

Received: 2016.06.23
Accepted: 2017.06.19
Published: 2017.08.13

Funkcja mitochondriów w utrzymaniu płodności żeńskiej

Mitochondrial functionality in female reproduction

Łukasz Gąsior, Regina Daszkiewicz, Mateusz Ogórek, Zbigniew Polański

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Streszczenie

Komórki żeńskiej linii płciowej są źródłem genomu mitochondrialnego dla całego organizmu, zarówno u osobników płci męskiej jak i żeńskiej. W komórkach tych, będących źródłem i nośnikiem mitochondrialnego DNA dla przyszłych pokoleń, mitochondria przechodzą dynamiczne zmiany zarówno ilościowe, jak i jakościowe. Żeńska linia płciowa przechodzi etapy rozwoju, od pierwotnych komórek płciowych poprzez oogonia, oocyty kolejnych rzędów, aby po uzyskaniu odpowiedniej jakości i liczby mitochondriów oraz po zapłodnieniu, stanowić źródło matrycowego mitochondrialnego genomu. Oprócz utrzymywania nienaruszonej matrycy mitochondrialnego genomu z pokolenia na pokolenie, rola mitochondriów w oocytyce jest o wiele bardziej złożona i w plejotropowy sposób warunkuje jakość komórek rozrodczych, a także ich zdolność do podziałów mejotycznych, zapłodnienia, aktywacji oocytu po zapłodnieniu, czy podtrzymania rozwoju zarodka. Obecność prawidłowej liczby funkcjonalnych mitochondriów wpływa również na właściwą implantację i utrzymanie ciąży. W artykule omówiono problemy i nowe osiągnięcia w dziedzinie badań nad funkcją i rolą mitochondriów w żeńskich komórkach rozrodczych.

Słowa kluczowe: mitochondria • oocyt • płodność • starzenie • ROS

Summary

In most animal species female germ cells are the source of mitochondrial genome for the whole body of individuals. As a source of mitochondrial DNA for future generations the mitochondria in the female germ line undergo dynamic quantitative and qualitative changes. In addition to maintaining the intact template of mitochondrial genome from one generation to another, mitochondrial role in oocytes is much more complex and pleiotropic. The quality of mitochondria determines the ability of meiotic divisions, fertilization ability, and activation after fertilization or sustaining development of a new embryo. The presence of normal number of functional mitochondria is also crucial for proper implantation and pregnancy maintaining. This article addresses issues of mitochondrial role and function in mammalian oocyte and presents new approaches in studies of mitochondrial function in female germ cells.

Key words: mitochondria • oocyte • fertility • aging • ROS

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1245164
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3848
Word count:	4909
Tables:	–
Figures:	2
References:	120

Adres autora: mgr Łukasz Gąsior, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii UJ, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków; e-mail: lukasz.gasior@doctoral.uj.edu.pl

WPROWADZENIE

Liczba oocytów zamkniętych w pęcherzykach pierwotnych w jajniku człowieka w okresie pokwitania sięga 300 tys. Pęcherzyki te przez cykliczną stymulację hormonami przysadki mózgowej podlegają owulacji lub atrezji, co wiąże się ze stopniową utratą rezerwy jajnikowej wraz z wiekiem matki [69]. Ograniczona rezerwa jajnikowa, czyli obniżona liczba pęcherzyków jajnikowych, które dają początek komórkom jajowym, to jedna z coraz częściej występujących przyczyn niepłodności. Utrzymanie odpowiedniej liczby pęcherzyków jajnikowych zależy nie tylko od hormonów, ale także od czynników egzogennych, takich jak ksenobiotyki i leki antynowotworowe, które mogą bezpośrednio zaburzyć funkcjonowanie jajnika lub jakość samych oocytów. Za utratę rezerwy jajnikowej mogą odpowiadać również czynniki endogenne np.: zespoły metaboliczne, endometriozą, zespół policystycznych jajników (polycystic ovary syndrome - PCOS) [103]. Obecnie przypuszcza się, że wymienione czynniki mogą upośledzać funkcjonowanie mitochondriów, powodując utratę pęcherzyków jajnikowych i jakości samych oocytów. Replikacja mitochondrialnego genomu (mtDNA) w oocyty zachodzi na skalę wielokrotnie większą, niż w jakichkolwiek innych komórkach organizmu. Dlatego defekty w obrębie mtDNA w rosnącym oocyty mogą doprowadzić do klonalnego wzrostu poziomu mutacji mtDNA i problemów metabolicznych w dorosłym wieku. Ponadto, funkcja mitochondriów nierozdzielnie wiąże się ze zjawiskiem powstawania wolnych rodników, które w istotny sposób mogą oddziaływać na jakość genomu zarówno mitochondrialnego, jak i jądrowego.

ROLA MITOCHONDRIOW W KOMÓRKACH ŻEŃSKIEJ LINII PŁCIOWEJ SSAKÓW

Mitochondria odgrywają ważną rolę w wielu procesach komórkowych, włączając w to magazynowanie energii w postaci trójfosforanu adenozy (ATP), regulację poziomu wapnia w komórce, programowaną śmierć komórki (apoptozę) oraz starzenie się komórek. Ponadto, mitochondria kontrolują różnicowanie się komórek i cykl komórkowy, a także warunkują prawidłowe podziały komórkowe, dlatego też pełnią tak ważną rolę w rozwoju organizmów.

Mitochondria ssaków zawierają dwuniciową, kolistą cząsteczkę DNA o długości około 16 500 par zasad (człowiek 16 569, mysz 16 299). Wewnętrzna nić bogata w cytozyny to tzw. nić lekka (L), natomiast zewnętrzna nić komplementarna, bogata w guaninę jest określana jako nić ciężka (H). Ssaczy genom mitochondrialny koduje 37 genów. Wśród nich znajduje się 13 białek szlaku fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) [19]. Do białek szlaku, kodowanych przez genom mitochondrialny, zaliczają się podstawowe czynniki niezbędne w procesach komórkowych: siedem podjednostek kompleksu I (dehydrogenaza NADH), jedna podjednostka kompleksu III (oksydoreduktazy koenzymu Q-cytochrom c), trzy podjednostki kompleksu IV (oksydazy cytochromu c), a także dwie podjednostki kompleksu V (F₀F₁-syntazy ATP). Pozostałe podjednostki i białka szlaku OXPHOS są kodowane przez genom jądrowy. Oprócz białek, genom jądrowy koduje także 22 mitochondrialne tRNA oraz dwie podjednostki mitochondrialnych rybosomów 12S i 16S rRNA. Niekodujący region nazwany pętlą D zawiera zarówno promotor transkrypcji mtDNA, jak i miejsce rozpoczęcia replikacji [19]. Ta ostatnia prowadzona jest przez swoistą dla mtDNA polimerazę POLG (polimeraza- γ) [12]. Jądrowy czynnik oddechowy 1 (nuclear respiratory factor-1 - NRF1) oraz mitochondrialny czynnik transkrypcyjny (mitochondria transcription factor A - TFAM) regulują wspólnie transkrypcję i replikację mitochondrialnego DNA [14]. Oocyty o niskiej ekspresji TFAM i NRF1 mają niewielkie możliwości rozwojowe [78]. Wskazuje to na istotną rolę mechanizmu replikacyjnego mitochondriów w oocytych w utrzymaniu płodności.

Mitochondria oocytów różnią się od mitochondriów komórek somatycznych, są okrągłe lub owalne i mają gęstą macierz mitochondrialną z bardzo małą liczbą grzebieni mitochondrialnych [73]. Podobnie też wzrasta poziom fosforylacji oksydacyjnej [75]. Brak zwiększenia potencjału błony mitochondrialnej w mitochondriach oocytów jest związany z obniżonym stężeniem ATP oraz spadkiem potencjału rozwojowego oocytów [1]. Analogicznie, wraz ze wzrostem potencjału błonowego i poziomu fosforylacji oksydacyjnej w fazie wzrostu oocyty rośnie również stężenie ATP [75], a oocyty o wyższym poziomie ATP wykazują większe zdolności do zapłodnienia i rozwoju embrionalnego [75].

