączają się od kompleksu z oocytem jeszcze wewnątrz pęcherzyka jajnikowego, a oocyty trafiające do jajowodu są nieliczne i już całkowicie pozbawione towarzyszących im normalnie komórek somatycznych. Oocyty takie pozostają niezapłodnione, co wyjaśnia bezpłodność samic *Bik*^{-/-} oraz stanowi dowód na to, iż komórki folikularne otaczające oocyt spełniają ważną rolę w fuzji gamet [72]. Analiza ekspresji genów w jajnikach myszy *Bik*^{-/-} wykazała, że funkcja cząsteczek ITI w przebiegu owulacji nie ogranicza się jedynie do stabilizowania macierzy pozakomórkowej wieńca promienistego. Wpływają one także modulująco na aktywność transkrypcyjną wielu genów związanych mniej lub bardziej bezpośrednio z dojrzewaniem pęcherzyków jajnikowych [61].

Kolejnymi cząstkami niezbędnymi do uformowania prawidłowej substancji międzykomórkowej rozpraszającego się wzgórka jajonośnego są glikoproteiny TSG-6 oraz PTX3, obie zaangażowane również w reakcje immunologiczne organizmu. Badania na myszach wykazały, że ekspresja genu *Tsg-6* (*tumor necrosis factor stimulated gene 6*), znanego także pod nazwą *Tnfaip6* (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 6*), wzrasta raptownie w strefie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych pobudzonych owulacyjną dawką hCG (*human chorionic gonadotropin*) [10, 38, 39, 45]. W komórkach ziarnistych *cumulus oophorus* ekspresja ta utrzymuje się na wysokim poziomie aż do momentu owulacji i w przeciwieństwie do genów syntazy hialuronianowej 2 oraz wersikanu uzależniona jest od stężenia prostaglandyny E₂ w pęcherzyku. W jajnikach myszy pozbawionych aktywnych kopii genu *Cox-2* lub genu receptora PGE₂ występuje obniżony poziom zarówno mRNA, jak i białka TSG-6. Być może jest to jedna z podstawowych przyczyn zaburzeń rozpraszania wieńca promienistego i niepłodności u tych samic [38, 39, 45]. Hipotezę tą potwierdza model myszy z wyłączoną ekspresją genu *Tsg-6*, gdzie obserwuje się podobne nieprawidłowości w formowaniu substancji łączącej komórki folikularne wzgórka jajonośnego oraz problemy z owulacją [38, 45]. Rola TSG-6 w ekspansji komórek wieńca promienistego opiera się głównie na jego zdolności do wiązania hialuronianu oraz innych składników macierzy międzykomórkowej, przede wszystkim łańcuchów ciężkich inter-alfa-inhibitorów trypsyny. Jest bardzo prawdopodobne, iż cząsteczki TSG-6 pośredniczą w tworzeniu połączeń kowalencyjnych pomiędzy łańcuchami ciężkimi ITI, a kwasem hialuronowym [10, 38, 39, 45]. Inną postulowaną funkcją TSG-6 jest ochrona macierzy przed aktywnością enzymów proteolitycznych [10].

