

Wybrane aspekty oogenezy i folikulogenezy

Select aspects of oogenesis and folliculogenesis

Cezary Grygoruk¹, Piotr Sieczyński², Karol Ratomski¹, Mirosław Grusza¹, Grzegorz Mrugacz¹

¹Klinika Ginekologiczno-Położnicza „Bocian” w Białymstoku
Kierownik Kliniki: dr n. med. Grzegorz Mrugacz

²Centrum Leczenia Niepłodności Matżeńskiej „Kriobank” w Białymstoku
Kierownik Centrum: prof. dr hab. med. Waldemar Kuczyński

Studia Medyczne 2013; 29 (2): 199–202

Słowa kluczowe: folikulogeneza, oocyt, oogeneza, pęcherzyk Graafa.

Key words: folliculogenesis, oocyte, oogenesis, Graafian follicle.

Streszczenie

Proces oogenezy oraz folikulogenezy rozpoczyna się bardzo wcześnie w życiu płodowym i jest kontynuowany do zakończenia okresu rozrodczego. Pomimo wielu przeprowadzonych badań mechanizm inicjujący wzrost pęcherzyków pierwotnych nie został do końca poznany. Proces dojrzewania oocytu rozpoczyna się od chwili rekrutacji pęcherzyka pierwotnego i trwa aż do momentu owulacji. Polega on na syntezie i akumulacji odpowiedniej liczby i rodzaju związków oraz redystrybucji organelli komórkowych wewnątrz oocytu niezbędnych w procesie zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego. Złożoność i wielokierunkowość mechanizmów oraz czynników biorących udział w procesie oogenezy wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących tego zagadnienia. Dokładniejsze zrozumienie procesu oogenezy i folikulogenezy umożliwi w przyszłości opracowanie bardziej efektywnych metod leczenia wielu schorzeń ginekologicznych, onkologicznych oraz endokrynologicznych.

Abstract

The processes of oogenesis and folliculogenesis begin very early in foetal life and are continued until the end of the reproductive period. Despite the numerous research conducted, the mechanism which initiates the growth of primary follicles has not been fully elucidated. The process of oocyte maturation begins after the recruitment of the primary follicle and continues until ovulation. This involves synthesis and accumulation of an appropriate number and kind of compounds and redistribution of cellular organelles inside the oocyte, which are necessary for the processes of fertilization and early embryonic development. The complexity and multi-functionality of these mechanisms and the factors which take part in the process of oogenesis indicate a necessity to conduct further research concerning this issue. A more thorough understanding of the processes of oogenesis and folliculogenesis will allow in time to develop more effective methods of treatment for a range of gynaecological, oncological, and endocrinological disorders.

Wstęp

Proces oogenezy oraz folikulogenezy rozpoczyna się bardzo wcześnie w życiu płodowym i jest kontynuowany do zakończenia okresu rozrodczego. Najwięcej oocytów, około 6 milionów, znajduje się w jajnikach płodu żeńskiego w szóstym miesiącu ciąży. Następnie, w miarę upływu czasu, liczba oocytów w jajnikach się zmniejsza i u noworodka wynosi około 2 milionów, a u dziewczynki w okresie pokwitania już tylko około 400 tysięcy. Ze względu na średnią liczbę cykli w ciągu całego życia kobiety dojrzewanie zakończy jedynie około 400 oocytów.

Proces selekcji komórki jajowej, która ma dojrzeć w danym cyklu, rozpoczyna się około 6 miesięcy przed owulacją. Z blisko tysiąca komórek jajowych rozpoczynających wzrost jedynie około 30 dotrwa do fazy gonadotropowozależnej. Spośród nich tylko

jedna dojrzeje i będzie się nadawać do zapłodnienia. Tak znacząca selekcja komórek rozrodczych podczas wzrostu i dojrzewania ma na celu wybór oocytu o jak największym potencjale rozrodczym, zapewniającym największe szanse na uzyskanie potomstwa.

Zaburzenia procesu folikulogenezy mogą powodować niepłodność, zespół policystycznych jajników, przedwczesne wygasanie czynności jajników, a także procesy nowotworowe. W celu opracowania lepszych metod diagnostyki i terapii powyższych schorzeń istotne jest zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost i dojrzewanie komórek jajowych.