Podczas dojrzewania oocytu mitochondria są relokowane do różnych regionów, prawdopodobnie w odpowiedzi na potrzeby energetyczne komórki [8]. Mitochondria są tworamami niezwykle dynamicznymi i podlegającymi fuzji, podziałom oraz degradacji, by zastąpić uszkodzone organelle i zaspokoić ciągle zmiany zapotrzebowania komórki na energię [79]. Oocyty mogą zmieniać lokalne zagęszczenie mitochondriów w różnych wewnątrzkomórkowych przedziałach, co umożliwia im reagowanie na zmieniające się wewnątrzkomórkowe potrzeby podczas procesu wzrostu i podziałów mejotycznych [118]. Dlatego w oocytach dzielą się na dwie subpopulacje wyróżnione ze względu na potencjał błony mitochondrialnej. Jedna z subpopulacji cechuje się niskim MMP i dominuje w oocycie, zajmując głównie centralną jego część, natomiast druga o wysokim potencjale błony mitochondrialnej tworzy klastry w subplazmatycznej/perykorytalnej cytoplazmie oocytów i wczesnych blastomerów. Utrata mitochondriów o wysokim MMP zaburza podziały, co może się wiązać z nieprawidłową regulacją jonów wapniowych oraz szlaków zaangażowanych w aktywację oocytu i kontrolujących wczesną embriogenezę [107]. Podczas wzrostu oocytu ustalenie wewnątrzcytoplazmatycznych przedziałów o wysokim i niskim potencjale ($\Delta\Psi_m$) wewnętrznej błony mitochondrialnej odzwierciedla funkcjonalną różnorodność mitochondriów wewnątrz oocytu i prawdopodobnie jest regulowana przez obecność i aktywność komórek folikularnych otaczających oocyt [109]. W przedowulacyjnym oocycie jajnikowym zdolnym do podjęcia mejozy, w odpowiedzi na bodziec hormonalny, mitochondria układają się w klastry wokół jądra komórkowego zwanego pęcherzykiem zarodkowym (germinal vesicle - GV). Zapewnia to odpowiednią ilość ATP niezbędną do rozpadu otoczki jądrowej i zapoczątkowania kondensacji chromosomów [118]. Poziom ATP następnie spada, ale wciąż jest podwyższony w stosunku do stanu wyjściowego. W dalszym przebiegu mejozy, wraz z wkroczeniem w metafazę, obserwuje się redystrybucję mitochondriów w pobliżu tworzącego się wrzeciona podziałowego, a także do centrów organizacji mikrotubul [118]. W tej fazie aktywność mitochondriów osiąga kolejny szczyt podczas anafazy pierwszego podziału mejotycznego i wyrzucania ciała kierunkowego, bezpośrednio poprzedzających wejście oocytu w metafazę drugiego podziału mejotycznego (MII) [118].

Przejawem wzrostu aktywności mitochondriów w oocycie jest także wzrost wytwarzania wolnych form tlenu (radical oxygen species - ROS) głównie O_2^- i H_2O_2 , które powstają podczas transportu elektronów w procesie fosforylacji oksydacyjnej [28]. ROS są jedną z przyczyn powstawania mutacji i uszkodzeń zasad azotowych zarówno w genomie mitochondrialnym, jak i jądrowym [2,71]. Jednak wolne formy tlenu są również nieodłącznym elementem cyklu komórkowego oocytu. Uważa się, że ROS powstające wskutek zwiększonej aktywności mitochondriów w oocycie po ukończeniu fazy wzrostu mają udział w regulacji przejścia oocytu z fazy, w której pozostają zablokowane w diplotenie do metafazy pozwalając na wyrzucenie pierwszego ciała kierunkowego [100]. Te

same wolne formy tlenu uczestniczą też w naturalnym procesie śmierci oocytu, w procesie tzw. starzenia poowulacyjnego oocytu po zakończeniu jego cyklu komórkowego, gdy nie dojdzie do zapłodnienia [82].

Replikacja mitochondriów nie zachodzi, aż do osiągnięcia przez zarodek etapu blastocysty. Zapłodnienie i wczesne podziały zarodkowe zależą więc od puli mitochondriów nagromadzonych w oocycie do chwili owulacji [31]. Po zapłodnieniu, mitochondria komórek formującego się zarodka stają się bardziej wydłużone o większej liczbie grzebieni mitochondrialnych i mniejszej gęstości macierzy. Jednocześnie mitochondria komórek zarodka zużywają więcej tlenu i glukozy niż mitochondria oocytu [39]. Badania na preimplantacyjnych zarodkach myszy wskazują, że liczba mitochondriów w komórkach węzła zarodkowego (ICM), z których powstanie właściwy zarodek może być mniejsza niż w komórkach trofoektodermi formującej tkanki pozazarodkowej. Dane te wskazują, że mitochondria różnią się także strukturalnie i funkcjonalnie między tymi dwiema liniami komórkowymi. Trofoektoderma cechuje się mitochondriami o wysokim potencjale błonowym wewnętrznej błony mitochondrialnej, większym wytwarzaniem ATP i bardziej efektywnym zużyciem tlenu. Morfologicznie mitochondria komórek trofoektodermi są bardziej wydłużone i zawierają większą liczbę grzebieni mitochondrialnych, podczas gdy mitochondria komórek ICM zachowują kulisty kształt i mają niewielką liczbę krist mitochondrialnych, a także są bardziej wyciszzone, zużywają mniej tlenu i wytwarzają mniej ATP [104]. Według koncepcji wyciszzonego zarodka „Quiet Embryo Hypothesis” utrzymanie wewnętrznej masy komórek zarodka w stanie obniżonego metabolizmu pozwala na ochronę struktur budujących ciało przyszłego organizmu przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [7]. Koncepcję tę potwierdzają obserwacje, w których stwierdzono podwyższenie poziomu metabolizmu ICM w stosunku do komórek wchodzących w skład struktur pozazarodkowych. Taki stan rzeczy można uzyskać narażając zarodki na stres oksydacyjny lub zmiany temperatury w środowisku. Wtedy obserwuje się obniżenie kompetencji rozwojowych zarodków oraz podwyższenie liczby komórek apoptotycznych wchodzących w skład zarodka [58].

Mitochondria pełnią także funkcję cytoplazmatycznych buforów wapnia. Zwiększone cytoplazmatyczne stężenie wapnia jest niezbędne do aktywacji oocytu i rozwoju zarodkowego po zapłodnieniu [105]. Podczas zapłodnienia funkcjonujące i nienaruszone mitochondria są niezbędne w szlaku sygnalizacji wapniowej zachodzącej w oocycie po wnikięciu plemnika, koniecznej do aktywacji oocytu. Wzrost stężenia wapnia pośredniczy w aktywacji kinazy II zależnej od kalmoduliny, degradacji inhibitora mejozy EMI2 i aktywacji czynnika promującego anafazę APC/cyklosom. Inicjując anafazę II i wyrzucanie drugiego ciała kierunkowego [46]. Odpowiednia liczba aktywnych mitochondriów jest również wymagana do tzw. „wybuchu aktywności mitochon-

driów”, prowadzącego do skokowego wzrostu zawartości ATP w komórkach, co jest niezbędne do podtrzymania rozwoju zarodka do stadium blastocysty [111].

DZIEDZICZENIE MITOCHONDRIALNEGO DNA

Oszacowanie liczby kopii mtDNA i mitochondriów w jednej komórce, jest bardzo trudne ze względu na bardzo dużą zmienność tej liczby przypadającej na jeden oocyt. Uważa się jednak, że w oocytach każde mitochondrium zawiera po jednej kopii mtDNA [20]. Większość ssaków dziedziczy tylko ten mitochondrialny DNA, który znajdował się w komórce jajowej podczas zapłodnienia [23]. U ssaków plemnik wnika do wnętrza oocytu wraz z mitochondriami [5]. Mitochondria plemnika są niszczone wewnątrz zarodka w proteasomach, w szlaku zależnym od ubikwityny [84]. Jeśli mitochondria nie zostaną zniszczone może dojść do tzw. zjawiska heteroplazmii, które polega na funkcjonowaniu dwóch haplotypów mitochondriów w jednej komórce, co może zaburzyć jej funkcjonowanie i prowadzić do rozwoju chorób mitochondrialnych u potomstwa [76]. Nawet samice gatunków z podwójnie uniparentnym systemem dziedziczenia mitochondriów dziedziczą mitochondria tylko od samic, podczas gdy samce dziedziczą mitochondria od obu płci [37]. Tak wyewoluowany sposób dziedziczenia może stanowić ochronę przed przekazywaniem wielu uszkodzeń mitochondrialnego DNA, wywołanych działaniem wolnych rodników, które powstają podczas spermatogenezy, przy relatywnie niskim stężeniu białek naprawczych w plemniku [3]. Niektóre badania wskazują jednak, że niewielka liczba mitochondriów pochodzenia ojcowskiego może być dziedziczona i w sposób losowy trafiać do komórek zarodka. W porównaniu z liczbą mitochondriów w oocycie, która nierzadko przekracza 200 000 kopii mtDNA u myszy, czy nawet 700 000 kopii mtDNA u ludzi [64,95], jest to jednak ilość znikoma. Ponieważ warunkiem zachowania potencjału rozwojowego jest utrzymanie jak największej liczby funkcjonalnych mitochondriów, oocyty podczas asymetrycznych podziałów mejotycznych mają aktywny system pozwalający na zachowanie jak największej liczby kopii mtDNA wewnątrz oocytu. Jest to możliwe dzięki aktywnemu ograniczaniu liczby mitochondriów trafiających do ciała kierunkowego w telofazie pierwszego podziału mejotycznego przez ich sortowanie z udziałem białek motorycznych kinezyn i dynein [25].