Pentraksyna 3 – PTX3 (*pentraxin 3*) należy do rodziny tzw. długich pentraksyn. Zbudowana jest z domeny C-końcowej homologicznej do krótkich pentraksyn, takich jak białko C-reaktywne (CRP) i surowicy amyloid P (SAP) oraz unikatowej domeny N-końcowej niewykazującej homologii do żadnych innych znanych białek. Łańcuchy PTX3 łączą się z sobą poprzez wiązania dwusiarczkowe tworząc multimeryczne cząstki o dużej masie molekularnej. Pentraksyna 3 wydzielana jest przez różnorodne typy komórek w odpowiedzi na bodźce prozapalne. Intensywna ekspresja genu *Ptx3* zachodzi również w rozpraszających się komórkach wzgórka jajonośnego, a jego produkt lokalizuje się w syntetyzowanej obficie macierzy międzykomórkowej. PTX3 nie wykazuje bezpośredniego powinowactwa do kwasu hialuronowego. Wiążąc się jednak z łańcuchami ciężkimi inter-alfa-inhibitorów trypsyny oraz cząsteczkami TSG-6 wpływa na stabilność i odpowiednie usieciowanie substancji międzykomórkowej wieńca promienistego [11, 19, 29, 48, 53]. Wykazano, iż pentraksyna 3 wbudowywana jest w postaci tetramerów i tylko taka jej forma pozwala na prawidłową organizację pozostałych składników macierzy [19]. U samic myszy pozbawionych aktywności genu *Ptx3* obserwuje się nieprawidłową ekspansję komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. Ponadto odnajdywane w jajowodach owulowane oocyty tych samic otoczone są wprawdzie komórkami folikularnymi, ale komórki te zamiast typowego promienistego układu tworzą całkowicie bezładną masę, która bardzo szybko ulega całkowitej dezintegracji. Oocyty myszy *Ptx3*^{-/-} mogą być zapładniane *in vitro*, co wskazuje na to, iż rozwijają się one prawidłowo przy braku cząsteczek pentraksyny 3. Jednak *in vivo* oocyty takie nie ulegają fuzji z plemnikami, a samice z mutacją wykazują całkowitą lub prawie całkowitą bezpłodność [11, 48]. Niedawno odkryto, że PTX3 wpływa na płodność samic myszy jeszcze w inny sposób. Mianowicie glikoproteina ta syntetyzowana jest przejściowo w macicy, w okresie bezpośrednio poprzedzającym implantację zarodków i przyczynia się znacząco do pomyślnego przebiegu tego ważnego procesu [11, 29].

Jak wykazano powyżej, brak którejkolwiek z molekuł wiążących i stabilizujących łańcuchy kwasu hialuronowego skutkuje zaburzeniami ekspansji komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego, a w konsekwencji problemami z owulacją i/lub zapłodnieniem oocytów. Okazuje się jednak, iż nadmierna synteza niektórych składników substancji międzykomórkowej rozproszonego wieńca promienistego może być równie szkodliwa. U myszy z wyłączoną ekspresją genu receptora prostaglandyny E₂ (*Ptger2*^{-/-}) komórki wieńca promienistego wydzielają większe w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi ilości cytokin o działaniu autokrynnym, zwłaszcza cytokiny CCL7. Powoduje to nadmierną syntezę i wbudowywanie w substancję międzykomórkową integryn, które w tak dużym stężeniu uniemożliwiają plemnikom penetrację strefy komórek folikularnych otaczających oocyt [64].

Substancja występująca pomiędzy rozproszonymi komórkami ziarnistymi wzgórka jajonośnego ma bardzo złożoną budowę, a kontynuowane nadal badania nad jej strukturą prowadzą do odkrywania kolejnych komponentów. Na przykład u szczurów w macierzy międzykomórkowej wzgórków jajonośnych wykazano ostatnio obecność białka wiążącego hialuronian 1 – HABP1 (*hyaluronan binding protein 1*), które wytwarzane jest przez komórki ziarniste w odpowiedzi na przedowulacyjną stymu-

lację hormonalną [66]. Natomiast w mysich oraz ludzkich komórkach wieńca promienistego wykryto obecność zarówno mRNA, jak i samego antygenu CD52. Jego cząsteczki lokalizują się także w substancji międzykomórkowej kompleksów oocytów z komórkami ziarnistymi i prawdopodobnie mają swój udział w przebiegu zapłodnienia. Do tej pory cząstki CD52 kojarzono przede wszystkim z męskimi drogami płciowymi, gdzie zachodzi ich synteza oraz wbudowywanie w błony plemników. Antygeny CD52 pobudzają przeciwciała, które mogą wpływać na funkcjonowanie męskich komórek rozrodczych. Są one najczęstszą przyczyną niepłodności na tle immunologicznym. Znaczenie CD52 zidentyfikowanych w osłonach jajowych jest na razie niejasne [16].

