

ROLA APOPTOZY W KOMÓRKACH JAJNIKA*

THE ROLE OF APOPTOSIS IN THE OVARIAN CELLS

Agnieszka BRODOWSKA, Maria LASZCZYŃSKA*,
Andrzej STARCZEWSKI

Klinika Rozrodczości i Ginekologii oraz *Zakład i Katedra Histologii i Embriologii,
Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie: W jajniku kobiety w okresie reprodukcyjnym apoptoza jest naturalnym, fizjologicznym procesem i dotyczy przede wszystkim komórek ziarnistych i komórek osłonki. Proces ten decyduje o ilości pęcherzyków jajnikowych, wydolności ciała żółtego, a tym samym wpływa na steroidogenezę. Jest też przyczyną menopauzy. Apoptoza zapewnia homeostazę komórek jajnika i zabezpiecza je przed nieprawidłowym funkcjonowaniem. Dokładne poznanie mechanizmów regulujących apoptozę w jajniku ludzkim ma także wymiar kliniczny. Być może pozwoli na optymalizację postępowania w zaburzeniach endokrynologicznych i w chorobach nowotworowych.

Słowa kluczowe: jajnik, apoptoza, czynniki hamujące i indukujące, kaspazy, menopauza.

Summary: Apoptosis is a natural process at reproductive age in women. It concerns granulosa and thecal cells. This process influences on the amount of ovarian follicles, luteal corpus sufficiency and on steroidogenesis and menopause. Apoptosis cause normal function and homeostasis of ovarian cells. Knowing the mechanism of apoptosis in human ovary to optimalize the management in endocrinologia disorders and neoplasmus.

Key words: ovary, apoptosis, inducing and inhibiting factors, caspases, menopausic.

Wykaz skrótów: **IGF-1** (*insulin growth factor*) – insulinowy czynnik wzrostu, **EGF** (*epithelial growth factor*) – nabłonkowy czynnik wzrostu, **TGF- α** (*transforming growth factor α*) – transformujący czynnik wzrostu α , **bFGF** (*basic fibroblastic growth factor*) – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, **LH** (*luteinizing hormone*) – hormon luteinizujący, **FSH** (*follicle stimulating hormone*) – folistimulina, **TNF** (*tumor necrosis factor*) – czynnik nekrotyzujący nowotworów, Fas-receptor błonowy z nadrodziny TNF, **FasL** (*Fas-ligand*) – ligand Fas, **FADD** (*Fas associated death domain*) – domena śmierci związana z fragmentem Fas, **CAD** (*caspase activated DNase*) – DNA-za aktywowana przez kaspazę, **ICAD** (*inhibitor caspase activated DNase*) – inhibitor DNA-zy aktywowanej przez kaspazę, **CDK p21** (*cdk inhibitory protein*) – białka hamujące z grupy CDK, **APAF** (*apoptosis protease activating factor*) –

*Praca finansowana z grantu nr PG-2-PO5E-10527.

czynnik aktywujący białka apoptotyczne, **DISC** (*death induced signalling complex*) – kompleks indukujący śmierć komórki, **PTK** (*protein tyrosine kinase*) – białkowa kinaza tyrozynowa, **PTP** (*protein tyrosine phos-phatase*) – białkowa fosfataza tyrozynowa, **AIF** (*apoptosis inducing factor*) – czynnik aktywujący apoptozę, **Bcl-2** (*B-cell lymphomas*) – białko antyapoptotyczne.

WSTĘP

Jajnik kobiety w wieku rozrodczym jest hormonalnie czynnym gruczołem, w którym proces apoptozy jest bardzo nasilony i dotyczy głównie komórek ziarnistych i komórek osłonki. Apoptoza limituje ilość i rozwój pęcherzyków jajnikowych oraz regresję ciała żółtego. Jest naturalnym procesem fizjologicznym zapewniającym homeostazę narządu oraz zabezpieczającym komórki przed ich nieprawidłowym funkcjonowaniem [1, 4, 5, 8]. Proces ten eliminuje też możliwość rozwoju ciąży mnogiej z kilkunastoma zarodkami [3, 5].