Wczesna folikulogeneza

Około 24. dnia życia płodowego komórki germinalne, zwane też pierwotnymi komórkami płciowymi, formują się poza związkami gonad, w ścianie

pęcherzyka żółtkowego. Około 5. tygodnia komórki te migrują do listw gonadalnych, a ich wędrówka jest sterowana przez cytokiny, z których udział transformującego czynnika wzrostu β (*tumor growth factor β* – TGF- β) oraz czynnika wzrostowego komórek pnia (KIT ligand) jest najlepiej udokumentowany [1]. Po dotarciu do pierwotnej gonady komórki te podlegają szeregowi podziałów mitotycznych i przekształcają się w oogonia. Do końca pierwszego trymestru ciąży wszystkie oogonia wchodzi w profazę pierwszego podziału mejotycznego i przekształcają się w oocyty I rzędu. Od 22. tygodnia życia płodowego oocyty otaczają się pojedynczą warstwą spłaszczonych komórek i tworzą pierwotne pęcherzyki jajnikowe. Lokalizują się one w części korowej jajnika. Na tym etapie rozwoju pęcherzyki pierwotne mają średnicę około 15 μm i nie podlegają dalszym podziałom, nie są aktywne hormonalnie ani nie zawierają receptorów dla gonadotropin. Dojrzwienie jądra komórkowego oocyty zatrzymuje się w stadium diplotenu pierwszego podziału mejotycznego. Wznowienie podziału mejotycznego następuje dopiero 36 godzin przed owulacją lub w procesie „przedwczesnego dojrzwienia”, w czasie atrezji pęcherzyka. Przypuszcza się, że za hamowanie przedwczesnego dojrzwienia komórki jajowej odpowiada substancja pochodzenia jajnikowego zwana inhibitorem dojrzwienia oocyty [2]. Obecnie najbardziej prawdopodobna wydaje się koncepcja, że czynnikiem tym jest cykliczny adenozynomonofosforan (cAMP), a takie substancje, jak nukleotydy purynowe, hipoksantyna, adenyzyna oraz steroidy płciowe, jedynie modulują proces dojrzwienia oocytów [3].

W obrębie cytoplazmy oocyty obserwuje się dużą aktywność metaboliczną. Liczne mitochondria, rozbudowane retikulum endoplazmatyczne gładkie, skupiska rybosomów są głównie zlokalizowane wokół jądra komórkowego. Oolemma tworzy mnogie, drobne sfałdowania – mikrokosmki, które wchodzi w kontakt z podobnymi tworami komórek otaczających oocyt. Połączenia pomiędzy oolemmą i sąsiadującymi komórkami mają istotne znaczenie w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych oraz dostarczaniu substancji odżywczych [4]. Komórki otaczające oocyt charakteryzują się stosunkowo dużym jądrem komórkowym, a ich cytoplazma zawiera liczne mitochondria, rozbudowane retikulum endoplazmatyczne szorstkie, krople lipidowe oraz dobrze rozwinięty system aparatów Golgiego [5].

Mechanizm rekrutacji pęcherzyków pierwotnych do wzrostu nie jest do końca poznany. Potencjalnymi inicjatorami wzrostu pęcherzyków pierwotnych są: naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF), insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (*insulin-like growth factor-1* – IGF-1), transformujący czynnik wzrostu α (*transforming growth factor α* – TGF- α), hormon anty-Müllerowski (*anti-Müllerian hormone* – AMH), czynnik wzrostu i różnicowania 9 (*growth*

differentiation factor-9 – GDF-9), GDF-9B (*BMP-15 bone morphogenetic protein 15*), receptor C-kit (*tyrosine kinase receptor*) zlokalizowany w oolemmie i jego ligand KIT produkowany przez komórki ziarniste [6, 7]. Oocyt pęcherzyka pierwotnego będącego w stanie spoczynku wykazuje silną ekspresję białka pRb (*retinoblastoma protein*), która zmniejsza się znacząco po rekrutacji [8]. Innym czynnikiem mogącym uchodzić za inhibitor wzrostu pęcherzyków jest WT1 (*Wilms tumor suppressor gene*). Jego ekspresję obserwuje się głównie w komórkach ziarnistych – zarówno pęcherzyków pierwotnych, pierwszorzędowych, jak i drugorzędowych. Wraz ze wzrostem pęcherzyków stwierdza się zmniejszanie ekspresji WT1 [9].