5. ROLA KOMÓREK ZIARNISTYCH I SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ OTACZAJĄCYCH OWULUJĄCY OOCYT

W odpowiedzi na przedowulacyjną falę LH w pęcherzyku jajnikowym zachodzi szereg zmian, które ze względu na ogromne podobieństwo aktywowanych genów, cząstek sygnałowych i enzymów porównuje się do procesu zapalnego. Wraz z rozproszeniem komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego następuje wzrost ilości płynu wewnątrz pęcherzyka wywołany zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych, a także sekrecja proteaz przez muralne komórki ziarniste oraz komórki *theca*. Enzymy proteolityczne powodują degradację ściany pęcherzyka w jego części apikalnej oraz lokalne nadtrawienie błon pokrywających jajnik. Skurcz komórek mięśni gładkich osłonki prowadzi do pęknięcia pęcherzyka i wypchnięcia oocytu wraz z komórkami wieńca promienistego do jamy ciała [46, 71]. Porównanie owulacji do procesu zapalnego nabrało dużo szerszego wymiaru, gdy wykryto, iż towarzyszy jej ekspresja w komórkach ziarnistych pęcherzyka licznych genów charakterystycznych dla komórek związanych z odpornością wrodzoną. Na powierzchni komórek ziarnistych pojawiają się między innymi receptory rozpoznające patogeny – PRR (*pathogen-recognition receptor*), które mają zdolność odróżniania struktur własnych organizmu od struktur obcych lub własnych nieprawidłowych. W grupie tej wymienić należy przede wszystkim receptory TLR (*Toll-like receptors*) oraz wspomagające je cząstki, takie jak CD14 i czynnik dopełniacza C1q. W jajniku ligandami aktywującymi receptory TLR wydają się być przede wszystkim cząsteczki kwasu hialuronowego, które w formie spolimeryzowanej promują przetrwanie komórek, a w postaci krótkich fragmentów pobudzają wydzielanie cytokin, głównie interleukiny-6 (IL-6). Wykazano ponadto, iż komórki ziarniste przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych mogą fagocytować fragmenty patogenów i składników własnego organizmu dzięki obecności na ich powierzchni receptorów CD36, SCARB1 i SCARB2. Okazuje się więc, że komórki somatyczne *cumulus oophorus* towarzyszące owulującemu oocytowi nie tylko tworzą wokół niego fizyczną barierę ochronną, lecz także spełniają szereg funkcji właściwych dla systemu odporności wrodzonej [28, 44, 56].

Rozproszenie komórek wieńca promienistego jest konieczne, aby oocyt mógł zostać uwolniony z pęcherzyka jajnikowego. Rola otaczających oocyt komórek ziarnistych i łączącej je substancji pozakomórkowej nie kończy się jednak w momencie owulacji. Przede wszystkim dzięki nim owulowany oocyt jest wychwytywany przez lejek jajowodu. Liczne eksperymenty na chomikach udowodniły, że zarówno kwas hialuronowy, jak i komponenty białkowe występujące pomiędzy komórkami wieńca promienistego łączą się selektywnie z rzęskami pokrywającymi lejek. W wyniku tych interakcji kompleks oocytu z komórkami ziarnistymi przesuwa się do ujścia jajowodu. Nierozproszone, ubogie w macierz pozakomórkową kompleksy, a także oocyty pozbawione towarzyszących im komórek somatycznych nie wykazują zdolności wiązania się z lejkiem jajowodu i nie są transportowane do jego wnętrza pomimo intensywnych ruchów rzęsek [27, 62, 65]. Interakcje pomiędzy komórkami folikularnymi a nabłonkiem wyścielającym jajowód odgrywają również rolę w dalszej wędrówce oocytu do miejsca zapłodnienia oraz w rozszerzaniu się ścian tworzących *ampullę* (bańkę jajowodu) [28, 44]. Trudno ustalić jak znaczna jest to rola, jednak obserwacje fenotypu samic myszy pozbawionych funkcjonalnego genu *Ptx3* sugerują, że nie można jej lekceważyć. U myszy *Ptx3^{-/-}*, które charakteryzują się, jak już wspomniano, niestabilnością macierzy łączącej komórki wieńca promienistego i szybką jego dezintegracją, jajowód nie tworzy charakterystycznego dla fazy postowulacyjnej rozszerzenia, a oocyty rozpraszają się w nim w sposób całkowicie przypadkowy zamiast skupiać się w jednym, określonym miejscu [28, 44, 48].