Apoptoza, czyli zaprogramowana „śmierć komórki”, towarzyszy jajnikowi ludzkiemu od urodzenia aż do późnej starości. O ile proces ten jest dobrze poznany u kobiet w okresie rozrodczym, o tyle na jego temat w okresie około- i pomenopauzalnym doniesień jest niewiele i zjawisko to wymaga dalszych badań [2, 4, 5, 18, 50]. Pierwsze sygnały starzenia się jajnika (określanego mianem perimenopauzy) rozpoczynają się od zaburzeń czynności aparatu pęcherzykowego. Klinicznie objawia się to obniżoną płodnością, zwiększonym odsetkiem poronień oraz wzrostem aberracji chromosomowych. Kobiety w okresie perimenopauzy mają mniejszą całkowitą liczbę komórek ziarnistych w przeliczeniu na jeden pęcherzyk, obniżone wytwarzanie hormonów steroidowych, głównie progesteronu oraz zmniejszone wytwarzanie inhibiny. Komórki ziarniste u tych kobiet są bardziej narażone na niedotlenienie [4, 5, 8, 46, 49]. W jajnikach kobiet po menopauzie, w których stwierdza się jedynie włóknistą tkankę łączną, naczynia krwionośne, chłonne i nerwy, komórki wykazują pewną aktywność apoptotyczną, jednak mniejszą niż komórki aparatu pęcherzykowego.

Regulacja procesu apoptozy jest procesem skomplikowanym i nie do końca poznany. Dotychczas wiadomo, że aktywację genów „śmierci komórki” można wywołać poprzez czynniki zewnętrzne (promieniowanie UW, promieniowanie γ) i wewnątrzkomórkowe (hormony, czynniki wzrostu i ich receptory, cytokiny, jony) [38, 39, 40]. W jajniku ludzkim rozwój komórek germinalnych zależy głównie od czynników wzrostu: IGF-1, EGF, TGF- α , bFGF, a wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych od hormonów gonadotropowych, takich jak: LH i FSH [17, 21, 24, 26, 34, 37, 41, 49]. Jednak nadal trwają liczne badania dotyczące dokładnej kontroli apoptozy w wybranych sytuacjach klinicznych. Celem badań jest optymalizacja leczenia chorób nowotworowych, immunologicznych (AIDS, reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń układowy) oraz degeneracyjnych (np. choroba Alzheimera) [7, 13, 14]. W ginekologii dokładne poznanie czynników indukujących i hamujących apoptozę w jajniku pozwoli wydłużyć funkcjonowanie gonad w aspekcie fizjologicznej steroidogenezy, a także wpłynąć na skuteczność chemioterapii nowotworów tych narządów [1, 3, 4, 5, 13, 14, 18].

CZYNNIKI REGULUJĄCE APOPTOZĘ. ETAPY APOPTOZY

Istotą zmian apoptotycznych w komórce jest obkurczenie komórki, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA. Aktywacja apoptozy jest uporządkowanym procesem regulowanym przez szereg sygnałów pochodzących z wnętrza komórki lub z otaczającego ją środowiska. W związku z tym w pewnym uproszczeniu należy wyróżnić dwa główne szlaki indukcji apoptozy: pierwszy, zwany zewnątrzpochodnym, związany z błonowymi receptorami śmierci i drugi – wewnątrzpochodny zachodzący z udziałem mitochondriów [24, 32, 48].

Szlak zewnątrzpochodny może prowadzić do samobójczej śmierci komórki lub może być efektem przekazania sygnału przez komórki sąsiednie zawierające receptory śmierci, czyli TNF, Fas. Skierowanie komórki na drogę apoptozy rozpoczyna się od aktywacji białkowego receptora błonowego TNF lub Fas, który łączy się ze specyficznym ligandem i tworzy kompleks FasL lub DISC, czyli podbłonowy kompleks powstający po aktywacji i oligomeryzacji receptorów błonowych z nadrodziny TNF [32, 48].

Monomery Fas lub TNF tworzą agregaty, przyciągają białko cytozolowe FADD i dochodzi do aktywacji kaspazy 8. Jeśli sygnał ten nie zostanie zneutralizowany przez białka Bcl-2, to następuje zmiana w błonach mitochondrialnych i dochodzi do uwolnienia cytochromu c. Etap ten prowadzi do aktywacji kolejnych kaspaz, co przy braku hamowania doprowadzi w efekcie do degradacji DNA [23, 32, 48].

Aktywacja szlaku wewnątrzpochodnego następuje w wyniku oddziaływania na komórkę czynników uszkodzających, takich jak: niedotlenienie, obecność wolnych rodników, promieniowanie ultrafioletowe, brak czynników wzrostu itp. Czynniki uszkodzające DNA powoduje aktywację swoistych kinaz prowadzących do fosforylacji białka p-53. Białko to powoduje indukcję inhibitora CDK p21, co wywołuje blok w cyklu komórkowym. W przypadku, gdy uszkodzenie DNA jest niewielkie, zostaje ono naprawione, a białko p-53 ulega defosforylacji i degradacji. Rozpad białka p-53 umożliwia kontynuowanie cyklu komórkowego. Gdy jednak uszkodzenie DNA jest duże, dochodzi do indukcji ekspresji białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2. Białka te powodują uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium cytochromu c i białka AIF. Białko AIF ma aktywność proteazy i bezpośrednio może aktywować kaspazy. Z kolei cytochrom c po przedostaniu się do cytoplazmy łączy się z białkiem APAF zawierającym domenę rekrutującą kaspazy. Ostatecznie dochodzi do powstania kompleksu zwanego apoptosomem zawierającego cytochrom c, APAF, prokaspazę 9 i ATP. Apoptosom może rekrutować kaspazę 9 i doprowadzać do kaskadowej aktywacji kolejnych kaspaz [23, 32, 48]. W pewnych sytuacjach drogi te mogą zachodzić na siebie i możemy mieć do czynienia ze wzmocnieniem sygnału proapoptotycznego.

