

Apoptoza w atrezji pęcherzyków jajnikowych

BARBARA BŁASZCZYK, JAN UDAŁA, DARIUSZ GĄCZARZEWICZ

Zakład Rozrodu Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 6, 71-460 Szczecin

Błaszczuk B., Udała J., Gączarzewicz D.
Apoptosis in the atresia of ovarian follicles

Summary

A number of experiments have shown that only few among the follicles which start growing, are ovulable while the rest become atretic. In the regulation of atresia process primarily gonadotropins and steroids participate as well as many other growth factors.

Recent studies have demonstrated that apoptosis of granulosa cells is one of the main factors responsible for follicular atresia. It is believed that in programmed granulosa cell death a decisive role is played by secondary messenger signal cells. It was also shown, that apoptosis of granulosa cells can be initiated by disturbances of metabolism cAMP. In the process this will reach to the expression of genes responsible for degenerative changes of a cell leading to its death.

The course of apoptosis of granulosa cells is characterized by similar morphological and biochemical changes which accompany apoptosis of other types of cells. These changes constitute one of the processes initiating changes of structural ovarian follicles.

Programmed death of granulosa cells is therefore another piece of evidence, that apoptosis is a physiological process regulating tissue regression and reconstruction.

Keywords: apoptosis, atresia, granulosa cells, follicle ovarian.

Jednym z warunków utrzymania homeostazy tkankowej organizmu jest zachowanie równowagi pomiędzy komórkami dzielącymi się a umierającymi. Mechanizm regulacji liczby komórek odbywa się na poziomie kontroli ich podziałów i śmierci programowanej (11). Dlatego też uważa się, że naturalnym procesem fizjologicznym, równie ważnym jak proliferacja czy różnicowanie się komórek jest apoptoza, która przebiega w licznych komórkach zarówno w rozwoju zarodkowym jak i w dorosłym organizmie zwierzęcym. Poprzez apoptozę organizm eliminuje komórki zbędne, które spełniły już swoją funkcję i na pewnych etapach rozwoju stały się niepotrzebne czy nawet niebezpieczne. Dzięki tej selekcji możliwe jest prawidłowe funkcjonowanie całych tkanek i narządów. Niektórzy autorzy sugerują, że przebieg apoptozy różnych populacji komórkowych mimo wielu cech wspólnych zawiera też pewne różnice, które wydają się być specyficzne tkankowo (20, 43). Różnice te dotyczą przede wszystkim sygnałów indukujących uruchomienie genetycznego programu śmierci komórki.

Przykładem apoptozy komórek tkanek hormonozależnych jest autodegradacja komórek ziarnistych towarzysząca atrezji pęcherzyków jajnikowych, które nie uzyskały pełnej dojrzałości przesądzając tym samym o losie niedojrzałych oocytów (4, 9, 43). Z apoptozą

związana jest również regresja komórek ciała żółtego (10), a także zanik komórek *endometrium* (43).

Przeprowadzone badania przez wielu autorów pozwalają sądzić, że o prawidłowej, cyklicznej czynności jajnika w okresie reprodukcyjnym samicy decydują zarówno procesy związane z proliferacją, różnicowaniem jak i apoptozą (4, 9, 11, 12, 34). Zachwianie równowagi pomiędzy tymi procesami może prowadzić do nadumieralności bądź przerostu komórek. Wyjaśnienie tych zjawisk jest przedmiotem wielu badań. Dokładne poznanie mechanizmu śmierci komórkowej daje bowiem nowe możliwości leczenia jajnikowych zaburzeń, takich jak torbiele jajnikowe czy przedwczesne wygasanie czynności jajników (9, 17, 34).