U większości ssaków komórki wieńca promienistego wraz z bogatą w kwas hialuronowy substancją pozakomórkową pozostają wokół oocytów jeszcze przez wiele godzin po owulacji. Ich obecność jest bardzo ważna dla pomyślnego przebiegu zapłodnienia [65, 69]. Początkowo nie doceniano udziału komórek folikularnych w procesie łączenia się gamet, ponieważ *in vitro* oocyty pozbawione warstwy ziarnistej mogą być z powodzeniem zapładniane [48]. W zrozumieniu znaczenia wieńca promienistego dla zapłodnienia bardzo pomocne okazały się znowu myszy z mutacjami powodującymi zaburzenia ekspansji komórek ziarnistych *cumulus oophorus* (*Bik^{-/-}* oraz *Ptx3^{-/-}*). Oocyty tych myszy pozostają niezapłodnione tylko dlatego, iż nie otacza ich w jajowodzie warstwa komórek ziarnistych. Fakt ten świadczy dobitnie o roli wieńca promienistego w procesie zapłodnienia *in vivo* [48, 72]. To, że w warunkach fizjologicznych obecność komórek pęcherzykowych wokół oocytów jest tak ważna dla pomyślnego przebiegu zapłodnienia, wynika prawdopodobnie stąd, iż do bańki jajowodu dociera bardzo niewielka liczba plemników. Potrzebne stają się więc dodatkowe mechanizmy ułatwiające zbliżenie gamet [48].

Powstało wiele teorii wyjaśniających, w jaki sposób komórki i substancja pozakomórkowa wieńca promienistego mogą oddziaływać na plemniki sprzyjając przebiegającej w jajowodzie fuzji gamet. Przede wszystkim wykazano, że macierz międzykomórkowa wieńca promienistego wychwytuje bardzo nieliczne w *ampulli* plemniki, a promienisty układ jego składników ułatwia wędrówkę gamet męskich w kierunku oocytu. Plemniki przechodzące przez warstwę ziarnistą reagują nie tylko na bodźce mechaniczne, lecz również na subtelne sygnały natury chemicznej pochodzące od komórek pęcherzykowych. Komórki te wydzielają

chemoatraktanty, które tworząc odpowiedni gradient stężenia kierują plemniki w pobliże oocytu [65, 69]. Głównym chemoatraktantem wydzielanym przez komórki ziarniste *cumulus oophorus* okazał się być progesteron [13, 40].