Morfologicznie apoptoza trwa od kilku minut do kilku godzin i składa się z trzech zróżnicowanych następujących kolejno po sobie faz zwanych fazą wzbudzenia, wykonawczą i zniszczenia. W I fazie mamy do czynienia z kondensacją chromatyny jądrowej, rozpadem jąder, zmniejszeniem objętości jądra i zagęszczeniem cytoplazmy. Następnie w fazie II dochodzi do fragmentacji jądra, a na powierzchni błony komórkowej

tworzą się ciała apoptotyczne, które zawierają organelle i fragmenty jądra. W końcowej fazie III dochodzi do degradacji resztek jądra i struktur cytoplazmatycznych. Fragmentacja chromatyny następuje pod wpływem aktywacji endonukleaz, które tną DNA komórki apoptotycznej najpierw na większe, a potem na coraz mniejsze fragmenty prowadząc ostatecznie do rozpadu jądra [32, 48].

W końcowym efekcie komórki apoptotyczne zmniejszają swoją objętość poprzez usuwanie wody i jonów z retikulum endoplazmatycznego do przestrzeni międzykomórkowej, co w cytoplazmie komórki prowadzi do wzrostu aktywności enzymu katalizującego i powstania szeregu nowych wiązań pomiędzy różnymi białkami, takimi jak: aktyna, aneksyna II, winkulina, fibronektyna, co zdecydowanie zmienia funkcje komórki [52].

ENDONUKLEAZY I KASPAZY JAKO EGZEKUTORZY APOPTOZY

Faza egzekucji apoptozy w przeciwieństwie do fazy indukcji przebiega podobnie w większości komórek. W procesie tym biorą udział głównie kaspazy, endonukleazy, kinazy i szereg innych czynników.

Kaspazy są to proteazy cysteinowe, hydrolizujące wiązania peptydowe w kilku rodzajach sekwencji aminokwasów. Występują w cytoplazmie komórek jako nieaktywne proenzymy w postaci pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Aktywacja kaspaz może następować w wyniku proteolizy innych kaspaz, co dodatkowo ułatwia realizację apoptozy. Do chwili obecnej zidentyfikowano około 14 typów kaspaz [7, 18, 22, 27, 32, 48]. Są one oznaczane kolejnymi liczbami. Aktywacja kaspaz następuje w mechanizmie autoproteolizy w dwóch różnych kompleksach białkowych: w kompleksie DISC albo w apoptosomie. W wyniku przekształceń w kompleksie DISC dochodzi do autoproteolizy kaspazy 8 i prawdopodobnie 10 i 12. Natomiast aktywacja apoptosomu prowadzi do aktywacji kaspazy 9, 7 i 3. Jak wspomniano wyżej, w programie apoptozy sugerowane jest często współdziałanie omówionych szlaków [7, 18, 22, 48].

Endonukleazy są także enzymami uczestniczącymi w realizacji procesu apoptozy. Od 1998 roku znana jest CAD, czyli DNA-za specyficzna dla procesu apoptozy aktywowana przez kaspazę 3 i 7. W prawidłowych komórkach, które nie ulegają apoptozie, CAD występuje jako nieaktywny kompleks połączony z białkiem inhibitorowym – ICAD [7, 48]. Degradacja ICAD i uruchomienie procesu degradacji DNA następuje dopiero po aktywacji kaspazy 3 i 7, które mogą ulegać stymulacji poprzez różne czynniki (chemioterapeutyki, promieniowanie γ , UV) [18]. Ponadto postuluje się istnienie związku bezpośredniego pomiędzy aktywacją endonukleaz a wspomnianym wyżej czynnikiem indukującym apoptozę – AIF, który powoduje kondensację chromatyny i rozkład DNA na duże fragmenty. Działanie AIF może stanowić etap poprzedzający i ułatwiający działanie specyficznych endonukleaz [18, 32, 48].