Atrezja pęcherzyków jajnikowych

W jajnikach dojrzałych płciowo samic, w czasie każdego cyklu, szereg pęcherzyków jajnikowych rozpoczyna wzrost, ale tylko nieliczne osiągają pełną dojrzałość i zdolność do owulacji. Pozostałe pęcherzyki ulegają masowej degeneracji, zwanej atrezją pęcherzykową. W zależności od gatunku, liczba degenerujących pęcherzyków waha się od 75% do 99,9% (49, 50). Częstotliwość atrezji jest zróżnicowana i zależy od stadium rozwoju pęcherzyków, jak również od fazy cyklu jajnikowego. Wykazano, że u sów wzmocniona

atrezja ma miejsce między 5 a 7 dniem cyklu rujowego (14). Przypuszcza się, że to czy pęcherzyk ulegnie atrezji czy też będzie dalej się różnicował zależy od zsynchronizowania jego dojrzałości z odpowiednim środowiskiem hormonalnym panującym w danym czasie w jajniku.

O dojrzałości pęcherzyków decyduje obecność receptorów FSH w komórkach warstwy ziarnistej pozwalająca na „skorzystanie” z podwyższonego poziomu tej gonadotropiny w mikrootoczeniu pęcherzyka. Działanie FSH polega na stymulacji podziałów mitotycznych komórek warstwy ziarnistej, na indukcji własnego receptora, a także na uaktywnieniu systemu aromatyzacji. Dzięki tym zmianom pęcherzyk jajnikowy staje się zdolny do produkcji estrogenów (44). Wzmocniona synteza estradiolu, a także produkowana przez komórki ziarniste dominujących pęcherzyków inhibina przyhamowuje sekrecję FSH. Obniżony poziom FSH upośledza rozwój pozostałych pęcherzyków, które gorzej wyposażone w system aromatyzacji ulegają atrezji (31, 49). W pęcherzykach atretycznych u świń wykazano, że wraz ze wzrostem atrezji, w komórkach osłonki wewnętrznej maleje synteza P450c17 (oksydazy cytochromowej katalizującej przejście progestagenów w androgeny) przy nie zmienionym poziomie 3 β HSD (dehydrogenazy aktywującej przejście pregnenolonu w progesteron). Natomiast w komórkach ziarnistych obniża się ilość receptorów androgennych i zahamowana zostaje aktywność P450^{AROM} (aromatazy aktywującej przejście androgenów w estrogeny) (14). W efekcie tych zmian dochodzi do spadku produkcji estradiolu i wzrostu poziomu progesteronu. Uważa się, że powyższe zmiany steroidogenne w degenerujących pęcherzykach są charakterystyczne dla procesu atrezji (18, 31). Liczne dane wskazują, że estradiol jest ważnym czynnikiem zabezpieczającym pęcherzyk przed degeneracją (34, 44).

Wielu autorów podkreśla istotną rolę peptydowych czynników wzrostu, które działając na drodze parakrynej i autokrynej uczestniczą w promowaniu wzrostu pęcherzyka lub jego atrezji (12, 17, 26, 31). Spośród czynników stymulujących proliferację i różnicowanie się komórek pęcherzykowych należy wymienić insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1), którego głównym źródłem są komórki warstwy ziarnistej. IGF-1 wzmacnia stymulacyjny wpływ FSH na aktywność aromatazy, produkcję estradiolu oraz ekspresję receptorów LH (30). Z kolei jego synteza i uwalnianie stymulowane jest przez FSH i estradiol, a hamowane prawdopodobnie przez GnRH i GH (26). FSH wpływa na aktywację IGF-1 poprzez ograniczanie wytwarzania jego nośników białkowych (IGFBPs) (26), jak również częściowo poprzez stymulację syntezy specyficznych proteaz powodujących degradację tych nośników (31). Znaczenie nośnikowych białek wiążących sprowadza się w głównej mierze do blokowania działania insulinopodobnych czynników wzrostowych, a tym samym do odcięcia komórek od czynników troficznych