Inną postulowaną funkcją wieńca promienistego jest tworzenie mikrośrodowiska, które sprzyja kapacytacji i reakcji akrosomowej plemników [15, 65, 69]. Wiadomo, że przedostające się do *ampulli* plemniki ulegają kapacytacji już w początkowym odcinku jajowodu. Jedynie przebycie tego złożonego procesu przemian fizjologicznych pozwala im na odłączenie się od nabłonka jajowodu i dotarcie do miejsca zapłodnienia [60, 63]. Rola komórek folikularnych polegać więc może bardziej na pogłębianiu kapacytacji gamet męskich niż na indukcji tego procesu [65, 69]. Udowodniono, że kwas hialuronowy substancji międzykomórkowej wieńca promienistego łącząc się do specyficznych receptorów powierzchniowych zwiększa ruchliwość plemników [23], a także prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w ich cytoplazmie [3]. Hiperaktywacja umożliwia gametom męskim sforsowanie zwartej warstwy komórek ziarnistych. Podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} przyspiesza natomiast zajście reakcji akrosomowej pod wpływem połączenia główki plemnika z glikoproteinami osłony przejrzystej. Ostatnie badania wykazały, że występujący pomiędzy komórkami pęcherzykowymi hialuronian stymuluje plemniki oddziałując na nie również w sposób pośredni. Mianowicie pod wpływem hialuronidazy plemników kwas hialuronowy obecny w macierzy międzykomórkowej wieńca promienistego jest cięty na krótkie fragmenty. Fragmenty te wiążą się do receptorów TLR2 i TLR4 na powierzchni komórek ziarnistych i pobudzają je do wydzielania chemokin, takich jak CCL4 i CCL5. Chemokiny te z kolei łączą się do właściwych sobie receptorów w błonach plemników powodując wzrost ich ruchliwości [28, 44, 57].

Czasami wspomina się o roli wieńca promienistego w selekcyonowaniu plemników biorących udział w zapłodnieniu [47, 65, 69]. Eksperymenty *in vitro* udowodniły, że gamety męskie wykazujące nieprawidłowości morfologiczne i funkcjonalne są bardzo skutecznie zatrzymywane przez warstwę komórek ziarnistych i niedopuszczane w pobliże oocytu [25]. *In vivo* podstawową barierą selekcyonującą plemniki jest jednak cieśń maciczno-jajowodowa [26, 35]. Gamety męskie przybywające do bańki jajowodu nie wykazują już zwykle zaburzeń i w związku z tym w warunkach naturalnych znaczenie wieńca promienistego jako bariery selekcyjnej wydaje się drugorzędne.

Warto na koniec nadmienić, iż zlepione glikoproteinową substancją komórki ziarniste mogą sprzyjać procesowi zapłodnienia nie tylko poprzez interakcje z plemnikami, ale także poprzez wpływanie na stan cytoplazmy, mitochondriów oraz osłony przejrzystej oocytu [34, 65, 68, 69].

6. PODSUMOWANIE

Ekspansja komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego jest jednym z procesów zachodzących w pęcherzyku jajnikowym pod wpływem przedowulacyjnego wyrzutu LH. Dzięki syntezie obfitującej w kwas hialuronowy macierzy komórki somatyczne

wzgórka jajonośnego rozsuwają się, a następnie odrywają wraz z oocytem od warstwy ziarnistej ściany pęcherzyka. Obserwacje fenotypów myszy z wyłączoną ekspresją różnorodnych genów regulujących rozproszenie wieńca promienistego wykazały, że proces ten jest bezwzględnie konieczny dla pomyślnej owulacji, a uformowanie prawidłowej, stabilnej substancji międzykomórkowej odgrywa w nim decydującą rolę. Substancja ta tworzy wraz z komórkami pęcherzykowymi elastyczną strukturę otaczającą oocyt, która towarzyszy mu nie tylko podczas owulacji, ale również podczas wędrówki do bańki jajowodu oraz zapłodnienia, spełniając wiele ważnych funkcji. Wszelkie nieprawidłowości w przebiegu ekspansji komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego prowadzą do poważnych zaburzeń owulacji i/lub zapłodnienia zarówno u ludzi, jak i zwierząt. Dlatego też szczegółowe poznanie mechanizmów oraz cząsteczek biorących udział w tym procesie może być bardzo pomocne przy leczeniu niektórych form bezpłodności.