Kolejne istotne enzymy biorące udział w realizacji apoptozy to kinazy. Kinazy tyrozynowe PTK mogą tworzyć integralną część receptorów błonowych czynników

wzrostu, takich jak: EGF i FGF. Enzymy te ulegają aktywacji po połączeniu ligandu z receptorem. Nie wiadomo jednak, jaki jest punkt uchwytu kinaz. Czy powodują one jedynie katalizowanie rozpoczętego wcześniej procesu apoptozy, czy też zmiana ufosforylowania białek rozpoczyna ekspresję genów programujących apoptozę [6, 7, 25, 44].

Największą i najbardziej poznaną grupę białek anti- i proapoptotycznych stanowią białka z rodziny Bcl-2/Bax [7, 13, 18, 23]. Białko Bcl-2 podnosi oporność komórek nowotworowych na czynniki wywołujące apoptozę, a białko Bax jest głównym efektem, poprzez które białko supresorowe p-53 indukuje apoptozę. Brak białka Bax może być przyczyną nieskuteczności chemioterapii zależnej od p-53.

Białka z rodziny Bcl-2 występują w postaci homo- lub heterodimerów. Podczas indukcji apoptozy przemieszczają się do zewnętrznej błony mitochondrialnej i tworzą kanały jonowe. Poprzez regulację przepuszczalności wody i jonów z mitochondrium mogą uwalniać kolejne białka proapoptotyczne [13, 23].

Proces apoptozy regulowany jest także przez szereg genów supresorowych i onkogenów. Różne białka, które są produktami działania genów, takie jak: białko p-53, p-Rb, c-myc, indukują lub hamują proces apoptozy w zależności od typu komórek i czynnika indukującego [6, 7, 14, 32]. Białka te są czynnikami transkrypcyjnymi oddziałującymi ze specyficznymi sekwencjami DNA, ich delecja lub inaktywacja jest wykazywana w ponad połowie nowotworów [6, 7, 18, 32, 48].

BUDOWA JAJNIKA LUDZKIEGO I DOJRZEWANIE PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH

Jajnik jest parzystym narządem położonym wewnątrztrzewnowo. Zbudowany jest z kory zawierającej pęcherzyki w różnym stopniu rozwoju (pierwotne, wzrastające, dojrzewające i dojrzałe), w których rozwijają się komórki jajowe oraz rdzenia zbudowanego z wiotkiej tkanki łącznej zawierającej włókna sprężyste i pojedyncze miocyty oraz naczynia krwionośne, chłonne i nerwy. W jajniku obecne są także komórki wnękowe przypominające komórki śródmiąższowe jądra oraz węzły tkanki przypominającej nadnercza, czyli reszty Marchanda [43].

Po menopauzie jajnik ulega znacznemu zmniejszeniu, nie zawiera pęcherzyków, a strukturę jego stanowi głównie włóknista tkanka łączna, naczynia krwionośne, limfatyczne i nerwy. U kobiet badanych w okresie do 5 lat po menopauzie stwierdza się ciała białawe zbudowane z fibroblastów, makrofagów i miofibroblastów [43].

Rozwój, wzrost, dojrzewanie i pęknięcie pęcherzyków jajnikowych oraz powstanie ciała żółtego i jego prawidłowe funkcjonowanie są procesami skomplikowanymi, w których biorą udział między innymi czynniki endokrynne (FSH, LH, estradiol, progesteron), parakrynne i autokrynne (IGF-1, IGF-2, EGF, TGF, FGF), protoonkogeny i geny supresorowe [5, 6, 7, 10, 34, 37]. Oprócz udowodnionego wpływu szeregu czynników ostatnio sugerowany jest także udział w tym procesie składników macierzy zewnątrzkomórkowej: tenascyny i fibronektyny [52]. W prawidłowym cyklu jajnikowym

spośród pęcherzyków pierwotnych powstają pęcherzyki dojrzewające, które między 1 a 4 dniem cyklu ulegają rekrutacji, a następnie między 5 a 7 dniem cyklu selekcji. Ostatecznie z kilku zrekrutowanych pęcherzyków jajnikowych dojrzewa jeden najczęściej pęcherzyk dominujący, pozostałe ulegają atrezji. Po owulacji powstaje ciało żółte, najbardziej aktywny hormonalnie gruczoł dokrewny organizmu kobiety. Jeśli w danym cyklu nie dojdzie do zapłodnienia komórki jajowej, ciało żółte ulega regresji, zwyrodnieniu tłuszczowemu i powstaje bogata w kolagen blizna, czyli ciało białawe [43, 49].