(17, 26). Wykazano, że atrezja w dużej mierze związana jest z wewnątrzpęcherzykowym wzrostem stężenia IGFBPs. Wysoki poziom IGFBP-2, -4, -5, a także obniżoną aktywność proteolityczną enzymów odpowiedzialnych za degradację tych białek stwierdzono w płynie świńskich pęcherzyków atretycznych (5). Istnieją dowody, że czynnikiem powodującym wzrost IGFBP-4 i -5 jest GnRH (13). Sugeruje się, że źródłem tego hormonu oprócz podwzgórza jest jajnik (26, 49). Na zasadzie lokalnej regulacji gonadoliberyna blokowałaby aktywność proteaz, a tym samym ograniczałaby aktywność insulinopodobnych czynników wzrostowych. U niedojrzałych szczurów z usuniętą przysadką mózgową podanie agonisty GnRH powodowało znaczne obniżenie receptorów IGF-1, co potwierdza hamujący wpływ gonadoliberyny na aktywność insulinopodobnych czynników wzrostu (1). Należy jednak zaznaczyć, że takie działanie GnRH ograniczone jest tylko do komórek ziarnistych (8).

Oprócz IGF w kontroli wzrostu i atrezji pęcherzyków jajnikowych uczestniczą pozostałe czynniki wzrostowe (bFGF, aFGF, TGF α , TGF β , EGF, IL-1, PDGF, inhibina, aktywina), których sekrecja uzależniona jest od gonadotropin oraz innych czynników wzrostowych bądź nośników białkowych (12, 26).

Wykazano także, że czynnikiem wpływającym na atrezję mogą być androgeny (31), przy czym w czasie atrezji pęcherzyków przedantralnych występuje wzrost, a w czasie atrezji pęcherzyków antralnych spadek syntezy tych steroidów. Przypuszcza się, że w pierwszym przypadku rola androgenów polega na ograniczaniu liczby receptorów estrogennych i zmniejszeniu aktywności aromatazy, a w drugim przypadku niski poziom androgenów pozbawia pęcherzyki substratów do syntezy estrogenów (7, 14).

Istnieją także doniesienia wskazujące, że dojrzałe pęcherzyki Graafa dysponują aktywniejszą obroną antyoksydacyjną. W płynie ludzkich pęcherzyków ulegających atrezji stwierdzono wyższe stężenie produktów nadtleniania lipidów niż w pęcherzykach dojrzałych. Nie wiadomo jednak, czy narastające nadtlenianie lipidów jest przyczyną, czy skutkiem rozwoju pęcherzyka w kierunku atrezji (24).

Mimo wielu prac poświęconych atrezji pęcherzyków jajnikowych nie wszystkie zagadnienia związane z tym procesem są wyjaśnione. Wydaje się jednak oczywistym, że zaburzona gospodarka hormonalna i metaboliczna w niedojrzałych pęcherzykach, które „przegrały” konkurencję o dostęp do czynników troficznych, jest głównym czynnikiem decydującym o ich atrezji (34). Badania ostatnich lat dostarczają coraz więcej dowodów świadczących, że proces atrezji rozpoczyna się od apoptozy komórek ziarnistych pęcherzyka (9, 18, 22, 28, 34, 35). Wbudowany w nie program samobójczej śmierci uaktywnia się z chwilą, gdy przestają do nich docierać odpowiednie sygnały z zewnątrz stymulujące ich wzrost i proliferację.

Apoptoza komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego

Jedną z koncepcji zakłada, że przebieg apoptozy można podzielić na fazę początkową, efektorową i degeneracyjną (29). Opierając się na tym podziale można przyjąć, że w początkowym etapie apoptozy komórek warstwy ziarnistej, zakłócona regulacja endokrynną, parakrynną i autokrynną jest czynnikiem indukującym proces samobójczej śmierci tych komórek. W czasie tego procesu dochodzi do ekspresji pewnych genów odpowiedzialnych za zmiany biochemiczne prowadzące w efekcie końcowym do morfologicznej degradacji komórki.