PIŚMIENNICTWO

- [1] CHEN L, MAO SJT, LARSEN WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter- α -trypsin inhibitor family. *J Biol Chem* 1992; **267**: 12380–12386.
- [2] CHEN L, ZHANG H, POWERS RW, RUSSELL PT, LARSEN WJ. Covalent linkage between proteins of the inter- α -inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19409–19414.
- [3] CHERR GN, YUDIN AI, LI MW, VINES CA, OVERSTREET JW. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; **7**: 211–222.
- [4] CONTI M, HSIEH M, PARK J-Y, SU Y-Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 715–723.
- [5] DAVIS BJ, LENNARD DE, LEE CA, TIANO HF, MORHAM SG, WETSEL WC, LANGENBACH R. An ovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E₂ and interleukin-1 β . *Endocrinology* 1999; **140**: 2685–2695.
- [6] DIAZ FJ, WIGGLESWORTH K, EPPIG JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1330–1340.
- [7] EPPIG JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; **281**: 483–484.
- [8] EPPIG JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; **122**: 829–838.
- [9] EPPIG JJ. Prostaglandin E₂ stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod* 1981; **25**: 191–195.
- [10] FULOP C, KAMATH RV, LI Y, OTTO JM, SALUSTRI A, OLSEN BR, GLANT TT, HASCALL VC. Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* 1997; **202**: 95–102.
- [11] GARLANDA C, MAINA V, MARTINEZ DE LA TORRE Y, NEBULONI M, LOCATI M. Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. *Placenta* 2008; **29**: S129–S134.
- [12] GILCHRIST RB, RITTER LJ, ARMSTRONG DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004; **82–83**: 431–446.
- [13] GUIDOBALDI HA, TEVES ME, UNATES DR, ANASTASIAA, GIOJALAS LC. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS ONE* 2008; **3**: e3040.
- [14] GUIGON CJ, MAGRE S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: Insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 2006; **74**: 450–458.

- [15] GUTNISKY C, DALVIT GC, PINTOS LN, THOMPSON JG, BECONI MT, CETICA PD. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte *in vitro* maturation, fertilization and embryo development. *Reprod Fertil Dev* 2007; **19**: 488–497.
- [16] HASEGAWA A, TAKENOBU T, KASUMI H, KOMORI S, KOYAMA K. CD52 is synthesized in cumulus cells and secreted into the cumulus matrix during ovulation. *Am J Reprod Immunol* 2008; **60**: 187–191.
- [17] HERNANDEZ-GONZALEZ I, GONZALEZ-ROBAYNA I, SHIMADAM, WAYNE CM, OCHSNER SA, WHITE L, RICHARDS JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: Does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 1300–1321.
- [18] HIZAKI H, SEGIE, SUGIMOTO Y, HIROSE M, SAJI T, USHIKUBI F, MATSUOKA T, NODA Y, TANAKA T, YOSHIDA N, NARUMIYA S. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 10501–10506.
- [19] INFORZATO A, RIVIECCIO V, MORREALE AP, BASTONE A, SALUSTRIA, SCARCHILLI L, VERDOLIVA A, VINCENTI S, GALLO G, CHIAPPARINO C, PACELLO L, NUCERA E, SERLUPI-CRESCENZI O, DAY AJ, BOTTAZZI B, MANTOVANIA, DE SANTIS R, SALVATORI G. Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. *J Biol Chem* 2008; **283**: 10147–10161.
- [20] JOHNSON J, CANNING J, KANEKO T, PRU JK, TILLY JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; **428**: 145–150.
- [21] KIMURA N, HOSHINO Y, TOTSUKAWA K, SATO E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: Molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; **63**: 327–342.
- [22] KNIGHT PG, GLISTER C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; **132**: 191–206.
- [23] KORNOVSKI BS, MCCOSHEN J, KRENTSER J, TURLEY E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril* 1994; **61**: 935–940.
- [24] KRYSKO DV, DIAZ-FRAILE A, CRIEL G, SVISTUNOV AA, VANDENABEELE P, D'HERDE K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008; **13**: 1065–1087.
- [25] KRZANOWSKA H, LORENC E. Influence of egg investments on *in vitro* penetration of mouse eggs by misshapen spermatozoa. *J Reprod Fert* 1983; **68**: 57–62.
- [26] KRZANOWSKA H. The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. *J Reprod Fert* 1974; **38**: 81–90.
- [27] LAM X, GIESEKE C, KNOLL M, TALBOT P. Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 2000; **62**: 579–588.
- [28] LIU Z, SHIMADA M, RICHARDS JS. The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. *J Assist Reprod Genet* 2008; **25**: 223–228.
- [29] MANTOVANIA A, GARLANDA C, DONI A, BOTTAZZI B. Pentraxins in innate immunity: From C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 1–13.
- [30] MATTIOLI M, BARBONI B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **161**: 19–23.
- [31] MATZUK MM, BURNS KH, VIVEIROS MM, EPPIG JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science* 2002; **296**: 2178–2180.
- [32] MEHLMANN LM, KALINOWSKI RR, ROSS LF, PARLOW AF, HEWLETT EL, JAFFE LA. Meiotic resumption in response to luteinizing hormone is independent of a G_i family G protein or calcium in the mouse oocyte. *Dev Biol* 2006; **299**: 345–355.
- [33] MEHLMANN LM. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; **130**: 791–799.
- [34] MIAO Y-L, LIU X-Y, QIAO T-W, MIAO D-Q, LUO M-J, TAN J-H. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2005; **73**: 1025–1031.
- [35] NESTOR A, HANDEL MA. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract of mice. *Gamete Res* 1984; **10**: 119–125.
- [36] NILSON E, ROGERS N, SKINNER MK. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction* 2007; **134**: 209–221.
- [37] NORRIS RP, FREUDZON M, MEHLMANN LM, COWAN AE, SIMON AM, PAUL DL, LAMPE PD, JAFFE LA. 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* 2008; **135**: 3229–3238.