Największy wzrost mtDNA w oocycie następuje właśnie od stadium pęcherzyka pierwotnego do stadium pęcherzyka antralnego, a więc w okresie, w którym zachodzi także faza wzrostu. Ekspresja polimerazy γ oraz czynnika transkrypcyjnego A (mitochondrial transcription factor A – Tfam) rośnie podczas wzrostu oocytu i ulega wyciszeniu po osiągnięciu przez oocyt pełnych rozmiarów. Jednocześnie liczba kopii mtDNA w oocycie już nie wzrasta [66]. Wprawdzie ekspresja Tfam wzrasta ponownie w oocytach metafazowych, ale jest to najprawdopodobniej związane ze zwiększoną transkrypcją mtDNA

(regulowaną m.in. przez Tfam) ze względu na wzrost zapotrzebowania na energię i nie wiąże się z dalszym wzrostem liczby kopii mtDNA [36]. Jakkolwiek, niektóre badania wskazują na możliwość niewielkiego wzrostu liczby mtDNA, jeszcze w oocytach metafazowych [20], to po zapłodnieniu replikacja mtDNA ustaje, by zostać wznowiona dopiero około fazy implantacji, kiedy to zarodek zaczyna rosnąć [103].

KOMÓRKI GRANULOZY REGULUJĄ FUNKCJE MITOCHONDRIÓW W OOCYCE

W badaniach dotyczących jakości oocytów istotne jest uwzględnienie roli towarzyszących im komórek somatycznych, czyli komórek folikularnych. Stres genotoksyczny związany np. z radioterapią czy chemioterapią, może doprowadzić do utraty rezerwy jajnikowej, a co za tym idzie bezpłodności i przedwczesnej menopauzy w wyniku gwałtownej atrezji uszkodzonych pęcherzyków jajnikowych [94]. Za taki stan rzeczy mogłyby odpowiadać właśnie komórki folikularne. Wiadomo, że komórki folikularne mogą ochraniać oocyt przed działaniem stresu oksydacyjnego przez zwiększanie stężenia glutationu w oocytach oraz innych enzymów antyoksydacyjnych w oocycie, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD1), czy katalaza [16]. Analiza transkryptomu i proteomu komórek folikularnych jest również uznawana za biomarker pozwalający na nieinwazyjną metodę oceny kompetencji rozwojowych oocytów i zarodków [6]. Okazuje się, że komórki somatyczne mają podstawowe znaczenie w funkcjonowaniu oocytów, a także zawartych w nich mitochondriów. Oocyty wraz z komórkami folikularnymi dwukierunkowo regulują poziom swojego metabolizmu i aktywność mitochondriów. Do dwukierunkowego oddziaływania oocytu i komórek folikularnych można zaliczyć oddziaływanie parakryne oraz bezpośrednią wymianę metabolitów i cząsteczek sygnałowych między oocytami i komórkami pęcherzykowymi poprzez złącza szczelinowe (gap junctions – GJ). Do głównych czynników zaangażowanych w komunikację parakrynną można zaliczyć swoiste dla oocytu czynniki wzrostu z rodziny TGF- β , np. dziewiąty czynnik wzrostu i różnicowania (GDF9) i białka morfogenetyczne kości (BMPs), które są wydzielane przez oocyt. Czynniki te są odpowiedzialne za powstawanie kontaktujących się z oocytami cytoplazmatycznych wypustek komórek ziarnistych (transzonal projections – TZPs), na końcu których powstają połączenia szczelinowe i połączenia adhezyjne [59]. Jednym z białek z rodziny BMP wydzielanych przez oocyt jest 15 białko morfogenetyczne kości (BMP15), które wpływa na metabolizm energetyczny i wytwarzanie cholesterolu w komórkach folikularnych, a także działa na komórki folikularne antyapoptotycznie [47,59]. Komórka jajowa może także wydzielać interleukinę 7, która funkcjonuje jako czynnik hamujący proces apoptozy w komórkach pęcherzykowych przez regulację szlaku kinaz PIK3/AKT [18]. Szlak PIK3/AKT może również kontrolować poziom wolnych rodników i aktywność mitochondriów w komórce [24,39]. Natomiast komórki folikularne mogą wydzielać wiele czynników wchodzących w skład płynu pęcherzykowego,

takich jak neuregulina 1 (NRG1), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1), czy epidermalny czynnik wzrostu (EGF). Czynniki te odpowiadają za utrzymanie kompetencji rozwojowych oocytów i zarodków przez modulowane poziomy metabolizmu oraz zwiększanie liczby kopii mitochondrialnego DNA w oocyty [67,86]. Poprzezdzające owulację wznowienie procesu mejozy następuje wraz z zamknięciem połączeń szczelinowych łączących oocyt z komórkami folikularnymi, co powoduje spadek wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. Spadek stężenia cAMP jest sygnałem do rozpadu otoczki jądrowej i wejścia oocytu w fazę M cyklu komórkowego, co koreluje ze wzrostem aktywności mitochondriów i wytwarzaniem ATP [118,119].

Określona liczba komórek folikularnych, które nie uległy apoptozie, jest konieczna do utrzymania kompetencji rozwojowych oocytu [41]. Charakterystyczna morfologia mitochondriów w oocytach wskazuje na ich małą aktywność, co może być kompensowane przez dużą liczbę mitochondriów zawartych w każdej komórce [17,85,91]. Mitochondria w komórkach pęcherzykowych bardzo aktywnie prowadzą glikolizę, charakteryzują się obecnością wielu grzebieni mitochondrialnych i jasną macierzą mitochondrialną, podczas gdy mitochondria rosnących oocytów mają niewiele grzebieni, gęstą macierz i wykorzystują głównie substraty energetyczne (pirogronian i mleczan) dostarczane z komórek folikularnych [97]. Wzrostowi poboru pirogronianu towarzyszy zwiększony pobór tlenu podczas dojrzewania oocytu [44]. Badania poziomu ATP w pojedynczych oocytach wykazały znaczące obniżenie zawartości ATP w oocytach pozbawionych komórek towarzyszących. Podobny skutek zaobserwowano w przypadku blokowania rozwoju połączeń szczelinowych między oocytom a komórkami folikularnymi [26]. Poza pirogronianem i mleczanem, do oocytu dostarczany jest również NADPH, który pełni ważną rolę w utrzymaniu homeostazy ROS, bowiem jest głównym kofaktorem enzymów, takich jak reduktaza glutationu (GSR) i transferaza glutationu. Enzymy te pełnią istotną funkcję w redukcji utlenionego glutationu (GSSG) do glutationu (GSH) zaangażowanego w zwalczaniu wolnych rodników [97]. Wiadomo, że komórki folikularne mogą ochraniać oocyt przed działaniem stresu oksydacyjnego przez zwiększanie stężenia glutationu w oocytach [98]. Komórki folikularne utrzymują także wyższy poziom innych enzymów antyoksydacyjnych w oocyty, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza [16]. Sugerowano, że jakość komórek folikularnych mogłaby być uznawana za biomarker kompetencji rozwojowych oocytów [6]. Jednak komórki folikularne mogą także indukować starzenie się oocytów i ich śmierć przez oddziaływania parakryne [115].

Starzenie poowulacyjne objawia się twardnieniem osłonki przejrzystej, spadkiem aktywności głównych elementów kontroli cyklu komórkowego, takich jak czynnik promujący fazę M (MPF), czy kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK). Dochodzi także do zaburzeń w sygnalizacji wapniowej w komórce powodujących wzrost ekspresji bcl-2,

wyrzucenie z mitochondriów cytochromu c i aktywacji apoptozy oocytów w szlaku mediowanym przez kaspazy [10,63]. Starzenie się owulowanych oocytów może być zapoczątkowane przez apoptozę komórek folikularnych, które w znacznym stopniu mogą regulować dalszy przebieg tego procesu. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że obecność komórek folikularnych znacząco przyspiesza tempo poowulacyjnego starzenia się oocytów oraz obniża aktywność MPF zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* [72,83]. Dodanie komórek folikularnych do „nagich oocytów” w hodowli *in vitro* przyspiesza proces utraty ich kompetencji rozwojowych, być może w wyniku wydzielania przez komórki folikularne wolnych sfingolipidów i ceramidów [55,115].

