

## PREGLEDNI RAD – REVIEW PAPER

UDK 619:612.621:577.75

APOPTOZA KAO NAČIN PRIRODNOG ODUMIRANJA ČELIJA  
JAJNIKA\*

## APOPTOSIS AS FORM OF NATURAL OVARIAN CELL DEATH

Anita Radovanović, Jelka Stevanović, Dušan Gledić\*\*

Među signale za pokretanje apoptoze u ćelijama jajnika ubrajaju se razni hormoni, citokini, odsustvo faktora rasta i drugi. Svaki od njih, na svoj način, pokreće apoptozu kao oblik smrti u kome ćelija aktivno učestvuje tako što precizno sprovodi genetski programiran sled biohemijskih i morfoloških promena koje je vode u autodestrukciju. Apoptoza je fiziološki oblik smrti, pomoću kojeg se obezbeđuje uspostavljanje dinamičke ravnoteže između proliferacije, diferencijacije i odumiranja ćelija jajnika.

Do sada je potvrđeno da u jajnicima apoptozom odumiru folikularne ćelije, ovociti, ćelije klicinog epitela, ćelije teke i žutog tela. Fiziološka smrt ovih ćelija je sastavni deo normalne funkcije jajnika, kako tokom intrauterinog, tako i za vreme postnatalnog života. Naime, tokom intrauterinog razvoja jajnika apoptozom odumre oko polovina od ukupnog broja germinativnih ćelija (budućih ovocita), a posle rođenja njihova populacija postepeno se smanjuje „odabirom folikula” koji će nastaviti dalji razvoj (folikulogeneza) i apoptotskim odumiranjem ćelija onih folikula koji će podleći atreziji. Većina ćelija jajnika odumire apoptozom kontinuirano do kraja reproduktivnog perioda života zdravih ženki, a neke mogu da odumiru, na ovaj način, sve do smrti jedinke (na primer ćelije klicinog epitela).

Ključne reči: ćelije jajnika, apoptoza

**Uvod / Introduction**

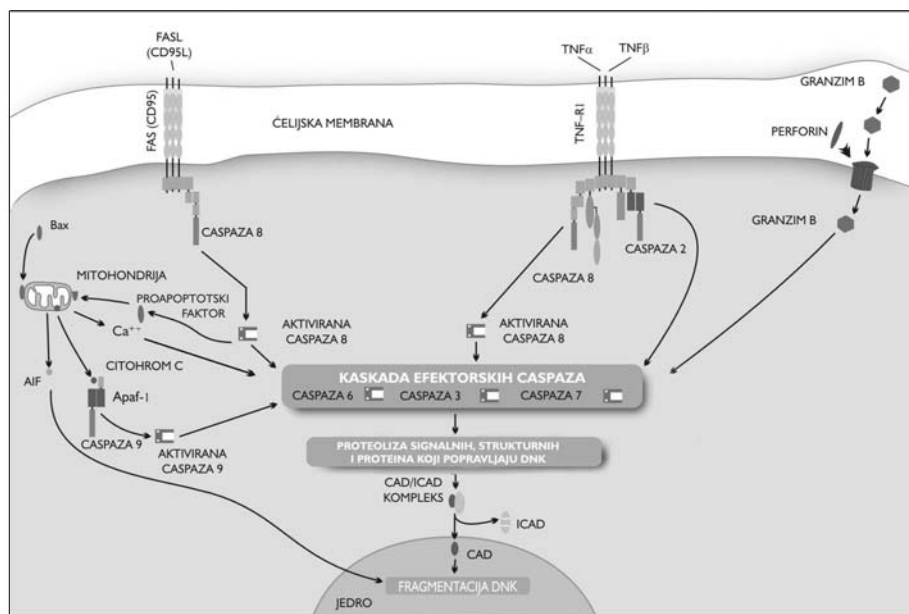
Apoptoza, kao vid ćelijske smrti, osnovni je genetski programirani mehanizam za kontrolu broja ćelija, kojim se uspostavlja dinamička ravnoteža iz-