- [38] OCHSNER SA, DAY AJ, RUGG MS, BREYER RM, GOMER RH, RICHARDS JS. Disrupted function of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. *Endocrinology* 2003; **144**: 4376–4384.
- [39] OCHSNER SA, RUSSELL DL, DAY AJ, BREYER RM, RICHARDS JS. Decreased expression of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology* 2003; **144**: 1008–1019.
- [40] OREN-BENAROYA R, ORVIETO R, GAKAMSKY A, PINCHASOV M, EISENBACH M. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod* 2008; **23**: 2339–2345.
- [41] PARK J-Y, SU Y-Q, ARIGA M, LAW E, JIN S-LC, CONTI M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; **303**: 682–684.
- [42] PENG X-R, HSUEH AJW, LAPOLT PS, BJERSING L, NY T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 1991; **129**: 3200–3207.
- [43] POLAŃSKI Z. Oocyt. W: Kurpisz M [red.] Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków. Poznań: Termedia Wydawn. Med. 2002: 127–144.
- [44] RICHARDS JS, LIU Z, SHIMADA M. Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends Endocrinol Metabol* 2008; **19**: 191–196.
- [45] RICHARDS JS. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cel Endocrinol* 2005; **234**: 75–79.
- [46] RUSSELL DL, OCHSNER SA, HSIEH M, MULDER S, RICHARDS JS. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 2003; **144**: 1020–1031.
- [47] SALUSTRIA, CAMAIONIA, DI GIACOMO M, FULOP C, HASCALL VC. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 1999; **5**: 293–301.
- [48] SALUSTRIA, GARLANDA C, HIRSCH E, DE ACETIS M, MACCAGNO A, BOTTAZZI B, DONIA A, BASTONE A, MANTOVANI G, BECK PECCOZ P, SALVATORI G, MAHONEY DJ, DAY AJ, SIRACUSA G, ROMANIL, MANTOVANIA. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in *in vivo* fertilization. *Development* 2004; **131**: 1577–1586.
- [49] SALUSTRIA, ULISSE S, YANAGISHITA M, HASCALL VC. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells *in vitro* is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 1990; **265**: 19517–19523.
- [50] SALUSTRIA, YANAGISHITA M, HASCALL VC. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 1990; **138**: 26–32.
- [51] SALUSTRIA, YANAGISHITA M, HASCALL VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 1989; **264**: 13840–13847.
- [52] SALUSTRIA, YANAGISHITA M, UNDERHILL CB, LAURENT TC, HASCALL VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 1992; **151**: 541–551.
- [53] SCARCHILLI L, CAMAIONIA, BOTTAZZI B, NEGRI V, DONIA, DEBAN L, BASTONE A, SALVATORI G, MANTOVANIA, SIRACUSA G, SALUSTRIA A. PTX3 interacts with inter- α -trypsin inhibitor: Implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J Biol Chem* 2007; **282**: 30161–30170.
- [54] SCHNEIDER MR, WOLF E. The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: Insights from rodent models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; **19**: 173–181.
- [55] SELA-ABRAMOVICH S, CHOREV E, GALIANI D, DEKEL N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* 2005; **146**: 1236–1244.
- [56] SHIMADA M, HERNANDEZ-GONZALEZ I, GONZALEZ-ROBANYAI, RICHARDS JS. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: Novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol* 2006; **20**: 3228–3239.
- [57] SHIMADA M, YANAI Y, OKAZAKI T, NOMA N, KAWASHIMA I, MORI T, RICHARDS JS. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 2008; **135**: 2001–2011.