FUNKCJA HORMONALNA JAJNIKA

W okresie rozrodczym w komórkach tekalnych jajnika są syntetyzowane androgeny, które przechodzą do komórek ziarnistych i tam ulegają aromatyzacji do estrogenów. Czynność komórek tekalnych regulowana jest przez LH, zaś aktywność aromatazy P-450 komórek ziarnistych zależna jest od FSH. Podstawowym hormonem produkowanym przez ciało żółte jest progesteron [43]. Menopauza nie oznacza całkowitego wygaśnięcia funkcji hormonalnych jajnika. Atrezja pęcherzyków jajnikowych oznacza zakończenie cyklicznej czynności jajników i tym samym zdolności rozrodczych, ale nie jest równoznaczna z tym, że jajnik zostaje zastąpiony nieczynną hormonalnie tkanką łączną. Utrzymana zostaje, w zmniejszonym stopniu funkcja komórek osłonki i nadal produkowane są pewne ilości steroidów, głównie androgenów. Dowodzą tego liczne badania przeprowadzone u kobiet po menopauzie, które wykazały w jajniku aktywność aromatazy P-450 oraz dehydrogenazy 3- β - i 17- β -steroidowej. Także doniesienia mówiące o obecności receptorów błonowych dla FSH i LH oraz receptorów cytoplazmatycznych dla estrogenów, androgenów i progesteronu świadczyć mogą o aktywności hormonalnej tkanki jajnikowej w tym okresie [43].

APOPTOZA W PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH

Opisane powyżej znaczne obkurczanie się komórki w procesie apoptozy (nawet o 30–50% objętości) powoduje utratę kontaktu z komórkami sąsiednimi. W pęcherzyku Graffa po utracie połączeń komórki jajowej z komórkami ziarnistymi dochodzi do zapadnięcia jamy pęcherzykowej i pofałdowania oraz obkurczenia osłonki przejrzystej. Błona podstawna pęcherzyka ulega pofałdowaniu, pogrubieniu i przekształcona zostaje w błonę szklaną. Pęcherzyk atrezyjny zostaje przekształcony w bliznę [10, 15, 17, 19, 20].

Wiadomo, że noworodek płci żeńskiej w chwili narodzin posiada około 2 milionów oocytów, z czego w okresie pokwitania pozostaje około 400 tysięcy, a owuluje mniej niż 500 [43, 49]. Udowodniono, że to apoptoza prowadzi do atrezji pęcherzyków jajnikowych przed osiągnięciem przez nie zdolności do owulacji. W wyniku apoptozy dochodzi do procesów degeneracyjnych w pęcherzykach już uformowanych oraz zaniku komórek terminalnych [11, 19, 20, 31]. Już w 1978 roku wykazano obecność jąder pyknotycznych w komórkach ziarnistych oraz w komórkach osłonki pęcherzyka w jajniku ludzkim. W 1989 roku stwierdzono w jajniku aktywność kluczowych enzymów apoptozy, czyli

endonukleaz zależnych od Ca i Mg, a w 1992 roku potwierdzono fragmentację jądrowego DNA jajnika ludzkiego świadcząca o zakończonym procesie apoptozy [17, 47]. W wieku rozrodczym w pęcherzyku Graffa w wyniku apoptozy dochodzi do szeregu zmian czynnościowych: zmniejszenia ekspresji receptorów dla gonadotropin, obniżenia aktywności 17- α -hydroksylazy i 17, 20-liazy. Zmiany te doprowadzają do zmniejszenia produkcji estradiolu oraz zmniejszenia stężenia IGF-1 czynnika stymulującego proliferację komórek ziarnistych [3, 11, 17, 31].

W badaniach przeprowadzonych w jajniku wykazano obecność błonowego mRNA dla receptora Fas w komórkach ziarnistych. Metodami immunohistochemicznymi wykazano ekspresję Fas w komórkach pęcherzyków wykazujących cechy atrezji. Nie stwierdzono natomiast obecności tej glikoproteiny w komórkach prawidłowych. Obecność liganda dla Fas opisano w oocytach prawidłowych i atrezyjnych [9, 17, 29].

W innych badaniach wykazano, że system Fas/FasL jest skutecznie hamowany przez tlenek azotu i tym samym NO może okazać się istotnym czynnikiem ograniczającym atrezię pęcherzyków jajnikowych [9, 10]. Najważniejsze czynniki regulujące apoptozę w komórkach ziarnistych jajnika to gonadotropiny, gonadoliberyna, estrogeny, androgeny, IGF-1 i jego białka wiążące, bFGF, EGF, TGF- α , TNF- α [18], a także według najnowszych doniesień tromboproteiny [42], metaloproteinazy i inhibina A [12, 15].

Badając znaczenie kinaz w apoptozie komórek ziarnistych doniesiono, że aktywna mitogenicznie kinaza białkowa PTK aktywuje apoptozę komórek ziarnistych poprzez stymulację białkowej fosfatazy tyrozynowej PTP. PTP oraz PTK grają główną rolę w mechanizmie wzrostu i metabolizmu komórek ziarnistych [7, 25, 29, 44].