\* Rad primljen za štampu 2. 2. 2004. godine

\*\* Dr Anita Radovanović, asistent, Katedra za histologiju i embriologiju, dr Jelka Stevanović, vanredni profesor, Katedra za fiziologiju i biohemiju, dr Dušan Gledić, redovni profesor, Katedra za histologiju i embriologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

među proliferacije, diferencijacije i odumiranja ćelija. Apoptoza asinhrono zahvata pojedinačne ćelije ili male grupe u okviru istog tkiva. U ovom obliku smrti, ćelija aktivno učestvuje tako što precizno sprovodi genetski programiran sled bio-hemijskih i morfoloških promena koje je vode u autodestrukciju. O značaju apoptoze za homeostazu broja ćelija najrečitije govori to što poremećaji ovog prirodnog načina odumiranja ćelija vode u razvoj autoimunskih, malignih i neurodegenerativnih procesa, reproduktivnih i drugih poremećaja [1, 2, 3].

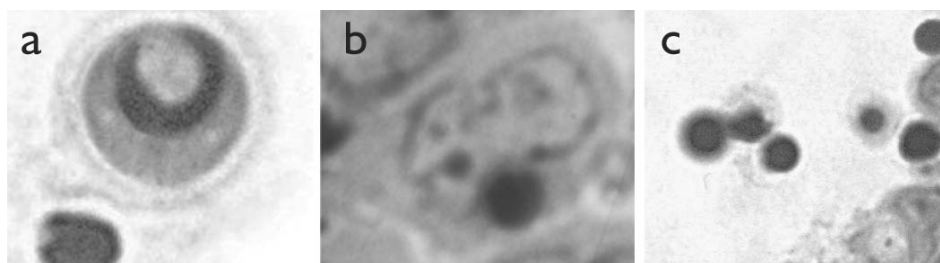
U cilju održavanja homeostaze broja ćelija na njih neprekidno deluju mnogobrojni proapoptotski i antiapoptotski faktori. Sposobnost ćelije da, u zavisnosti od svog metaboličkog statusa, starosti i faze razvoja, kao i od prirode i vremena pojavljivanja ovih signala, podlegne njihovom dejstvu ili ga uspešno izbegne, uvodi je u smrt apoptozom ili joj omogućava da nastavi započeti ciklus. *Signal za pokretanje apoptoze* je delovanje proapoptotskih faktora i/ili odsustvo faktora rasta. U opšte *proapoptotske faktore* ubrajaju se razni hormoni, citokini, virusni proteini, bakterije i njihovi toksini, neki joni, dejstvo umerene radijacije i drugi [4, 5]. Neki od njih su genotoksični, drugi deluju preko receptora na ćelijskoj membrani (apoptoza indukovana ligandima kao što su: *Fas ligandi*, hormoni i citokini), treći su proteolitički enzimi (granzimi i perforini) koji direktno ulaze u ćeliju kako bi indukovali njenu apoptozu (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz nekih od mehanizama aktivacije apoptoze i značaja mitohondrija za ovaj proces

Figure 1. Schematic presentation of some mechanisms that activate apoptosis and significance of mitochondria in this process

Premda su razlozi za ulazak ćelija u apoptozu različiti, posle pokretanja ovaj proces se odvija svojim tokom. Naime, apoptoza započinje latencijom, koja traje različito (od nekoliko minuta ili sati, do nekoliko dana), u zavisnosti od vrste signala i tipa ciljane ćelije, a ne može da se prepozna histološki [6, 7, 8]. Međutim, kako proces odmiče, biohemijske promene postepeno uzrokuju morfološki prepoznatljive znake apoptoze u vidu: kondenzacije hromatina (slika 2a), smanjenja volumena ćelije, fragmentacije DNK (slika 2b) i pupljenja ćelijske membrane kako bi se formirala apoptotska telašca (slika 2c). Ona sadrže delove citosola, jedra, jedarceta i očuvane ostale organele, zaodnute kompaktnom ćelijskom membranom [6, 7, 8, 9]. Apoptotska ćelija se konačno raspada na ova telašca, koja razni fagociti i okolne ćelije uklanjaju i razgrađuju, a njihove razgradne produkte koriste za svoje potrebe tako da ne dolazi do razvoja patološkog procesa [7].