- [58] SICINSKI P, DONAHER JL, GENG Y, PARKER SB, GARDNER H, PARK MY, ROBKER RL, RICHARDS JS, MCGINNIS LK, BIGGERS JD, EPPIG JJ, BRONSON RT, ELLEDGE SJ, WEINBERG RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996; **384**: 470–474.
- [59] STERN R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; **13**: 105R–115R.
- [60] SUAREZ SS. The oviductal sperm reservoir in mammals: Mechanisms of formation. *Biol Reprod* 1998; **58**: 1105–1107.
- [61] SUZUKI M, KOBAYASHI H, TANAKA Y, KANAYAMA N, TERAO T. Reproductive failure in mice lacking inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI) – ITI target genes in mouse ovary identified by microarray analysis. *J Endocrinol* 2004; **183**: 29–38.
- [62] TALBOT P, SHUR BD, MYLES DG. Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1–9.
- [63] TALEVI R, GUALTIERI R. *In vivo versus in vitro* fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; **115S**: S68–S71.
- [64] TAMBA S, YODOI R, SEGI-NISHIDAE, ICHIKAWA A, NARUMIYA S, SUGIMOTO Y. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 14539–14544.
- [65] TANGHE S, VAN SOOM A, NAUWYNCK H, CORYN M, DE KRUIF A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; **61**: 414–424.
- [66] THAKUR SC, DATTA K. Higher expression of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR/SF2) during follicular development and cumulus oocyte complex maturation in rat. *Mol Reprod Dev* 2008; **75**: 429–438.
- [67] VACCARI S, HORNER K, MEHLMANN LM, CONTI M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol* 2008; **316**: 124–134.
- [68] VAN BLERKOM J, DAVIS P, THALHAMMER V. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: The influence of cumulus derived nitric oxide. *Mol Hum Reprod* 2008; **14**: 431–444.
- [69] VAN SOOM A, TANGHE S, DE PAUW I, MAES D, DE KRUIF A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Dom Anim* 2002; **37**: 144–151.
- [70] ZHU L, ZHUO L, WATANABE H, KIMATA K. Equivalent involvement of inter- α -trypsin inhibitor heavy chain isoforms in forming covalent complexes with hyaluronan. *Connect Tissue Res* 2008; **49**: 48–55.
- [71] ZHUO L, KIMATA K. Cumulus oophorus extracellular matrix: Its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 2001; **26**: 189–196.
- [72] ZHUO L, YONEDA M, ZHAO M, YINGSUNG W, YOSHIDA N, KITAGAWA Y, KAWAMURA K, SUZUKI T, KIMATA K. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7693–7696.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 06.01. 2009 r.

Przyjęto: 02.04. 2009 r.

Mgr Katarzyna Kotarska

Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu

ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: katarzyna.kotarska@uj.edu.pl