W apoptozie komórki decydującą rolę pełni niezrównoważenie działania drugorzędowych przekaźników sygnałów komórkowych (20). Mając na uwadze, że głównym przekaźnikiem aktywowanym bądź hamowanym przez hormony białkowe jest cAMP sugeruje się, że niedobory gonadotropin mogą powodować zaburzenia metabolizmu ATP wpływające z kolei na zmiany w metabolizmie energetycznym komórki. Cykliczny AMP znany jest jako jeden z czynników indukujących apoptozę (20, 33). W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że wysokie poziomy śródkomórkowego cAMP katalizują programowaną śmierć komórek granulocyty, podczas gdy pobudzenie komórek przez hormony gonadotropowe prowadzi do umiarkowanego wzrostu cAMP i może przedłużyć „życie” komórki (2). Niektóre doniesienia wskazują, że zaburzenia metabolizmu cAMP w komórkach ziarnistych wpływają na gwałtowne pobudzenie ekspresji genu *p53* (3, 42). Z licznych opracowań poświęconych genetycznej regulacji apoptozy wynika, że gen *p53* uczestniczy w indukcji tego procesu (33, 39, 45). Wzrost ilościowy produktu genu *p53* powoduje wyciszenie ekspresji genu *bcl-2*, który uważany jest za gen stymulujący proliferację komórek (39, 48). Zebrane dotychczas dane sugerują, że białko *bcl-2* odgrywa istotną rolę w błonie komórkowej przeciwdziałając utlenianiu lipidów przez wolne rodniki (47). Ekspresję genów z rodziny *bcl* obserwuje się zarówno w proliferacji jak i w apoptozie (45). Podwyższona ekspresja genu *bcl-2* zmniejsza wrażliwość komórek na czynniki wywołujące apoptozę natomiast inny produkt białkowy genów *bcl*, białko *bax*, powoduje nasilenie apoptozy (43). Proporcja białka *bcl-2* w stosunku do białka *bax* decyduje o śmierci bądź życiu komórki (47).

Powyższe zależności są przedmiotem badań w różnych populacjach komórkowych (33, 43, 45). W badaniach *in vivo* i *in vitro* na pęcherzykach szczurzych wykazano, że indukcja apoptozy komórek ziarnistych związana jest ze zwiększonym poziomem białka *bax* natomiast obniżony poziom tego białka związany jest z redukcją apoptozy. Stwierdzono ponadto hamujący wpływ egzogennej gonadotropiny (PMSG) na syntezę białka *bax* (50). Doświadczenie to potwierdza nadrzedną rolę gonadotropin w kontroli wzrostu i apoptozy komórek pęcherzykowych.

W ostatnich latach wykazano obecność innej rodziny białek, tzw. białek przezłonowych, związanych z procesem komórkowej śmierci (45, 46). Zwrócono uwagę na białko receptorowe FAS, które łącząc się ze swoim naturalnym ligandem (FasL) indukuje apoptozę. Podwyższoną ekspresję FasL stwierdzono w komórkach ziarnistych pęcherzyków wykazujących cechy atrezji (35, 41). W komórkach tych wykazano także obecność cytokiny TNF α , należącej również do rodziny białek przezłonowych zaangażowanych w inicjację apoptozy (34).

Głównymi czynnikami uczestniczącymi w apoptozie są proteazy cysteinowe, zwane kaspazami (25). W komórkach granulocyty aktywacja tych białek zależy od systemu Fas/FasL i TNF α oraz od wzajemnej proporcji białek *bax* i *bcl-2* (34). Aktywne kaspazy powodują degradację szeregu białek takich jak laminy jądrowe, polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP) czy aktyna (10). PARP jest enzymem „naprawy” DNA i jego proteoliza w czasie apoptozy blokuje „naprawę” uszkodzeń nici DNA. Z kolei degradacja aktyny, występująca we wczesnym etapie apoptozy, może być jednym z czynników odpowiedzialnych za uwolnienie endonukleaz uczestniczących we fragmentacji jądrowego DNA (25). Rolę kaspaz w apoptozie komórek ziarnistych potwierdzają między innymi badania przeprowadzone przez Izawę (19) na pęcherzykach uzyskanych od kobiet i przez Boone (10) na pęcherzykach pobranych od zwierząt.