Gonadotropiny nie odgrywają istotnej roli w rekrutacji pęcherzyków pierwotnych, a ich długotrwałe stosowanie nie powoduje zmniejszenia rezerwy jajnikowej i przedwczesnego wygaśnięcia czynności jajników. Komórki somatyczne pierwotnych pęcherzyków nie wykazują ekspresji receptorów dla gonadotropin, ekspresja genu kodującego receptor dla FSH pojawia się dopiero w komórkach ziarnistych pęcherzyka pierwszorzędowego [7].

Późna folikulogeneza

Przemiana pęcherzyka pierwotnego w pęcherzyk pierwszorzędowy jest konsekwencją zmian zarówno w oocycie, głównie w jego ooplazmie, jak i w sąsiadujących komórkach oraz w zrębie łącznotkankowym otaczającym pęcherzyk. W przebiegu tej przemiany oocyt zwiększa swój rozmiar od około 15 μm do 80–100 μm , następuje również redystrybucja organelli wewnątrzkomórkowych. Aparat Golgiego, początkowo zlokalizowany na małym obszarze w pobliżu jądra komórkowego, ulega rozbudowie i przemieszczeniu w pobliże oolemy. Obserwuje się też proliferację siateczki endoplazmatycznej szorstkiej, a liczba wolnych rybosomów oraz krople lipidowych w ooplazmie się zwiększa. Na powierzchni oolemy obserwuje się zwiększenie gęstości mikrokosmków, które ostatecznie pokrywają całą oolemmę. Najbardziej spektakularne zmiany w obrębie pęcherzyka jajnikowego na tym etapie rozwoju zachodzą jednak wśród komórek ziarnistych. W wyniku licznych podziałów mitotycznych ich liczba się zwiększa, co prowadzi do powstania około trzech, czterech warstw komórek ułożonych wokół oocyty. Komórki te, powiększając swoje rozmiary, przybierają kształt sześcienny. Wewnątrz komórek ziarnistych następuje proliferacja mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego, wolnych rybosomów oraz aparatu Golgiego. W miarę rozwoju pęcherzyka pierwszorzędowego w przestrzeni pomiędzy mikrokosmkami oocyty i komórek ziarnistych zaczyna się gromadzić amorficzna substancja złożona z wodorowęglanów oraz białek, tworząca z czasem otoczkę przejrzystą oocyty. Wśród hipotez dotyczących pochodzenia otoczki przejrzystej najbardziej

prawdopodobna wydaje się ta, że jest ona produktem zarówno komórki jajowej, jak i komórek ziarnistych [6]. Podziały i wzrost komórek ziarnistych wywołują zmiany w tkance łącznej otaczającej pęcherzyk. Komórki tkanki łącznej przylegającej bezpośrednio do pęcherzyka układają się koncentrycznie wokół niego, tworząc warstwę zwaną osłonką pęcherzyka. Dalsze różnicowanie się komórek tej warstwy następuje jedynie wtedy, gdy dojdzie do powstania pęcherzyka antralnego. Podczas tego procesu obserwuje się wzmożoną ekspresję genów Zp-1, Zp-2, Zp-3 kodujących białka wchodzące w skład otoczki przejrzystej. Białka te mogą odgrywać istotną rolę w różnicowaniu się komórek ziarnistych bezpośrednio otaczających oocyt. Koordynacja transkrypcji genów Zp-1, Zp-2, Zp-3 odbywa się najprawdopodobniej przy udziale czynnika FIG- α (*factor in the germline α*). Ekspresja genu FIG- α jest szczególnie intensywna w oocycie pęcherzyka pierwotnego [10].