Wiadomo, że główne czynniki wymieniane między oocytom a komórkami folikularnymi przez połączenia szczelinowe w fazie wzrostu oocytu, takie jak: NO, cAMP, cGMP, oprócz kontroli przebiegu mejozy, bezpośrednio regulują poziom ROS w oocyty oraz aktywność samych mitochondriów [71,101]. Redukcja liczby tych cząsteczek sygnalizacyjnych podnosi poziom ROS w oocyty, co może zdestabilizować błony mitochondrialne, zaburzyć poziom wolnego wapnia w oocyty, a przez to zaburzyć równowagę białek BAX/Bcl2, w błonie mitochondrialnej, wyrzucenie cytochromu c i zainicjowanie mediowanej kaspazami apoptozy oocytu (ryc.1) [101]. Uważa się, że oocyt może wydelać czynniki proapoptotyczne z mitochondriów znajdujących się w ooplazmie do otaczających komórek ziarnistych. Następtwem tego procesu może być utrata homogenego ułożenia mitochondriów w cytoplazmie komórek somatycznych otaczających oocyt, co koreluje ze zwiększeniem aktywności mitochondriów w tych komórkach oraz ich apoptozą [113]. Wiadomo, że nie owulacja, lecz przede wszystkim atrezja odpowiada za ubytek liczby oocytów w czasie starzenia się organizmu [68]. Perez i wsp. w 2007 r. wykazali, że myszy niemające proapoptotycznego genu *Bax* zachowują płodność do późnej starości [80]. Zwiększona apoptoza komórek folikularnych jest związana także z większą liczbą pęcherzyków pozbawionych oocytu i niską jakością samych oocytów [51]. Komórki folikularne pozbawione receptora androgenów wykazują zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów, co gwałtownie obniża zdolność oocytów do ukończenia mejozy [114]. Mimo że komórki pęcherzykowe i oocyt wydają się dwukierunkowo regulować homeostazę ROS, aktywność mitochondriów oraz poziom ATP, nie wykazano związku między replikacją genomu mitochondrialnego a obecnością komórek folikularnych. Oocyty pozbawione somatycznych komórek towarzyszących wykazują wzrost ilości mtDNA mimo zatrzymania wzrostu oocytu [66].

Reasumując, komórki folikularne mogą w istotny sposób wpływać na jakość mitochondriów i samych oocytów. Jakość mitochondriów spada także wraz z wiekiem w samych komórkach folikularnych, co obniża kompetencję i jakość oocytów [9]. Jakość mitochondriów komórek folikularnych może stwarzać poważne ograniczenia

wracają prawidłowe funkcjonowanie oocytów pacjentek w starszym wieku [10]. Proces ten jest związany ze wzrostem liczby tzw. „starych oocytów”, które nie są zdolne do ukończenia podziału mejotycznego, zapłodnienia i podtrzymania rozwoju zarodka oraz z wyczerpywaniem się rezerwy jajnikowej [29]. Wiadomo, że starzenie się organizmów jest skorelowane z zaburzeniem funkcji mitochondriów, szczególnie w niedzieliących się komórkach, takich jak jajnikowe oocyty [30]. W starzejących się jajnikach rośnie poziom stresu oksydacyjnego, co wiąże się ze wzrostem uszkodzeń oksydacyjnych lipidów, białek i DNA. Dotyczy to oocytów, komórek tworzących pęcherzyki jajnikowe, komórek zrębu oraz komórek śródmiąższowych jajnika [60]. Jednocześnie procesowi temu towarzyszy spadek ekspresji enzymów antyoksydacyjnych [60]. Natomiast zmiany w genach związanych z procesem OXPHOS prowadzą do wzrostu stresu oksydacyjnego, obniżenia poziomu ATP w komórkach i mogą spowodować niewydolność jajników oraz utratę ich funkcji [110]. Ponadto, wraz z wiekiem matki spada liczba kopii mtDNA, co dodatkowo może ograniczać poziom ATP i kompetencje rozwojowe oocytów [50,56]. Towarzyszący temu procesowi wzrost liczby mutacji w mtDNA wykazuje odwrotną korelację z poziomem zapłodnienia oraz rozwojem zarodków. Inne badania wskazują na silny związek między zawartością mtDNA w oocyte, a zdolnością oocyty do aktywacji, co przekłada się na liczbę uzyskiwanych zarodków [91,96]. Oocyty Tfam+/-, które wykazują zaburzenia w replikacji genomu mitochondrialnego mogą się rozwijać prawidłowo do stadium blastocysty mimo znacznie zmniejszonej liczby kopii mtDNA, ale próg krytyczny 40 000-50 000 kopii mtDNA jest niezbędny do właściwego rozwoju poimplantacyjnego [111]. Chociaż liczba kopii mtDNA jest często uznawana jako marker jakości i kompetencji rozwojowych oocytów nie odzwierciedla jednak ich stanu w komórce. Niektóre badania wskazują na podwyższenie ilości mtDNA w oocytach samic cierpiących na zaburzenia metaboliczne związane z otyłością czy dietą wysokotłuszczową [48,65], dlatego w niektórych przypadkach wzrost liczby mitochondriów może być mechanizmem kompensującym spadek ich jakości. Z tego powodu liczba kopii mtDNA nie zawsze jest dobrym markerem jakości samych oocytów [48].

Zgodnie z omawianą koncepcją, ochrona przed działaniem tego rodzaju czynników stresowych powinna być priorytetem w technikach wspomaganego rozrodu. Jednak w celu zwiększenia liczby owulowanych oocytów w technikach wspomaganego rozrodu stosuje się hormonalną hiperstymulację jajników obniżając jakość uzyskiwanych komórek. Otrzymane oocyty cechują się wyższym poziomem delecji w obrębie mtDNA w porównaniu z oocytami owulowanymi w sposób naturalny [38]. Prowadzenie hodowli oocytów poza organizmem matki może doprowadzić do zmiany ekspresji niektórych genów mitochondrialnych oraz częstszych mutacji w obrębie genomu mitochondrialnego. Odpowiednia zawartość ATP w oocytach MII w komórce została określona jako warunek konieczny do prawidłowego zapłodnienia oocyty i rozwoju zarodków, a nawet do udanego zabiegu krioprezewacji oocytów w technikach wspomaganego rozrodu

[128]. Zarówno liczba kopii mtDNA jak i związany z nią poziom ATP w oocytach ssaków są uznawane za markery jakości oocytów. Oocyty o mniejszej liczbie kopii mtDNA czy związanym z tym spadkiem poziomu ATP, cechują się mniejszymi kompetencjami rozwojowymi. Wtedy obserwuje się obniżenie liczby zapłodnionych oocytów i uzyskanych zarodków w stadium blastocysty. Uważa się również, że odpowiedni poziom mtDNA i ATP jest konieczny podczas implantacji zarodka i rozwoju łożyska [108,111,112]. Zgodnie z tym mitochondria są organellami szczególnie podatnymi na czynniki stresowe i utratę swoich funkcji na skutek starzenia się organizmu. Jak wiadomo, problem niepłodności dotyczy głównie kobiet w zaawansowanym wieku reprodukcyjnym i w wielu przypadkach może być konsekwencją nieprawidłowości w funkcjonowaniu mitochondriów. Ponadto zawartość tlenu w macicy i jajo-wodzie wynosi 2-8%, podczas gdy w warunkach *in vitro* przekracza 20%. Wydłuża to czas osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty i opóźnia czas implantacji, a także drastycznie podnosi wytwarzanie ROS [34,52]. Mutacje w genomie mitochondrialnym zostały określone jako przyczyna wielu schorzeń wieku postnatalnego związanych z zaburzeniami metabolicznymi, nowotworzeniem, czy aberracjami chromosomowymi [10]. Mutacje mitochondrialne, których częstość wzrasta z wiekiem, zostały również określone, jako prawdopodobna przyczyna powstawania zespołu policystycznych jajników, choroby upośledzającej prawidłowe funkcjonowanie jajników i dotykającej ponad 6% kobiet w wieku reprodukcyjnym. Wiadomo, że PCOS jest skorelowany z podwyższonym poziomem wolnych rodników i zaburzeniem homeostazy antyoksydantów w jajniku. Często towarzyszy również typowym dla zaburzeń mitochondrialnych zespołom metabolicznym związanymi z insulinoopornością, hiperinsulinemią, otyłością i cukrzycą typu 2 [116]. Wymienione wyżej nieprawidłowości związane z dietą, wiekiem i otyłością również zostały skorelowane z zaburzeniami mitochondrialnymi w komórkach jajowych, ze wzrostem aneuploidii oraz poronień i nieprawidłowości rozwojowych potomstwa [40].