W wyniku kaskady proteolitycznej kaspaz uaktywnione zostają endonukleazy. Najwięcej danych wskazuje na to, że główną rolę w procesie degradacji DNA odgrywa endonukleaza zwana DNAzą I, której działanie zależy od Ca⁺² i Mg⁺² (31, 43, 47, 48). Enzym ten niszczy genomowe DNA na odcinki oligonukleosomowe o wielkości 180-200 par zasad (47, 48). Obserwuje się również fragmentację DNA na większe odcinki liczące około 300 kilopar zasad. Przypuszcza się, że za ten typ fragmentacji odpowiedzialna jest DNAza II (47). Pocięte odcinki DNA ulegają następnie kondensacji na obrzeżach jądra komórkowego. Fragmentację DNA można wykazać za pomocą elektroforezy na żelu agarowym uzyskując charakterystyczny obraz „drabinki”. W licznych badaniach nad identyfikacją apoptozy w komórkach ziarnistych stwierdzono taki właśnie typowy rozdział elektroforetyczny DNA (8, 18). Do wykrywania fragmentacji DNA stosuje się również metodę TUNEL, opartą na działaniu enzymu, który do wolnych końców 3'OH w pękniętej nici DNA dobudowuje znakowany nukleotyd. Dzięki tym badaniom udowodniono, że komórki ziarniste umierają na drodze apoptozy (14, 16, 21, 23).

Kolejnym wyznacznikiem fizjologicznej śmierci komórek ziarnistych jest charakterystyczna reorganizacja cytoszkieletu. Zachowane mitochondria i kropelki lipidowe pozostają w okolicy jądra, natomiast proteasomy oddalają się i gromadzą się na obrzeżach komórki (3, 4, 42). Sugeruje się, że proteasomy mogą

uczestniczyć w regulacji apoptozy nie uszkadzając przy tym oddalonych struktur steroidogennych (3, 4, 42). Ta wyjątkowa reorganizacja cytoszkieletu może stanowić barierę między aktywnością proteolityczną a aktywnością steroidogenną w apoptotycznej komórce ziarnistej (4).

Wraz ze zmianami cytoszkieletu, obserwuje się zmiany w cytoplazmie. Następuje jej kondensacja, a błona cytoplazmatyczna tworzy specyficzne uwypuklenia (ang. blebbing) (36, 43, 45). Obkurczona komórka rozpada się na fragmenty zawierające cząstki jądra, nienaruszone mitochondria i inne organella otoczone błoną. Powstają tzw. ciała apoptotyczne, a enzymami uczestniczącymi w ich tworzeniu są transglutaminazy odpowiedzialne za syntezę sieci białkowej (20, 43). Usieciowana otoczka ciałek apoptotycznych, odporna na proteolizę, zapobiega uwalnianiu potencjalnie szkodliwych wewnątrzkomórkowych makrocząsteczek do przestrzeni międzykomórkowych. Indukcja i aktywacja transglutaminaz zachodzi pod wpływem zwiększonego poziomu Ca^{+2} , którego rolę w procesie apoptozy podkreśla wielu autorów (20, 32, 47, 48). Prace Peluso (40) i Murdoch (37) potwierdzają zależność między wewnątrzkomórkowym stężeniem tego pierwiastka a apoptozą komórek ziarnistych.

Zmiany jakie zachodzą w błonach komórkowych są bardzo istotne, gdyż pozwalają komórkom fagocytyzującym na natychmiastowe rozpoznanie komórki umierającej bądź ciałek apoptotycznych (37, 43). Dzięki temu, że fragmenty komórek pochłaniane są w całości nie dochodzi do odczynów zapalnych (39). Ciała apoptotyczne komórek ziarnistych usuwane są na drodze fagocytozy przez makrofagi (15) i przez sąsiadujące nienaruszone komórki granulocyty (27). Uważa się, że działanie tych dwóch rodzajów komórek w powyższym procesie jest równorzędne (27).