W badaniach nad wpływem hormonów na apoptozę jajnikową udowodniono, że przeciwciała skierowane przeciwko gonadotropinom przysadkowym powodują atrezię pęcherzyków przedowulacyjnych, a zatem gonadotropiny FSH i LH chronią oocyt przed apoptozą. W innych badaniach przeprowadzonych na szczurach stwierdzono obniżone stężenia mRNA dla receptorów gonadotropin FSH i LH w pęcherzykach atrezyjnych. Gonadoliberyna (GnRh) działając bezpośrednio na jajnik jest czynnikiem wywołującym atrezię pęcherzyków [18, 28, 35]. Wykazano, że podanie GnRH obniża masę jajnika, zmniejsza liczbę komórek antralnych i przedowulacyjnych oraz zwiększa stężenia wapnia w komórkach ziarnistych, co aktywuje endonukleazy degradujące DNA [18, 26, 28, 35]. Na podstawie doświadczeń wykonanych u szczurów pozbawionych przysadki mózgowej udowodniono, że nasilenie apoptozy w wzrastających i dojrzewających komórkach ziarnistych było tym większe, im większe były dawki substytucyjne agonistów GnRh i dietylostylbestrolu. Oceniając wpływ androgenów i estrogenów na apoptozę wykazano, że w płynie pęcherzyków atrezyjnych stężenia androgenów są większe niż w pęcherzykach prawidłowych. Podając substytucyjnie androgeny i estrogeny szczurom pozbawionym przysadki udowodniono, że androgeny przyspieszają, a estrogeny hamują apoptozę jajnikową w komórkach ziarnistych pęcherzyków preantralnych i antralnych. W tych samych badaniach wykazano, że również IGF-1, EGF, TGF- α w hodowli *in vitro* komórek ziarnistych pęcherzyków przedowulacyjnych hamują apoptozę [16, 17, 24, 28, 29, 35].

Inhibina A jest białkowym hormonem jajnikowym, produkowanym przez komórki ziarniste, komórki tekalne i ciało żółte. Inhibina A skutecznie hamuje kaspazę 3 i białka

Bax, co owocuje zablokowaniem apoptozy przede wszystkim w komórkach ziarnistych [11, 45]. Wykazano ponadto istotną korelację pomiędzy stężeniem IGF o niskiej masie cząsteczkowej w płynie pęcherzykowym pacjentek stymulowanych w programach zapłodnienia pozaustrojowego a aktywnością kaspazy 3 i jakością oocytów [11, 33]. Badanie to jako metoda nieinwazyjna może posłużyć w przyszłości do testu przesiewowego jakości oocytów i prognozowaniu skuteczności procedur IVF/ET [33, 45, 51].

Ciałko żółte, jak już wspomniano, także ulega procesom apoptozy, które prowadzą do luteolizy i całkowitego jego zaniku. Wykazano jednak, że gonadotropina kosmówkowa ma zdolność hamowania apoptozy i utrzymywania funkcji tego gruczołu. Taka sytuacja występuje w ciąży [30, 45, 51]. W ostatnim czasie wykazano także, że trofoblast produkuje jeszcze inny czynnik lub czynniki, dokładnie nieokreślone, które działają poprzez białka bax/bcl-x, hamują apoptozę i wydłużają funkcję ciała żółtego [13, 30, 51]. Ponadto udowodniono, że za prawidłową angiogenezę i wydolność ciała żółtego w ciąży odpowiada VEGF i receptor VEGF typu 2. Podanie przeciwciał przeciw VEGF ciężarnym samicom spowodowało nasilenie procesów apoptozy w ciałku żółtym, zmniejszenie stężenia progesteronu, zmniejszenie rozmiarów zarodka [36, 45].

Działając poprzez kinazę białkową typu A procesy apoptozy w jajniku regulowane są także przez tromboproteiny. Powodują one zmniejszenie produkcji androstendionu, estradiolu, TGF-2 beta, natomiast wzrost produkcji oksytocyny, inhibin A i B oraz IGF-1 [42].