ŹRÓDŁO MUTACJI MITOCHONDRIALNYCH

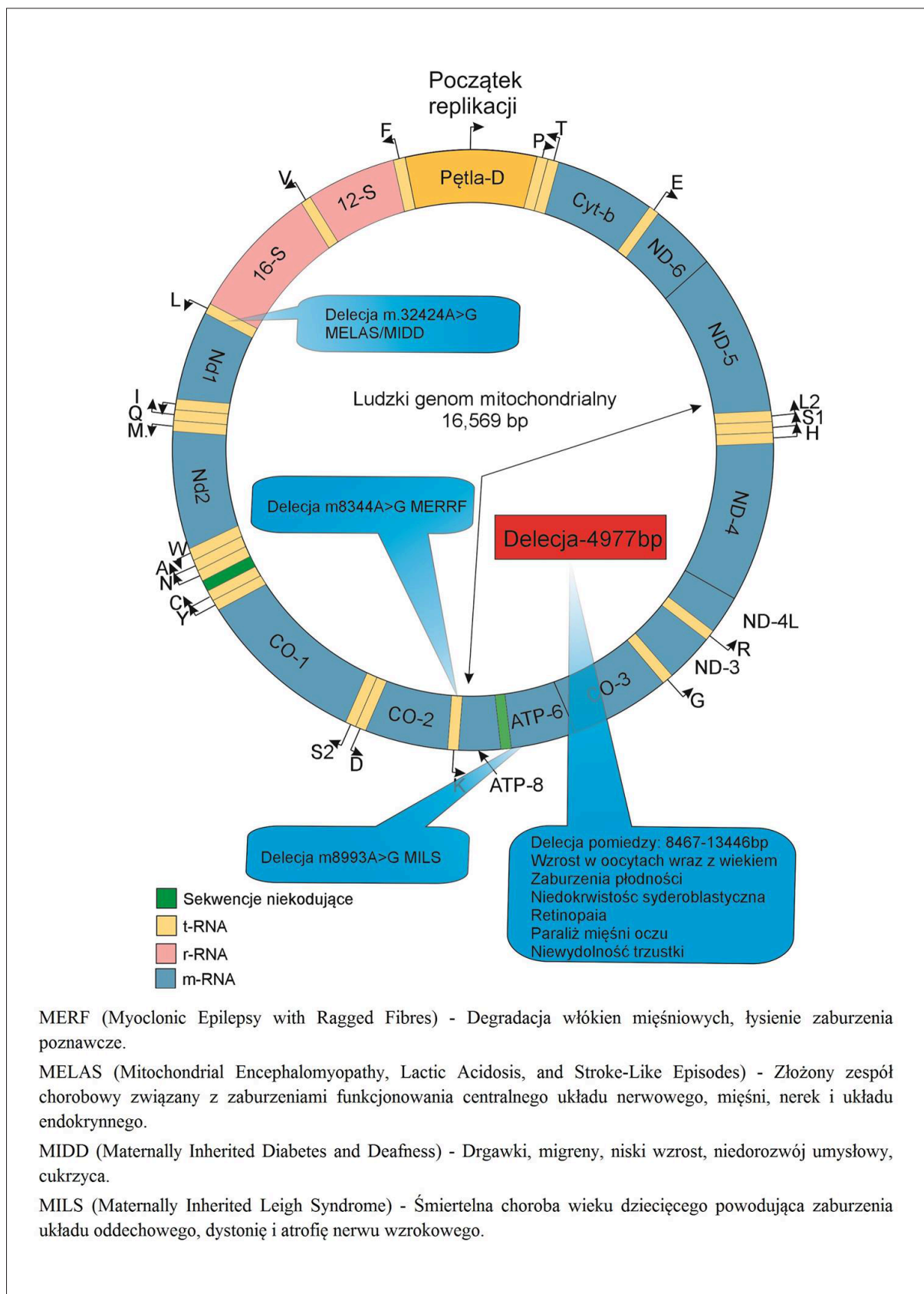
Istnieje koncepcja, według której głównym powodem pojawienia się w toku ewolucji oocyty, jako dużej nieruchliwej komórki jest możliwość utrzymywania obniżonej aktywności mitochondriów będących rezerwuarem matrycowego, mitochondrialnego genomu przechowywanego dla komórek potomnych [26,54]. Koncepcja ta wskazuje na ważną rolę mitochondriów w powstaniu płci, a także stanowi podstawę do rozważań nad kierunkami badań prowadzonych nad biologią rozrodu, stawiających sobie za cel ochronę jakości gamet i walkę z niepłodnością. Zgodnie z tą hipotezą mitochondria oocytów mają słabo rozwinięte grzebienie mitochondrialne [92] oraz niski potencjał błony mitochondrialnej, co zabezpiecza je przed mutacjami w mtDNA, które mogłyby powstawać w wyniku działania wolnych form tlenu [54]. Transport elektronów w mitochondriach wywołuje powstawanie mutagennych wolnych rodni-

ków, powodując nagromadzenie mutacji w mitochondrialnym DNA w ciągu życia [27]. Wolne rodniki istnieją bardzo krótko i aktywnie reagują z wieloma składnikami organicznymi komórki włączając w to białka, lipidy i kwasy nukleinowe [60]. Uważa się, że oprócz działania wolnych rodników główną przyczyną powstawania mutacji mitochondrialnych są błędy podczas replikacji mtDNA [120]. Powstałe błędy są następnie powielane klonalnie wraz z kolejnymi replikacjami uszkodzonej cząsteczki [32]. Tworzenie się wolnych rodników i dysfunkcje mitochondriów są również odpowiedzialne za poowulacyjne starzenie się oocytów [63]. Mutacje mtDNA wpływają również na starzenie się jajników, który jest procesem odmiennym i polegającym na utracie rezerwy jajnikowej tworzącej pulę komórek rozrodczych wykorzystywanych przez okres rozrodczy kobiety. Rezerwa jajnikowa nie podlega odnowie w okresie postnatalnym i stopniowo się wyczerpuje w kolejnych cyklach owulacyjnych, na skutek atrezji pęcherzyków jajnikowych oraz utraty oocytów w kolejnych cyklach owulacyjnych. Następstwem tego procesu jest wejście kobiet w okres menopauzy [33]. Wiadomo, że mutacje mtDNA mogą być związane z przedwczesną menopauzą z powodu utraty rezerwy jajnikowej, a najnowsze badania jako przyczynę tego zjawiska wskazują utratę funkcji komórek folikularnych [11,102].

Wiele przykładów dotyczących wpływu uszkodzeń mtDNA na funkcjonowanie organizmu pochodzi z badań tzw. myszy mutatorowej (mtDNA mutator mice), która ma zmutowaną podjednostkę polimerazy γ , odpowiedzialną za syntezę pozajądrowego DNA. W wyniku błędów zmutowanej polimerazy obserwuje się liczne punktowe mutacje w obrębie mtDNA, formowanie się liniowych cząsteczek z dużymi fragmentami ulegającymi delecji oraz cząsteczek ze zwielokrotnionym regionem niekodującym, który kontroluje funkcjonowanie genomu mitochondrialnego [4]. Takie myszy wykazują fenotyp przedwczesnego starzenia się z wieloma objawami typowymi dla wieku podeszłego. U myszy takich obserwuje się zmniejszenie żywotności do 42-43 tygodni, utratę masy ciała, masy mięśniowej oraz podskórnej tkanki tłuszczowej. Zaobserwowano również zmniejszenie płodności, zaburzenia słuchu, niedokrwistość oraz anemię [77]. Innym skutkiem obserwowanym u myszy mutatorowych jest niemal zupełny brak rekombinacji w obrębie mtDNA [81] (apomictic pathogens), która jest głównym mechanizmem zapewniającym integralność genomu w oocytach [15]. Myszy heteroplazmatyczne obarczone zdefiniowanym zestawem mutacji nie wykazują rekombinacji w obrębie cząsteczek mtDNA nawet po 50 pokoleniach. Taka obserwacja wskazuje na brak rekombinacyjnych mechanizmów naprawczych, które mogłyby redukować poziom mutacji w komórkach z uszkodzonym genomem mitochondrialnym (mechanizmy napraw przez homologiczną rekombinację stanowią podstawowy mechanizm utrzymujący integralność genomu jądrowego) [43]. Mitochondrialny DNA z powodu pozbawienia białek histonowych jest 10-50 razy bardziej narażony na uszkodzenia niż DNA