Apoptoza komórek ziarnistych jest procesem związanym z selektywną eliminacją komórek pęcherzykowych. Istnieją podstawy by sądzić, że proces ten przebiega w pierwszej kolejności w komórkach ziarnistych zlokalizowanych w strefie zewnętrznej pęcherzyka, w tzw. warstwie muralnej (31, 38). Intensywność apoptozy zależy również od stadium dojrzałości pęcherzyka. Uruchomienie programu „samobójczej śmierci” zależy więc nie tylko od czynników zewnętrznych ale także od stopnia rozwoju komórki i jej lokalizacji (33, 44). Zgromadzone dane wskazują, że apoptoza dotyczy zawsze pojedynczych komórek wybieranych indywidualnie ze składu narządu. Śmierć komórek granulocyty pociąga za sobą zmiany biochemiczne i strukturalne w pęcherzyku (18, 22, 28, 31). Zmiany biochemiczne polegają w głównej mierze na zmianie kierunku steroidogenezy. Wraz ze śmiercią komórek ziarnistych następuje wygaśnięcie głównego źródła estradiolu. Prawdopodobnie jest to wyjaśnieniem, dlaczego w płynie pęcherzyków atretycznych obserwuje się wzrost poziomu progesteronu i znaczne obniżenie stężenia estradiolu. Ponadto degeneracja i oddzielenie się

komórek granulocyty od błony podstawnej powoduje utratę wzajemnego kontaktu między komórkami (18). W wyniku powstających luk międzykomórkowych dochodzi do zapadnięcia się jamy pęcherzykowej, pofałdowania i obkurczenia osłonki przejrzystej (16, 17). Interesujące są zmiany zachodzące w oocyty, który prawdopodobnie ginie również poprzez apoptozę (12, 43). W oocytach obserwuje się bowiem „figury” mejozy, podziały partenogenetyczne, fragmentację i lizę (49). Błona podstawna pęcherzyka ulega pogrubieniu, pofałdowaniu i przekształca się w błonę szklaną (17). W dalszych etapach, komórki osłonki wewnętrznej ulegają hipertrofii i przekształcają się wtórnie w komórki interstycjalne lub tworzą struktury podobne do ciała żółtego, w środku których widoczne są resztki oocytów (49). W toku dalszej inwolucji tych struktur pozostają tylko skupienia komórek śródmiąższowych, stanowiące gruczoł śródmiąższowy jajnika.

Przyjmując, że wszystkie procesy fizjologiczne zachodzące w zdrowym organizmie mają swoje uzasadnienie, nasuwa się szereg pytań dotyczących roli cyklicznej destrukcji pęcherzyków w prawidłowym funkcjonowaniu jajnika. Z pewnością pęcherzyki rozpoczynające wzrost jak i pęcherzyki ulegające atrezji uczestniczą w tworzeniu wewnątrzjajnikowego środowiska hormonalnego, dzięki któremu możliwe jest osiągnięcie pełnej dojrzałości przez pęcherzyki dominujące. Niewykluczone, że wzmożona synteza progesteronu w pęcherzykach atretycznych wpływa poprzez działanie parakryne na indukcję mejozy w dojrzewających oocytach. Badania ostatnich lat wskazują bowiem, iż pod wpływem progesteronu następuje aktywacja białek odpowiedzialnych za wznowienie podziału redukcyjnego w trakcie dojrzewania oocytów w pęcherzykach przedowulacyjnych (6).

Można zatem wnioskować, że apoptoza komórek ziarnistych poprzez swój wpływ na atrezję jest fizjologicznym procesem odgrywającym istotną rolę zarówno w eliminacji nadliczbowych pęcherzyków jak i w przebiegu cyklu jajnikowego. Należy jednak podkreślić, iż niezależnie od pozytywnych aspektów śmierci samobójczej, proces ten może być przyczyną poważnych chorób, o ile zostanie aktywowany w niewłaściwy sposób bądź zaburzona zostanie ścisła kontrola programu śmierci komórki.

Piśmiennictwo

1. Adashi E. Y., Resnick C. E., Vera A., Hernandez E.: In vivo regulation of granulosa cell type I insulin-like growth factor receptors: evidence for an inhibitory role for the putative endogenous ligand (s) of the ovarian gonadotropin-releasing hormone receptor, *Endocrinology* 1991, 128, 3130-3137.
2. Aharoni D., Dantes A., Oren M., Amsterdam A.: cAMP - mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells, *Exp. Cell. Res.* 1995, 218, 271-282.
3. Amsterdam A., Keren Tal I., Aharoni D.: Cross-talk between cAMP and p53-generated signals in induction of differentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells, *Steroids* 1996, 61, 252-256.
4. Amsterdam A., Dantes A., Selvaraj N., Aharoni D.: Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 1997, 62, 207-211.
5. Besnard N., Pisselet C., Monniaux D., Monget P.: Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy