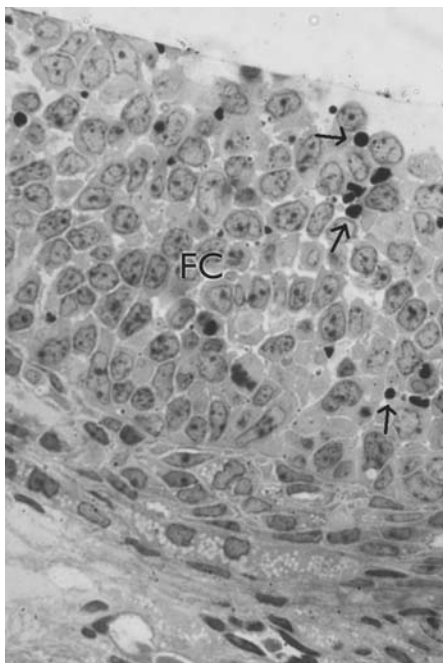


Slika 2. Apoptoza folikularnih ćelija jajnika pacova: a. kondenzacija hromatina u obliku potkovice; b. fragmentacija jedra; c. odvajanje apoptotskih telašaca (metilensko plavo)  
Figure 2. Apoptosis of follicular cells of rat ovaries: a. Horseshoe-shaped chromatin condensation; b. nucleus fragmentation; c. separation of apoptotic bodies (methylene blue)

#### **Odumiranje ćelija jajnika apoptozom / Ovarian cell death by apoptosis**

Neprekidno remodeliranje tkiva, u vidu proliferacije jednih uz apoptične promene drugih ćelija, zajedno obezbeđuju normalan razvoj i funkcionisanje celog ženskog reproduktivnog sistema, a naročito jajnika. Još u vreme prenatalnog razvoja kod ženki dolazi do uklanjanja Wollfovih kanala upravo apoptozom, a posle završene migracije primordijalnih germinativnih ćelija iz žumancetne kese i njihovih intenzivnih mitotičkih deoba, najveći deo germinativnih ćelija uklanja se, takođe, apoptozom [10]. Tako se, tokom prenatalnog razvoja eliminiše polovina populacije budućih ovocita [11], a preostali deo, koji je inkorporiran u folikule i ušao je u prvu fazu mejotičke deobe do diktiotena, predstavlja maksimalan broj kojim se raspolaže tokom čitavog postnatalnog perioda. Od njih se posle rođenja, pa sve do kraja reproduktivnog perioda, razvijaju folikuli, od kojih većina

podleže atreziji u različitim fazama razvoja (70 do 99,9 posto – u zavisnosti od životinjske vrste), dok samo odabrani folikuli ovuliraju [12]. Pitanje „odabira folikula” u jajniku još uvek nije u potpunosti razjašnjeno, ali je poznato da se odvija kroz inicijalni odabir koji podrazumeva prevođenje primordijalnih u primarne folikule, i ciklični odabir koji se odvija tokom svakog polnog ciklusa [12, 13, 14]. Cikličnim odabirom se biraju folikuli koji prelaze u antralne, od kojih samo ograničeni broj ovulira, dok ostali podležu atreziji tako što njihove *folikularne ćelije* odumiru apoptozom (slike 2 i 3). Fagocitozu ostataka ovocita i apoptotskih granuloza ćelija atretičnog folikula uglavnom obavljaju susedne granuloza ćelije (slika 2), mada, u tome mogu da učestvuju i ćelije teke, s obzirom da poseduju za to neophodne receptore [15, 16]. Pri tom veći *deo ćelija teke* atretičnog folikula hipertrofira u sekundarne intersticijalne ćelije, koje zasedaju mesto atretičnog folikula, a ostatak i sam podleže apoptozi [17].