jądrowy [62]. Ponadto, sam proces transportu elektronów przez błonę mitochondrialną jest źródłem wolnych form tlenu, które są przyczyną uszkodzeń DNA i mutacji [74]. Ponieważ mtDNA zawiera wiele genów zaangażowanych w proces fosforylacji oksydacyjnej utrzymanie jego odpowiedniej jakości jest konieczne do zapewnienia odpowiedniego poziomu ATP, powstającego w procesie fosforylacji oksydacyjnej i koniecznego do energochłonnych podziałów komórkowych, takich jak rozpad osłonki jądrowej, formowanie się wrzeciona czy proces zapłodnienia [118]. Tak więc, wytwarzanie wolnych form tlenu przez mitochondria jest zjawiskiem nieodłącznie związanym z wytwarzaniem energii przez te organella. Jednocześnie w procesie wytwarzania ATP jest konieczne utrzymanie odpowiedniej aktywności mitochondriów, a więc takiej, która nie przekracza zdolności mitochondrialnych enzymów antyoksydacyjnych oraz białek naprawczych do usuwania powstałych w wyniku wytwarzania ATP rodników oraz uszkodzeń mtDNA [88]. Należy pamiętać, że ROS mogą mieć także pochodzenie egzogenne, które jest wynikiem oddziaływania środowiska życia, co również może mieć duże znaczenie dla jakości genomu mitochondrialnego. Jako przykłady egzogennych czynników wpływających na wzrost stresu oksydacyjnego w organizmie można zaliczyć palenie tytoniu, alkohol, zanieczyszczenia środowiska, otyłość, a także niektóre choroby np. cukrzyca typu 2 oraz stany zapalne [10,89,93].

Dotąd opisano wiele (około 150) mutacji mtDNA. Najczęściej są to mutacje punktowe, które w dorosłym organizmie wykazują mozaikowy charakter i występują w różnych proporcjach między komórkami organizmu [10,45]. Najpowszechniejszą delecją w oocytach, obejmującą kilka genów mitochondrialnego genomu (w tym: ATP-azy 6 i 8, oksydazy cytochromu III i kilku podjednostek oksydoreduktazy NADQ-CoQ), jest mutacja o długości 4977bp (Δ mtDNA4977). Mutacja ta dotyczy regionu związanego z 13bp powtórzeniami między pozycjami 8470 i 13,477 genomu mitochondrialnego [113]. Akumulację delecji Δ mtDNA4977 obserwowano w starych i niezdzielających się tkankach włączając w to jajniki. Dlatego jest markerem starzenia się i jakości mitochondrialnego genomu w oocytach [53]. Występowanie innej dużej delecji mtDNA (Δ mtDNA5286) również koreluje z jakością oocytów w metodach zapłodnienia pozaustrojowego, jednak w tym przypadku nie wykazano związku z wiekiem matki [117]. Tak więc, stan zgromadzonych w oocyocie mitochondriów rzutuje na całe życie zarówno prenatalne, jak i postnatalne. Okazuje się bowiem, że nawet niewiele odziedziczonych po matce mutacji w mtDNA może zaburzać funkcjonowanie mózgu oraz powodować przyspieszone starzenie się potomstwa [87]. Poziom mutacji mtDNA może rosnąć głównie jako skutek braku napraw DNA, działania ROS lub błędów replikacyjnych podczas prawidłowej syntezy mtDNA [57]. Niestety, wydaje się, że mutacje wielu mitochondriów w oocytach w modelach mysich często nie powodują natychmiastowego obniżenia płodności, co sprawia, że heteroplazma i mutacje mogą być przekazy-



MERF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Fibres) - Degradacja włókien mięśniowych, łysienie zaburzenia poznawcze.

MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes) - Złożony zespół chorobowy związany z zaburzeniami funkcjonowania centralnego układu nerwowego, mięśni, nerek i układu endokrynnego.

MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness) - Drgawki, migreny, niski wzrost, niedorozwój umysłowy, cukrzyca.

MILS (Maternally Inherited Leigh Syndrome) - Śmiertelna choroba wieku dziecięcego powodująca zaburzenia układu oddechowego, dystonię i atrofię nerwu wzrokowego.

Ryc. 2. Schemat mitochondrialnego genomu z uwzględnieniem powszechnie występujących chorób z nim związanych oraz przykładowe mutacje będące przyczynami powstania opisanych chorób; uwzględniono również delecję w pozycji 4977bp, będącą markerem jakości żeńskich komórek rozrodczych

wane potomstwu mimo obniżania jego żywotności [49]. Odsetek zmutowanego mtDNA w komórkach, przy którym pojawiają się widoczne objawy chorobowe waha się między 60 a 90%, w zależności od rodzaju i liczby zmutowanych genów oraz typu mutacji (wielkoskalowe delekcje lub punktowe mutacje) [90]. Kobiety bez wyraźnych objawów chorobowych i ze średnią zawartością zmutowanego mtDNA mogą wytwarzać oocyty obciążone różnym poziomem mutacji, a więc zdrowe kobiety mogą posiadać chore potomstwo [22]. Mutacje mtDNA mogą być przekazywane z matki na potomstwo powodując choroby związane z dysfunkcjami w mtDNA, dotyka to 1 dziecko na 5000 dzieci [42]. Obecnie znanych jest wiele chorób związanych z zaburzeniami funkcji mitochondriów w komórkach. Należą do nich: mitochondrialna encefalopatia, chroniczna kwasica mleczanowa, miopatia mitochondrialna, encefalopatia, występowanie incydentów podobnych do udarów (MELAS), zespół MNGIE, cukrzyca typu 2, choroby układu krążenia czy nowotwory [70]. Jak dotąd brak jest terapii chorób mitochondrialnych, a niemendłowski charakter dziedziczenia tego rodzaju schorzeń ogranicza możliwości korzystania z wywiadu rodzinnego i diagnostyki przedimplantacyjnej (ryc.2) [13].

PODSUMOWANIE

PIŚMIENICTWO

- [1] Acton B.M., Jurisicova A., Jurisica I., Casper R.F.: Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004; 10: 23-32
- [2] Alexeyev M., Shokolenko I., Wilson G., LeDoux S.: The maintenance of mitochondrial DNA integrity – critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013; 5: a012641
- [3] Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J.: Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, 2013; 146: R163-R174
- [4] Ameur A., Stewart J.B., Freyer C., Hagström E., Ingman M., Larsson N.G., Gyllenstein U.: Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins. *PLoS Genet.*, 2011; 7: e1002028
- [5] Ankel-Simons F., Cummins J.M.: Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 13859-13863
- [6] Assou S., Haouzi D., De Vos J., Hamamah S.: Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2010; 16: 531-538
- [7] Baumann C.G., Morris D.G., Sreenan J.M., Leese H.J.: The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol. Reprod. Dev.*, 2007; 74: 1345-1353
- [8] Bavister B.D., Squirrel J.M.: Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 189-198
- [9] Ben-Meir A., Yahalomi S., Moshe B., Shufaro Y., Reubinoff B., Saada A.: Coenzyme Q-dependent mitochondrial respiratory chain activity in granulosa cells is reduced with aging. *Fertil. Steril.*, 2015; 104: 724-727
- [10] Bentov Y., Casper R.F.: The aging oocyte – can mitochondrial function be improved? *Fertil. Steril.*, 2013; 99: 18-22
- [11] Boucrot L., Chao de la Barca J.M., Morinière C., Desquiere V., Ferré-L'Hôtellier V., Descamps P., Marcaillou C., Reynier P., Procaccio V., May-Panloup P.: Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Hum. Reprod.*, 2015; 30: 1653-1664
- [12] Bratic I., Hench J., Henriksson J., Antebi A., Bürglin T.R., Trifunovic A.: Mitochondrial DNA level, but not active replicase, is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 1817-1828
- [13] Brown D.T., Herbert M., Lamb V.K., Chinnery P.F., Taylor R.W., Lightowler R.N., Craven L., Cree L., Gardner J.L., Turnbull D.M.: Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet*, 2006; 368: 87-89
- [14] Cam H., Balciunaite E., Blais A., Spektor A., Scarpulla R.C., Young R., Kluger Y., Dynlacht B.D.: A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol. Cell.*, 2004; 16: 399-411
- [15] Carroll J., Marangos P.: The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front. Genet.*, 2013; 4: 117
- [16] Cetica P.D., Pintos L.N., Dalvit G.C., Beconi M.T.: Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 2001; 51: 57-64
- [17] Chen X., Prosser R., Simonetti S., Sadlock J., Jagiello G., Schon E.A.: Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995; 57: 239-247
- [18] Cheng Y., Yata A., Klein C., Cho J.H., Deguchi M., Hsueh A.J.: Oocyte-expressed interleukin 7 suppresses granulosa cell apoptosis and promotes oocyte maturation in rats. *Biol. Reprod.*, 2011; 84: 707-714
- [19] Chinnery P.F., Hudson G.: Mitochondrial genetics. *Br. Med. Bull.*,