- growing and atretic follicles in the pig ovary, *Biol. Reprod.* 1997, 56, 1050-1058.
6. Bielański Sz., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J., Przełęcka A.: Ultrastruktura i funkcja komórek, t. 6, PWN, Warszawa 1994, s. 219.
 7. Billing H., Furuta I., Hsueh A. J.: Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis, *Endocrinology* 1993, 133, 2204-2212.
 8. Billing H., Furuta I., Hsueh A. J.: Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells, *Endocrinology* 1994, 134, 245-252.
 9. Billing H., Chun S. Y., Eisenhauer K., Hsueh A. J.: Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise, *Hum. Reprod. Update* 1996, 2, 103-117.
 10. Boone D. L., Tsang B. K.: Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression, *Biol. Reprod.* 1998, 58, 1533-1539.
 11. Clement F.: Optimal control of the cell dynamics in the granulosa of ovulatory follicles, *Math. Biosci.* 1998, 152, 123-142.
 12. Driancourt M. A., Thuel B.: Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod. Nutr. Dev.* 1998, 38, 345-362.
 13. Erickson G. F., Li D., Sadrkhanloo R., Liu X. J., Shimasaki S., Ling N.: Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone: stimulation of insulin-like growth factor-binding protein-4 and atresia, *Endocrinology* 1994, 134, 1365-1372.
 14. Garrett W. M., Guthrie H. D.: Expression of androgen receptors and steroidogenic enzymes in relation to follicular growth and atresia following ovulation in pigs, *Biol. Reprod.* 1996, 55, 949-955.
 15. Gaytan F., Morales C., Bellido C., Aguilar E., Sanchez Criado J. E.: Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophagemediated event?, *Biol. Reprod.* 1998, 58, 52-59.
 16. Giebel J., Rune G. M.: Relationship between expression of integrins and granulosa cell apoptosis in ovarian follicles of the marmoset (*Callithrix jacchus*), *Tissue Cell* 1997, 29, 525-531.
 17. Grotkowski W., Lecybył R., Warenik-Szymankiewicz A., Trzeciak W. H.: Rola apoptozy komórek ziarnistych w procesie atrezji pęcherzyków jajnikowych, *Gin. Pol.* 1997, 68, 317-326.
 18. Hughes F. M. Jr., Gorospe W. C.: Biochemical Identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanism Underlying Follicular Atresia, *Endocrinology* 1991, 129, 2415-2422.
 19. Izawa M., Nguyen P. H., Kim H. H., Yeh J.: Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells, *Fertil. Steril.* 1998, 70, 549-552.
 20. Jendryczko A.: Apoptoza – kontrolowana śmierć komórki, *Post. Nauk. Med.* 1995, 8, 267-270.
 21. Jewgenow K., Wood T. C., Wildt D. E.: DNA degradation in mural granulosa cells of non – and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries, *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 48, 350-355.
 22. Jolly P. D., Tisdall D. J., Heath D. A., Lun S., McNatty K. P.: Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia, *Biol. Reprod.* 1994, 51, 934-944.
 23. Jolly P. D., Tisdall D. J., De'ath G., Heath D. A., Lun S., Hudson N. L., McNatty K. P.: Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate response to gonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes, *Biol. Reprod.* 1997, 56, 830-836.
 24. Józwiak M., Wołczyński S., Józwiak M., Szamatowicz M.: Zawartość produktów nadtleniania lipidów w ludzkim płynie pęcherzykowym a stopień dojrzałości pęcherzyków Graafa, *Gin. Pol.* 1997, 68, 243-246.
 25. Kamińska B., Stańczyk M.: Molekularne mechanizmy neurodegeneracji, *Post. Biol. Kom.* 1998, 25, (Supl. 11), 15-27.