W czasie wczesnego wzrostu pęcherzyka jajnikowego obserwuje się najszybsze tempo wzrostu komórki jajowej. Wykazano, że GDF-9 i *kit ligand* (KL) istotnie wpływają na wczesny rozwój oocytu. U myszy pozbawionych możliwości syntezy GDF-9 obserwuje się całkowity brak wzrostu pęcherzyków jajnikowych poza etap pęcherzyka pierwotnego [11]. Zasadniczą rolę w proliferacji komórek ziarnistych odgrywają substancje produkowane lokalnie lub też pochodzące z osocza, takie jak: hormon wzrostu, EGF, TGF, IGF-1, androgeny [12]. Od początku procesu dojrzewania pęcherzyka pierwszorzędowego wśród komórek ziarnistych zaczynają pojawiać się niewielkie jamki wypełnione płynem. Początkowo płyn ten pochodzi wyłącznie z komórek ziarnistych, z czasem jednak zaczyna przedostawać się z naczyń włosowatych przebiegających w osłonce łącznotkankowej pęcherzyka. W skład płynu pęcherzykowego wchodzi między innymi: białka, steroidy, wodorowęglany i mukopolisacharydy. W miarę rozwoju pęcherzyka jamki wypełnione płynem się łączą, tworząc jamę pęcherzykową. Dalszy rozwój i dojrzewanie pęcherzyka wtórnego, zwanego też antralnym, zależy głównie od hormonu folikulotropowego (*follicle stimulating hormone* – FSH), a także od czynników regulatorowych auto- i parakrynnych [13]. Średnica wczesnego pęcherzyka antralnego wynosi w przybliżeniu 200 μm , a oocytu 100–130 μm . W miarę powiększania się przestrzeni płynowej pęcherzyka komórka jajowa wraz z częścią otaczających ją komórek warstwy ziarnistej spychana jest na obwód. Warstwa komórek ziarnistych sąsiadujących z komórką jajową uwypukla się do światła pęcherzyka – nazywana jest wżgórką jajonośną. Komórki ziarniste zlokalizowane najbliżej komórki jajowej tworzą tzw. wieniec promienisty. Wraz ze wzrostem pęcherzyka tworzą się liczne połączenia typu *gap-junction* pomiędzy komórką jajową a komórkami wienca promienistego

[14]. Połączenia te odgrywają istotną rolę w komunikacji pomiędzy komórkami, ich prawidłowym wzroście oraz w zatrzymaniu i ponownym aktywowaniu podziału mejotycznego oocytu. Ponadto połączenia *gap-junction* wraz z mikroosmkami zapewniają ścisłe przyleganie komórek ziarnistych do komórki jajowej, co sprzyja ochronie oocytu przed działaniem czynników zewnętrznych oraz selektywnemu przepływowi substancji do i z oocytu [15].

W wyniku licznych podziałów mitotycznych początkowo cienka warstwa przyściennych komórek ziarnistych rozbudowuje się w pęcherzyku antralnym przedowulacyjnym do 10–18 rzędów. Z podobnych powodów wżgórek jajonośny znacząco zwiększa swe rozmiary. Komórki ziarniste zawierają mało cytoplazmy, a ich jądro komórkowe jest stosunkowo duże. W przebiegu dojrzewania pęcherzyków antralnych pomiędzy komórkami warstwy ziarnistej pojawiają się ciała Call-Exnera, których pochodzenie i funkcja nie zostały poznane. Komórki ziarniste tworzące wżgórek jajonośny są zdecydowanie różne od komórek ziarnistych przyściennych. Różnią się ekspresją mRNA oraz odpowiedzią na gonadotropiny. Wraz ze wzrostem pęcherzyka antralnego dochodzi do różnicowania się łącznotkankowej osłonki pęcherzyka na dwie warstwy: wewnętrzną, silnie unaczynioną, zawierającą komórki wydzielnicze, oraz zewnętrzną, zbudowaną z tkanki łącznej włóknistej. Komórki warstwy wewnętrznej otoczki pęcherzyka noszą nazwę komórek luteinowych, a w ich cytoplazmie pojawiają się wakuole, podobne do tych, jakie spotyka się w komórkach gruczołowych wydzielających hormony steroidowe [16].