2013; 106: 135-159

[20] Cotterill M., Harris S.E., Collado Fernandez E., Lu J., Huntriss J.D., Campbell B.K., Picton H.M.: The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis *in vivo* and during oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Hum. Reprod.*, 2013; 19: 444-450

[21] Cree L.M., Hammond E.R., Shelling A.N., Berg M.C., Peek J.C., Green M.P.: Maternal age and ovarian stimulation independently affect oocyte mtDNA copy number and cumulus cell gene expression in bovine clones. *Hum. Reprod.*, 2015; 30: 1410-1420

[22] Cree L.M., Samuels D.C., Chinnery P.F.: The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1792: 1097-1102

[23] Cummins J.M.: Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer. *Hum. Reprod. Update*, 2001; 7: 217-228

[24] Dal-Cim T., Molz S., Egea J., Parada E., Romero A., Budni J., Martín de Saavedra M.D., del Barrio L., Tasca C.I., López M.G.: Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Neurochem. Int.*, 2012; 61: 397-404

[25] Dalton C.M., Carroll J.: Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.*, 2013; 126: 2955-2964

[26] Dalton C.M., Szabadkai G., Carroll J.: Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J. Cell. Physiol.*, 2014; 229: 353-361

[27] de Paula W.B., Agip A.N., Missirli F., Ashworth R., Vizcay-Barrena G., Lucas C.H., Allen J.F.: Female and male gamete mitochondria are distinct and complementary in transcription, structure, and genome function. *Genome Biol. Evol.*, 2013; 5: 1969-1977

[28] de Paula W.B., Lucas C.H., Agip A.N., Vizcay-Barrena G., Allen J.F.: Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2013; 368: 20120263

[29] Eichenlaub-Ritter U.: Oocyte ageing and its cellular basis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2012; 56: 841-852

[30] Eichenlaub-Ritter U., Wieczorek M., Lüke S., Seidel T.: Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion*, 2011; 11: 783-796

[31] El Shourbagy S.H., Spikings E.C., Freitas M., St John J.C.: Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, 2006; 131: 233-245

[32] Elson J.L., Samuels D.C., Turnbull D.M., Chinnery P.F.: Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001; 68: 802-806

[33] Faddy M.J., Gosden R.G., Gougeon A., Richardson S.J., Nelson J.F.: Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum. Reprod.*, 1992; 7: 1342-1346

[34] Fischer B., Bavister B.D.: Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, 1993; 99: 673-679

[35] Ge H.S., Zhang F., Li X.H., Chen H., Xi H.T., Huang J.Y., Zhu C.F., Lü J.Q.: Effects of controlled ovarian hyperstimulation on mitochondrial copy number and functions in murine oocytes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2013; 48: 858-861

[36] Ghaffari Novin M., Noruzinia M., Allahveisi A., Saremi A., Fadaei Fathabadi F., Mastery Farahani R., Dehghani Fard A., Pooladi A., Mazaherinezhad Fard R., Yousefian E.: Comparison of mitochondrial-related transcriptional levels of TFAM, NRF1 and MT-CO1 genes in single human oocytes at various stages of the oocyte maturation. *Iran. Biomed. J.*, 2015; 19: 23-28

[37] Ghiselli F., Milani L., Guerra D., Chang P.L., Breton S., Nuzhdin S.V., Passamonti M.: Structure, transcription, and variability of metazoan mitochondrial genome: perspectives from an unusual mitochondrial inheritance system. *Genome Biol. Evol.*, 2013; 5: 1535-1554

[38] Gibson T.C., Kubisch H.M., Brenner C.A.: Mitochondrial DNA deletions in rhesus macaque oocytes and embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 2005; 11: 785-789

[39] Goo C.K., Lim H.Y., Ho Q.S., Too H.P., Clement M.V., Wong K.P.: PTEN/Akt signaling controls mitochondrial respiratory capacity through 4E-BP1. *PLoS One*, 2012; 7: e45806

[40] Grindler N.M., Moley K.H.: Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Mol. Hum. Reprod.*, 2013; 19: 486-494

[41] Grupen C.G., Armstrong D.T.: Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effects of follicular fluid during IVM. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2010; 22: 1100-1109

[42] Haas R.H., Parikh S., Falk M.J., Saneto R.P., Wolf N.I., Darin N., Cohen B.H.: Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians. *Pediatrics*, 2007; 120: 1326-1333

[43] Hagström E., Freyer C., Battersby B.J., Stewart J.B., Larsson N.G.: No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. *Nucleic Acids Res.*, 2014; 42: 1111-1116

[44] Harris S.E., Leese H.J., Gosden R.G., Picton H.M.: Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 2009; 76: 231-238

[45] Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A.: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 1988; 331: 717-719

[46] Holt J.E., Jones K.T.: Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. *Mol. Hum. Reprod.*, 2009; 15: 139-147

[47] Hussein T.S., Froiland D.A., Amato F., Thompson J.G., Gilchrist R.B.: Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 5257-5268

[48] Igosheva N., Abramov A.Y., Poston L., Eckert J.J., Fleming T.P., Duchon M.R., McConnell J.: Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One*, 2010; 5: e10074

[49] Inoue K., Nakada K., Ogura A., Isobe K., Goto Y., Nonaka I., Hayashi J.I.: Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat. Genet.*, 2000; 26: 176-181

[50] Iwata H., Goto H., Tanaka H., Sakaguchi Y., Kimura K., Kuwayama T., Monji Y.: Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011; 23: 424-432

[51] Kaneko T., Saito H., Takahashi T., Ohta N., Saito T., Hiroi M.: Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2000; 17: 580-585

[52] Kimura N., Tsunoda S., Iuchi Y., Abe H., Totsukawa K., Fujii J.: Intrinsic oxidative stress causes either 2-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. *Mol. Hum. Reprod.*, 2010; 16: 441-451

[53] Kitagawa T., Suganuma N., Nawa A., Kikkawa F., Tanaka M., Ozawa T., Tomoda Y.: Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries. *Biol. Reprod.*, 1993; 49: 730-736

[54] Kogo N., Tazaki A., Kashino Y., Morichika K., Orii H., Mochii M., Watanabe K.: Germ-line mitochondria exhibit suppressed respira-