 26. Kamiński T., Przala J.: Czynniki wzrostowe w jajniku, *Post. Biol. Kom.* 1994, 21, 79-92.
 27. Kasuya K.: Elimination of apoptotic granulosa cells by intact granulosa cells and macrophages in atretic mature follicles of the guinea pig ovary, *Arch. Histol. Cytol.* 1997, 60, 175-184.
 28. Kim J. M., Boone D. L., Auyeung A., Tsang B. K.: Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary, *Biol. Reprod.* 1998, 58, 1170-1176.
 29. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A.: Mitochondrial control of apoptosis, *Immunol. Today* 1997, 18, 44-51.
 30. Krzysiek J., Gregoraszczyk E.: Regulacja steroidogenezy komórek warstwy ziarnistej, *Endokr. Pol.* 1993, 44, 573-587.
 31. Krzysiek J., Gregoraszczyk E., Milewicz T., Klimek R.: Kontrola wzrostu i atrezji pęcherzyków jajnikowych, *Gin. Prakt.* 1996, 4, 39-41.
 32. Kuźnicki J., Puzianowska-Kuźnicka M.: Jony wapnia i apoptoza, *Post. Biol. Kom.* 1998, 25, (Supl. 11), 29-42.
 33. Lipski S.: Apoptoza – zaprogramowana śmierć komórki, *Farm. Pol.* 1997, 53, 925-932.
 34. Momiaux D., Huet C., Pisselet C., Mandon Pepin B., Monget P.: Mechanism, regulation, and manipulations of follicular atresia, *Contracept. Fertil. Sex.* 1998, 26, 528-535.
 35. Mori T., Xu J. P., Mori E., Saito S., Guo M. W.: Expression of Fas-Fas ligand system associated with atresia through apoptosis in murine ovary, *Horm. Res.* 1997, 48 (Suppl 3), 11-19.
 36. Murdoch W. J.: Programmed cell death in preovulatory ovine follicles, *Biol. Reprod.* 1995, 53, 8-12.
 37. Murdoch W. J.: Differential effects of indomethacin on the sheep ovary: prostaglandin biosynthesis, intracellular calcium, apoptosis, and ovulation, *Prostaglandins* 1996, 52, 497-506.
 38. Nakahara K., Saito H., Saito T., Ito M., Ohta N., Takahashi T., Hiroi M.: The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in vitro fertilization programs, *Fertil. Steril.* 1997, 68, 312-317.
 39. Ostrowski K.: Śmierć zaprogramowana, *Wiedza i Życie* 1994, nr 11, 12-14.
 40. Peluso J. J.: Putative mechanism through which N-cadherin-mediated cell contact maintains calcium homeostasis and thereby prevents ovarian cells from undergoing apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 1997, 54, 847-853.
 41. Peng X., Maruo T., Matsuo H., Takekida S., Deguchi J.: Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA, *Endocr. J.* 1998, 45, 247-253.
 42. Pitzer F., Dantes A., Fuchs T., Baumeister W., Amsterdam A.: Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death, *FEBS. Lett.* 1996, 394, 47-50.
 43. Radziszewska E.: Fizjologiczna rola apoptozy, *Post. Biol. Kom.* 1995, 22, 247-263.
 44. Roullillier P., Matton P., Dufour M., Sirard M. A., Guilbault L. A.: Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an in vitro model to study estradiol production, *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 50, 170-177.
 45. Rożynkova D.: Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek, *Post. Biol. Kom.* 1994, 21, 303-318.
 46. Sanak M.: Układy sygnałowe komórki – regulacja cyklu komórkowego i różnicowania, *Medycyna Prakt.* 1998, 7-8, 219-227.
 47. Siedlecki J. A.: Molekularny scenariusz apoptozy, *Wiedza i Życie* 1994, nr 11, 14-17.
 48. Sikora E.: Rola wapnia w apoptozie, *Kosmos* 1997, 46, 541-547.
 49. Szołtyś M.: Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych ssaków, *Post. Biol. Kom.* 1992, 19, 221-238.
 50. Tilly J. L., Tilly K. I., Kenton M. L., Johnson A. L.: Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels, *Endocrinology* 1995, 136, 232-241.