Slika 3. Apoptoza folikularnih ćelija atretičnog folikula jajnika pacova (metilensko plavo) FC – folikularne ćelije → apoptotsko telašće  
Figure 3. Apoptosis of follicular cells of atretic follicle of rat ovaries (methylene blue) FC – follicular cells → apoptotic bodies

Promene ovocita u toku atrezije folikula različito se tumače. Jedan broj autora smatra da i *ovociti* odumiru apoptozom [10, 18, 19], mada ima i suprotnih mišljenja, po kojima je taj proces specifičan i ne odgovara klasičnom opisu apoptoze [13, 20, 21]. Osim ćelija folikula i ćelija teke atretičnih folikula jajnika, potvrđeno je da apoptozom odumiru *ćelije klicinog epitela iznad preovulatornog folikula* [22] i *ćelije žutog tela* [23].

O **signalima** za pokretanje apoptoze u jajniku pod fiziološkim uslovima teško je uprošteno govoriti, jer se delovanje različitih endokrinih, parakrinih i autokrinih faktora neprestalno prepliće.

### Značaj hormona i faktora rasta / Significance of growth hormones and factors

*Endokrini uticaj* ostvaruje se posredovanjem većeg broja hormona, među kojima su: gonadotropini (naročito FSH), estrogeni, androgeni, tireoidni

hormoni i hormon rasta. Sudbina većine folikula je atrezija, a samo odabrani preživljavaju i ovuliraju, pod prevashodnim uticajem gonadotropnih hormona, a posebno FSH. Naime, pad nivoa gonadotropina u cirkulaciji, bilo kao posledica hipofizektomije ili blokade LH/FSH talasa, dovodi do značajne atrezije folikula [24, 25]. Pri tom se apoptoza izazvana hipofizektomijom može da ublaži tretmanom sa FSH [24, 25]. Osim gonadotropina, apoptozu folikularnih ćelija inhibiraju i estrogeni, dok se androgeni ponašaju kao antagonisti estrogena kada je u pitanju apoptoza folikularnih ćelija [26, 27]. Uloga tireoidnih hormona u regulaciji ravnoteže između proliferacije i apoptoze na molekularnom nivou slabo je proučena, na samo u reproduktivnim, nego i u drugim organima. Premda mehanizam indukovanja apoptoze ćelija jajnika tireoidnim hormonima nije objašnjen, histološke i citološke analize folikula pacova pokazale su da hipertireoidizam, izazvan u neonatalnom periodu dozom od 150 µg tiroksina, dovodi do povećanja broja atretičnih folikula [28, 29, 30, 31]. Povećanje broja atretičnih folikula u različitim fazama folikulogeneze (u jajnicima pacova uzrasta od 15, 30 i 60 dana) dokazano je kod ženki pacova čije su majke u graviditetu i tokom laktacije bile hipotireoidne [21, 28, 32, 33, 34, 35]. Histološka i citološka analiza njihovih atretičnih folikula potvrdila je da, kao i kod zdravih pacova, folikularne ćelije hipo- i hipertireoidnih pacova odumiru apoptozom [21, 32, 33, 34, 35, 36].

Noviji radovi pokazuju da uticaj hormona na aktivaciju ili inhibiciju apoptoze nije direktan, već se uglavnom ostvaruje posredstvom različitih faktora rasta [37]. Tako su *in vitro* proučavanja intraovarijalnog signalnog sistema pokazala da je nekoliko faktora rasta deo ovog mehanizma. Jedan od njih je i *IGF-I* koji, pored toga što učestvuje u ćelijskoj proliferaciji [38], reguliše i apoptozu u jajnicima tako što inhibira njen razvoj u ranim antralnim i preovulatornim folikulima [39, 40]. Stimulacijom ekspresije *IGF-I*, uz smanjenje ekspresije nosača ovog faktora rasta (*IGFBPs*\*), gonadotropini mogu da inhibiraju apoptozu granulosa ćelija [41, 42]. Indukcija apoptoze preantralnih i antralnih folikula može da se postigne, ne samo padom nivoa *IGF-I*, već i pojačanom sintezom proteinskih nosača koji vezuju ovaj hormon. Tako su Erickson i sar. [43] potvrdili da pojačana sinteza *IGFBP-4*, pod uticajem GnRH, može da indukuje apoptozu folikularnih ćelija pacova. Hormon rasta utiče na supresiju apoptoze u preovulatornim folikulima, stimulacijom sinteze *IGF-I*, ali ne i u ranim antralnim folikulima, jer njihove ćelije poseduju *IGFBPs*, koji vezuju ovaj hormon tako da ga ima malo slobodnog, pa je apoptoza u ovoj fazi razvoja folikula indukovana [44].