- tory activity to support their accurate transmission to the next generation. *Dev. Biol.*, 2011; 349: 462–469
- [55] Kujjo L.L., Perez G.I.: Ceramide and mitochondrial function in aging oocytes: juggling a new hypothesis and old players. *Reproduction*, 2012; 143: 1–10
- [56] Kushnir V.A., Ludaway T., Russ R.B., Fields E.J., Koczor C., Lewis W.: Reproductive aging is associated with decreased mitochondrial abundance and altered structure in murine oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2012; 29: 637–642
- [57] Larsson N.G.: Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010; 79: 683–706
- [58] Leese H.J., Baumann C.G., Brison D.R., McEvoy T.G., Sturmey R.G.: Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.*, 2008; 14: 667–672
- [59] Li R., Albertini D.F.: The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013; 14: 141–152
- [60] Lim J., Luderer U.: Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol. Reprod.*, 2011; 84: 775–782
- [61] Lin F., Ma X.S., Wang Z.B., Wang Z.W., Luo Y.B., Huang L., Jiang Z.Z., Hu M.W., Schatten H., Sun Q.Y.: Different fates of oocytes with DNA double-strand breaks *in vitro* and *in vivo*. *Cell Cycle*, 2014; 13: 2674–2680
- [62] Liu P., Demple B.: DNA repair in mammalian mitochondria: much more than we thought? *Environ. Mol. Mutagen.*, 2010; 51: 417–426
- [63] Lord T., Aitken R.J.: Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*, 2013; 146: R217–R227
- [64] Luo S.M., Ge Z.J., Wang Z.W., Jiang Z.Z., Wang Z.B., Ouyang Y.C., Hou Y., Schatten H., Sun Q.Y.: Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110: 13038–13043
- [65] Luzzo K.M., Wang Q., Purcell S.H., Chi M., Jimenez P.T., Grindler N., Schedl T., Moley K.H.: High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PLoS One*, 2012; 7: e49217
- [66] Mahrous E., Yang Q., Clarke H.J.: Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction*, 2012; 144: 177–185
- [67] Mao J., Whitworth K.M., Spate L.D., Walters E.M., Zhao J., Prather R.S.: Regulation of oocyte mitochondrial DNA copy number by follicular fluid, EGF, and neuregulin 1 during *in vitro* maturation affects embryo development in pigs. *Theriogenology*, 2012; 78: 887–897
- [68] Matsuda F., Inoue N., Manabe N., Ohkura S.: Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J. Reprod. Dev.*, 2012; 58: 44–50
- [69] McGinnis L.K., Limback S.D., Albertini D.F.: Signaling modalities during oogenesis in mammals. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2013; 102: 227–242
- [70] McInnes J.: Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutr. Metab.*, 2013; 10: 63
- [71] Ménéz Y., Dale B., Cohen M.: DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 2010; 18: 357–365
- [72] Miao Y., Liu X., 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
- [73] Motta P.M., Nottola S.A., Makabe S., Heyn R.: Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 129–147
- [74] Muftuoglu M., Mori M.P., de Souza-Pinto N.C.: Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. *Mitochondrion*, 2014; 17: 164–181
- [75] Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y.: Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote*, 2006; 14: 53–61
- [76] Nakada K., Hayashi J.I.: Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp. Anim.*, 2011; 60: 421–431
- [77] Niu X., Trifunovic A., Larsson N.G., Canlon B.: Somatic mtDNA mutations cause progressive hearing loss in the mouse. *Exp. Cell Res.*, 2007; 313:3924–3934
- [78] Opiela J., Lipiński D., Słomski R., Katska-Ksiazkiewicz L.: Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim. Reprod. Sci.*, 2010; 118: 188–193
- [79] Palmer C.S., Osellame L.D., Stojanovski D., Ryan M.T.: The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell. Signal.*, 2011; 23: 1534–1545
- [80] Perez G.I., Jurisicova A., Wise L., Lipina T., Kanisek M., Bechard A., Takai Y., Hunt P., Roder J., Grynepas M., Tilly J.L.: Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 5229–5234
- [81] Piganeau G., Gardner M., Eyre-Walker A.: A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol. Biol. Evol.*, 2004; 21: 2319–2325
- [82] Prasad S., Tiwari M., Koch B., Chaube S.K.: Morphological, cellular and molecular changes during postovulatory egg aging in mammals. *J. Biomed. Sci.*, 2015; 22: 36
- [83] Qiao T.W., Liu N., Miao D.Q., Zhang X., Han D., Ge L., Tan J.H.: Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor (s). *Mol. Reprod. Dev.*, 2007; 75: 521–528
- [84] Ramalho-Santos J.: A sperm's tail: the importance of getting it right. *Hum. Reprod.*, 2011; 26: 2590–2591
- [85] Reynier P., May-Panloup P., Chrétien M.F., Morgan C.J., Jean M., Savagner F., Barrière P., Malhière Y.: Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001; 7: 425–429
- [86] Rieger D., Luciano A.M., Modina S., Pocar P., Lauria A., Gandolfi F.: The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 1998; 112: 123–130
- [87] Ross J.M., Coppotelli G., Hoffer B.J., Olson L.: Maternally transmitted mitochondrial DNA mutations can reduce lifespan. *Sci. Rep.*, 2014; 4: 6569
- [88] Ruder E.H., Hartman T.J., Goldman M.B.: The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2009; 21: 219–222
- [89] Ruder E.H., Hartman T.J., Goldman M.B.: Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 2009; 21: 219–222
- [90] Russell O., Turnbull D.: Mitochondrial DNA disease-molecular insights and potential routes to a cure. *Exp. Cell Res.*, 2014; 325: 38–43
- [91] Santos T.A., El Shourbagy S., St John J.C.: Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 2006; 85: 584–591
- [92] Sathananthan A.H., Trounson A.O.: Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 148–159
- [93] Shkolnik K., Tadmor A., Ben-Dor S., Nevo N., Galiani D., Dekel N.: Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 1462–1467

- [94] Soleimani R., Heytens E., Darzynkiewicz Z., Oktay K.: Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging*, 2011; 3: 782-793
- [95] St. John J.C., Facucho-Oliveira J., Jiang Y., Kelly R., Salah R.: Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update*, 2010; 16: 488-509
- [96] Stojkovic M., Machado S.A., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Hutzler P., Gonçalves P.B., Wolf E.: Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.*, 2001; 64: 904-909
- [97] Sutton-McDowall M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G.: The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, 2010; 139: 685-695
- [98] Tatemoto H., Sakurai N., Muto N.: Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 2000; 63: 805-810
- [99] Tatone C., Eichenlaub-Ritter U., Amicarelli F.: Dicarboxyl stress and glyoxalases in ovarian function. *Biochem. Soc. Trans.*, 2014; 42: 433-438
- [100] Tiwari M., Chaube S.K.: Moderate increase of reactive oxygen species triggers meiotic resumption in rat follicular oocytes. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2016; 42: 536-546
- [101] Tiwari M., Prasad S., Tripathi A., Pandey A.N., Ali I., Singh A.K., Shrivastav T.G., Chaube S.K.: Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 2015; 20: 1019-1025
- [102] Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly-Y. M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H.T., Larsson N.G.: Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 2004; 429: 417-423
- [103] Tsai H.D., Hsieh Y.Y., Hsieh J.N., Chang C.C., Yang C.Y., Yang J.G., Cheng W.L., Tsai F.J., Liu C.S.: Mitochondria DNA deletion and copy numbers of cumulus cells associated with in vitro fertilization outcomes. *J. Reprod. Med.*, 2010; 55: 491-497
- [104] Van Blerkom J.: Mitochondria as regulatory forces in oocytes, preimplantation embryos and stem cells. *Reprod. Biomed. Online*, 2008; 16: 553-569
- [105] Van Blerkom J.: Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 2004; 128: 269-280
- [106] Van Blerkom J., Davis P.: Mitochondrial signaling and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, 2007; 13: 759-770
- [107] Van Blerkom J., Davis P., Alexander S.: Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 2003; 18: 2429-2440
- [108] Van Blerkom J., Davis P.W., Lee J.: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 1995; 10: 415-424
- [109] 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
- [110] Venkatesh S., Kumar M., Sharma A., Kriplani A., Ammini A.C., Talwar P., Agarwal A., Dada R.: Oxidative stress and ATPase6 mutation is associated with primary ovarian insufficiency. *Arch. Gynecol. Obstet*, 2010; 282: 313-318
- [111] Wai T., Ao A., Zhang X., Cyr D., Dufort D., Shoubridge E.A.: The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol. Reprod.*, 2010; 83: 52-62
- [112] Wakefield S.L., Lane M., Mitchell M.: Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol. Reprod.*, 2011; 84: 572-580
- [113] Wang L.Y., Wang D.H., Zou X.Y., Xu C.M.: Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2009; 10: 483-492
- [114] Wang R.S., Chang H.Y., Kao S.H., Kao C.H., Wu Y.C., Yeh S., Tzeng C.R., Chang C.: Abnormal mitochondrial function and impaired granulosa cell differentiation in androgen receptor knockout mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015; 16: 9831-9849
- [115] Wu Y., Wang X., Liu J., Bao Z., Tang D., Wu Y., Zeng S.: BIM_{EL}-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged porcine oocytes via a paracrine action. *Theriogenology*, 2011; 76: 1487-1495
- [116] Yeon Lee J., Baw C.K., Gupta S., Aziz N., Agarwal A.: Role of oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Curr. Womens. Health Rev.*, 2010; 6: 96-107
- [117] Yesodi V., Yaron Y., Lessing J.B., Amit A., Ben-Yosef D.: The mitochondrial DNA mutation (Δ mtDNA 5286) in human oocytes: correlation with age and IVF outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2002; 19: 60-66
- [118] Yu Y., Dumollard R., Rossbach A., Lai F.A., Swann K.: Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J. Cell. Physiol.*, 2010; 224: 672-680
- [119] Zeng H.T., Richani D., Sutton-McDowall M.L., Ren Z., Smitz J.E., Stokes Y., Gilchrist R.B., Thompson J.G.: Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. *Biol. Reprod.*, 2014; 91: 47
- [120] Zheng W., Khrapko K., Collier H.A., Thilly W.G., Copeland W.C.: Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase γ -mediated errors. *Mutat. Res.*, 2006; 599: 11-20

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

terapii w celu polepszenia jakości ludzkich komórek roz-
rodnych.