PODSUMOWANIE

Przedstawione w artykule informacje wskazują, że mechanizmy apoptozy w jajniku są bardzo skomplikowane i nie do końca poznane. Trwające aktualnie badania dotyczą przede wszystkim regulacji apoptozy i możliwości sterowania tym procesem w jajniku w zaburzeniach endokrynologicznych i w chorobach nowotworowych. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania apoptozy w jajniku ludzkim, zwłaszcza w okresie menopauzy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ARDEN N, BETENBAUGH MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 2004; **22**: 174–180.
- [2] ARRAZTOA JA, ZHOU J, MARCU D, CHENG C, BONNER R, CHEN M, XIANG C, BROWNSTEIN M, MAISEY K, IMARAI M, BONDY C. Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. *Hum Reprod* 2005; **20**: 476–483.
- [3] AMSTERDAM A, DANTES A, HOSKAWA K, SCHERE-LEVY CP, KOTSUJI F. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* 1998; **63**: 314–318.
- [4] AMSTERDAM A, SASSON R, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, RIMON E, LAND A, COHEN T, DOR Y, HIRSH L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem Pharmacol* 2003; **15**: 1355–1362.
- [5] AMSTERDAM A, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, LANG-BRACHA A, RIMON E, SASSON R, HIRSH L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids* 2003; **68**: 861–867.

- [6] BAUM JS, ST GEORGE JP, McCALL K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 245–259.
- [7] BIELAK-ŻMIJEWSKA A, KORONKIEWICZ M, SKIERSKI J., PIWOCKA K, RADZISZEWSKA E, SIKORA E. Effect of curcumin on the apoptosis of rodent and human nonproliferating and proliferating lymphoid cells. *Nutr Cancer* 2000; **38**: 131–138.
- [8] BUFET NC, BOUCHARD P. The neuroendocrine regulation of the human ovarian cycle. *Chronobiol Int* 2001; **18**: 893–919.
- [9] CHEN Q, YANO T, MATSUMI H, OSUGA Y, YANO N, XU J, WADA O, KOGA K, FUJIWARA T, KUGU K, TAKETANI Y. Cross-talk between Fas/Fas ligano system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis; a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. *Endocrinol* 2005; **146**: 808–815.
- [10] CHUN SY, HSUEH AJ. Paracrine mechanism of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol* 1998; **38**: 63–75.
- [11] DEKOVA R, BOURNEVA V, STANEVA-DOBROVSKI L, ZVETKOVA E, BALEVA K, YANEVA E, NIKOLOV B, IVANOV I, SIMEONOV K, TIMEVA T, YANKOV M. *In vitro* effects on apoptosis and apoptosis related proteins in human ovarian granulosa cells. *Endocr Regul* 2004; **38**: 51–55.
- [12] DHARMARAJAN AM, GOODMAN SB, ATIYA N, PARKINSON SP, LAREU RR, TILLY KI, TILLY JL. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit *corpus luteum*; evidence of a role for placental-derived factors in promoting luteal cell. *Apoptosis* 2004; **9**: 807–814.
- [13] DOBRYSZYCKA W. Patofizjologia programowanej śmierci komórki. *Post Med Dośw* 1998; **52**: 423–444.
- [14] DOBRYSZYCKA W. Rola programowej śmierci komórki w raku jajnika – aspekty kliniczne. *Adv Clin Exp Med* 2000; **9**: 217–228.
- [15] FATA JE, HO AT, LECO KJ, MOOREHEAD RA, KHOKHA R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 77–95.
- [16] GOSPEN R, SPEARS N. Programmed cell death in the reproductive system. *Br Med Bull* 1997; **53**: 644–661.
- [17] GROTOWSKI W, LECYBYŁ R, WARENIK-SZYMANKIEWICZ A, TRZECIAK W. Rola apoptozy komórek ziarnistych w procesie atrezji pęcherzyków jajnikowych. *Gin Pol* 1997; **68**: 317–326.
- [18] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Apoptoza i nowotwory. *Post Biol Kom* 2000; **15**: 9–43.
- [19] HUSSEIN M R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Updat* 2005; **11**: 162–178.
- [20] KAMO A, ARAKI Y, MAEDA K, WATANABLE H. Characteristics of invasive cells found in between *zona pellucida* and oocyte during follicular atresia in mice. *Zygote* 2004; **12**: 269–276.
- [21] KHAN S.M., OLIVER R.H, YEH J. Epidermal growth factor receptor inhibition by tyrphostin 51 induces apoptosis in luteinized granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 469–473.
- [22] KILIAŃSKA-ŻMIJEWSKA ZM, MICKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców, ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [23] KIM MR, TILLY JL. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 205–210.
- [24] KRYSKO DV, MUSSCHE S, LEYBAERT L, D'HERDE K. Gap junctional communication and connexin 43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *Histochem Cytochem* 2004; **52**: 1199–1207.
- [25] LACHOWICZ A, RĘBAS E, ŻYLIŃSKA L, LACHOWICZ L. Różnorodne aspekty działania kinaz białkowych w apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–124.
- [26] LEUNG PC, CHENG CK, ZHU XM. Multifactorial role of GnRh-I and GnRh-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **202**: 145–153.
- [27] ŁAZARCZYK M, GRZELA T. Rodzina peptydów zwanych domeną koniczyno-podobną. *Post Biol Kom* 2000; **1**: 125–136.
- [28] MANABE N, GOTO Y, MATSUDA-MINEHATA F, INOUE N, MAEDA A, SAKAMAKI K, MIYANO T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev* 2004; **50**: 493–514.
- [29] MARKSTROM E, SVENSSON ECH, SHAO R, SVANBERG B, BILING H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; **123**: 23–30.
- [30] MARTI A, JAGGI R, VALLAN C, RITTER PM, BALTZER A, SRINIVASAN AM, FRIIS RR. Physiological apoptosis in hormone-dependent tissues: involvement of caspases. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1190–1200.
- [31] MORITA Y, TILLY JL. Sphingolipid regulation of female gonadal cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2000; **905**: 209–220.
- [32] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **3**: 315–334.