Faktori rasta kao što su *EGF*\*\*/*TGF*\*\*\* i *βFGF*\*\*\*\* sprečavaju apoptozu u jajniku delujući preko tirozin-kinaze. Smatra se da nedostatak ovih faktora rasta, kao i *c-kit/KL*<sup>+</sup> vodi u eliminaciju ovocita primordijalnih folikula [45]. U kulturi teka i

\* *IGFBPs* – proteini nosači *IGF-a*.

\*\* *EGF* – faktor rasta ćelija epiderma.

\*\*\* *TGF* – transformišući faktor rasta.

\*\*\*\* *βFGF* – faktor rasta fibroblasta.

+ *KL* – Kit ligand.

intersticijalnih ćelija tretiranih sa  $TGF\alpha$  i  $TGF\beta$  dolazi do apoptoze supresijom gena za  $Bcl_2$  i stimulacijom gena za caspazu-1 [17]. Sa rastom folikula povećava se ekspresija subjedinična aktivina, faktora rasta iz familije  $TGF\beta$  koji inhibira apoptozu granulosa ćelija, a maksimalni supresorski efekat aktivin postiže u fazi ranog antralnog folikula [40]. LH inhibira apoptozu granulosa ćelija preovulatornih folikula tako što stimuliše sintezu interleukina  $1\beta$  [12].

#### **Značaj Fas receptora i Fas liganda /** *Significance of Fas receptors and Fas ligand*

Već je istaknuto da se apoptoza može da pokrene i vezivanjem Fas liganda (FasL) za Fas receptor, tj. CD95 (slika 1). Tako se aktivira caspaza-8 koja omogućava oslobađanje citohroma-c iz mitohondrija [1, 8, 46], a podstiče i kaskadu tokom koje se aktiviraju druge caspaze koje indukuju morfološke promene ćelije karakteristične za apoptozu (slika 1). Postojanje sistema *Fas receptor/Fas ligand* izvan imunskog sistema prvi put je ustanovljeno upravo u okviru folikula, tako što je potvrđeno da ovociti ekspimiraju Fas ligand dok folikularne ćelije atretičnih folikula ekspimiraju Fas receptore [47]. Osim u atreziji folikula, ovaj sistem učestvuje i u luteolizi tako što sitnije nesteroidogene ćelije žutog tela odgovaraju na delovanje prolaktina ekspimiranjem Fas liganda, dok pod uticajem ovog hormona krupnije steroidogene ćelije ispoljavaju Fas receptore [23].

#### **Značaj mitohondrija, Bax-proteina i $Bcl_2$ proteina /** *Significance of mitochondria, Bax-proteins and $Bcl_2$ proteins*