Dojrzewanie cytoplazmatyczne i jądrowe oocytu

Od chwili rekrutacji pęcherzyka pierwotnego rozpoczyna się proces dojrzewania cytoplazmatycznego oocytu, który trwa aż do momentu owulacji. Polega on na syntezie oraz akumulacji odpowiedniej liczby i rodzaju związków oraz redystrybucji wewnątrz oocytu organelli komórkowych niezbędnych do procesu zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego. Podczas dojrzewania cytoplazmatycznego oocyt zwiększa swoją średnicę z 15 μm do około 100 μm , co odpowiada około 300-krotnemu przyrostowi objętości. Oocyt w tym okresie jest bardzo aktywny, zarówno jeżeli chodzi o proces transkrypcji, jak i translacji. Dojrzały oocyt zawiera około 200 razy więcej RNA i około 50 razy więcej białek niż przeciętna komórka somatyczna [17]. W całej puli RNA oocytu mRNA stanowi około 20%. Dla porównania, w komórkach somatycznych udział ten wynosi 2%. W momencie reasumpcji mejozy proces transkrypcji ustaje, chociaż proces translacji jest kontynuowany przez cały okres mejozy. RNA powstały w trakcie dojrzewania

cytoplazmatycznego jest bardzo stabilny, średni okres półrozpadu sięga 28 dni [18].

Proces dojrzewania jądrowego oocyty polega na wznowieniu podziału mejotycznego zatrzymanego w profazie I podziału we wczesnym okresie rozwoju ontogenetycznego. W czasie dojrzewania jądrowego dochodzi do zaniku otoczki jądrowej, haploidyzacji materiału genetycznego i wyrzucenia pierwszego ciała kierunkowego z oocyty. Sygnałem do reasumpcji mejozy w warunkach fizjologicznych jest nagły wzrost aktywności hormonu luteotropowego (*luteinizing hormone* – LH). Efektem tego jest zmniejszenie stężenia cAMP w ooplazmie, obniżenie aktywności zależnych od cAMP kinaz inaktywujących czynnik przyspieszający dojrzewanie (*maturation promoting factor* – MPF) [19]. Czynnikiem ten odpowiada za regulację działania mechanizmów kontrolujących mejozę oraz cykl komórkowy. Zbudowany jest z dwóch podjednostek: regulacyjnej cykliny B-1 i katalitycznej kinazy p34^{cdc2}. Duża aktywność MPF podczas całego okresu dojrzewania jądrowego oocyty jest niezbędna do zahamowania transkrypcji i kontynuacji podziału mejotycznego [20].

Wnioski

Folikulogeneza oraz oogeneza są bardzo skomplikowanymi procesami, które nadal są stosunkowo słabo poznane. Niewyjaśnione mechanizmy oraz wielorakość czynników biorących udział w procesie oogenezy wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących tego zagadnienia. Dokładniejsze zrozumienie procesu oogenezy i folikulogenezy pozwoli w przyszłości na opracowanie bardziej efektywnych metod zapobiegania i leczenia licznych schorzeń ginekologicznych, onkologicznych oraz endokrynologicznych.

Piśmiennictwo

- Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 37–49.
- Tsafriri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 541–551.
- Bilodeau-Goeseels S. The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2011; 78: 734–743.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 1–8.
- Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* 2009; 27: 32–42.
- Gougeon A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010; 71: 132–143.
- McLaughlin EA, McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction* 2009; 137: 1–11.
- Andreu-Vieyra C, Chen R, Matzuk MM. Conditional deletion of the retinoblastoma (Rb) gene in ovarian granulosa cells leads to premature ovarian failure. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2141–2161.
- Jagarlamudi K, Rajkovic A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356: 31–39.
- Yang Y, Balla A, Danilovich N et al. Developmental and molecular aberrations associated with deterioration of oogenesis during complete or partial follicle-stimulating hormone receptor deficiency in mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 1294–1302.
- Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 2011; 78: 9–21.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829–838.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R et al. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 1975; 45: 559–566.
- Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976; 71: 680–686.
- Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA et al. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol* 2000; 226: 167–179.
- Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54: 22–28.
- Bachvarova R, De Leon V, Johnson A et al. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1985; 108: 325–331.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 23–32.
- Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1988; 126: 242–252.
- Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 3009–3013.

Adres do korespondencji:

Cezary Grygoruk
Klinika Ginekologiczno-Położnicza „Bocian”
ul. Akademicka 23
15-267 Białystok
tel. +48 85 744 77 00
e-mail: cezary.grygoruk@gmail.com