- [33] NICHOLAS B, ALBERIO R, FOULADI-NASHTA AA, WEBB R. Relationship between low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins, caspase-3 activity, and oocyte quality. *Biol Reprod* 2004; **24**: 145–160.
- [34] QUINTANA R, KOPCOW L, SUELDO C, MARCONI G, RUEDA NG, BARANAO RI. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril* 2004; **82**: 1101–1105.
- [35] PARBORELL F, IRUSTA G, VITALE A, GONZALES O, PECCI A, TESONE M. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Reprod* 2005; **72**: 659–666.
- [36] PAULI SA, TANG H, WANG J, BOHLEN P, POSSER R, HARTMAN T, SAUER MV, KITAJEWSKI J, ZIMMERMANN RC. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in *corpora lutea* of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 2005; **146**: 1301–1311.
- [37] PELUSO JJ. Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATP-ase (PCMA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 363–369.
- [38] PRU JK, TILLY JL. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 2001; **15**: 845–853.
- [39] PUSHKALA K, GUPTA PD. Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. *Cytobios* 2001; **106**: 201–217.
- [40] ROLAKI A, DRAKAKIS P, MILLINGOS S, LOUTRADIS D, MAKRIGINNAKIS A. Novel trends in follicular development, atresia and *corpus luteum* regression: role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2005; **11**: 93–103.
- [41] SAITO T, OKADA S, OHSHIMA K, SATO M, UEHARA Y, SHIMIZU H, PESSIN J E, MORI M. Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF. *Endocrinol* 2004; **145**: 4232–4243.
- [42] SIROTKIN A.V, SANISLO P, SCHAEFFER HJ, FLORKOVICOVA I, KOTWICA J, BULLA J, HETENYI L. Thromboprotein regulates proliferation, apoptosis, secretory activity and intracellular messengers in porcine ovarian follicular cells: involvement of protein kinase A. *J Endocrinol* 2004; **183**: 595–604.
- [43] SKAŁBA P. Endokrynologia ginekologiczna. 1993: 22–24.
- [44] TAMURA M, NAKAGAWA Y, SHIMIZU H, YAMADA N, MIYANO T, MIYAZAKI H. Cellular function of mitogen-activated protein kinases and protein tyrosine phosphatases in ovarian granulosa cells. *J Reprod Dev* 2004; **1**: 47–55.
- [45] TILLY JL. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. *Toxicol Lett* 1998; **102–103**: 497–501.
- [46] TILLY JL. Oocyte apoptosis: prevention strategies, and implications for female aging and the menopause. *Ann Endocrinol* 2003; **64**: 82–84.
- [47] WEI P. Fas, FasL, Bcl-2, and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle. *Mol Reprod Dev* 2005; **70**: 478–484.
- [48] WIDŁAK P. Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 111–124.
- [49] VASKIVUO TE, TAPANAINEN JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online* 2003; **6**: 24–35.
- [50] VITAL REYES VS, TELLEZ VELASCO S, HINOJOSA CRUZ JC, REYERS FUENTES A. Ovarian apoptosis. *Ginecol Obstet Mex* 2001; **69**: 101–107.
- [51] XAVIER PA. Apoptosis and human reproduction. *Acta Med Port* 2002; **15**: 287–291.
- [52] YASUDA K, HAGIWARA E, TAKEUCHI A, MUKAI C, MATSUI C, SAKAI A, TAMOTSU S. Changes in the distribution of tenascin and fibronectin in the mouse ovary during folliculogenesis, atresia, *corpus luteum* formation and luteolysis. *Zoolog Sci* 2005; **22**: 237–245.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 09.06.2005 r.

Przyjęto: 25.11.2005 r.

ul. Unii Lubelskiej 1, 72-252 Szczecin

e-mail: agabrod@wp.pl