U novije vreme se mitohondrije smatraju centralnim mestom odluke ulaska ili neulaska u apoptozu svih ćelija, pa i ovocita [13, 48]. Mnogobrojni radovi potenciraju značaj **mitohondrija** u procesu apoptoze [8, 42, 49], upravo zato što se posle vezivanja odgovarajućeg proapoptotskog faktora (na primer, Bax-proteina) menja vrednost transmembranskog potencijala njihove spoljašnje membrane (slika 1), koja zato menja permeabilitet tako da omogućava pojačano oslobađanje kalcijumovih jona, citohroma-c i faktora indukcije apoptoze - AIF\* [42, 49]. Kalcijumovi joni oslobođeni iz matriksa mitohondrija prelaze u citosol i aktiviraju enzime uključene u apoptozu (slika 1). Molekuli citohroma-c posle izlaska iz mitohondrija vezuju se za Apaf-1\*\* u kompleks koji aktivira caspazu-9 kako bi preko nje pokrenula čitavu kaskadu caspaza (slika 1), dok AIF deluju direktno na jedro, izazivajući fragmentaciju DNK [7, 8, 9]. Međutim, sve mitohondrije ćelije koja je ušla u apoptozu ne reaguju na isti način. Naime, ustanovljeno je da u kulturi granulosa ćelija u kojoj je indukovana apoptoza izvestan broj mitohondrija sadrži, u proširenom prostoru između kristi, količinu citohroma-c karakterističnu za povećanu proizvodnju ATP-a. Ovaj nalaz nesumljivo potvrđuje značaj

\* AIF – faktor indukcije apoptoze.

\*\* Apaf-1 – faktor aktivacije proteaza apoptoze.

respiratornog lanca granuloza ćelija, kao izvora energije za odvijanje apoptoze sve do njenih kasnih faza [50].

Navedeni podaci nesumljivo ukazuju na veliki značaj mitohondrija za pokretanje apoptoze svih ćelija, pa i ćelija jajnika [51, 52, 53]. Budući da prilikom oplodjenja plod nasleđuje sve svoje mitohondrije iz ovocita majke [13, 48], tokom ovogeneze i folikulogeneze odvija se selekcija ovocita kojom se mladuncima obezbeđuju mitohondrije dobrog kvaliteta, tim pre što je dokazano da je njihova DNK znatno podložnija mutacijama od jedarne. Opisani sistem kontrole apoptoze je naročito značajan za životinjske vrste koje rađaju mali broj mladunaca.

Značaj mitohondrija za apoptozu potkrepljuju i podaci po kojima je hipotireoidizam, za koga je potvrđeno da podstiče apoptotske procese [21, 34, 54, 55], praćen promenjenom propustljivošću membrana mitohondrija [56], njihovim uvećanjem i vakuolizacijom, kao i smanjenjem broja kristi, što sve zajedno uzrokuje ulazak ćelije u apoptozu. Naime, u mitohondrijama nervnih ćelija hipotireoidnih životinja ustanovljeno je veće prisustvo proapoptotskih **Bax-proteina** u odnosu na eutireoidne životinje, kod kojih je njihovo prisustvo ograničeno [54, 55]. U prilog ovome su i podaci da se tokom razvoja malog mozga hipotireoidnih pacova zapažaju promene koje uvode ćelije u latentnu fazu apoptoze, poput translokacije citohroma c, AIF-a i sekundarnog aktivatora caspaza poreklom iz mitohondrija - SMAC [55]. *Bax-proteini* se smatraju odgovornim za pokretanje apoptoze i u ovocitima, s obzirom da je potvrđeno da transgeni miševi kojima nedostaju geni za Bax-proteine imaju produžen reproduktivni period [19, 57]. Nasuprot Bax-proteinima koji indukuju apoptozu, **Bcl-2 proteini**, koji su vezani za spoljašnju membranu mitohondrija, inhibiraju njen razvoj [49]. Najranija ekspresija Bcl-2 gena u okviru jajnika je zapažena u germinativnim ćelijama primordijuma gonada [52]. Istraživanjima *in vitro* je ustanovljeno da gonadotropni hormoni preveniraju apoptozu i atreziju folikula pretežno značajno redukujući nivo iRNK za Bax-proteine, bez promena u ekspresiji iRNK za Bcl-2 protein [51].

#### **Značaj proteina p53 / *Significance of p53 protein***

Posle prelaska iz citosola u jedro *protein p53* se direktno vezuje za DNK, prepoznaje njena oštećenja i ukoliko se radi o oštećenjima kod kojih je moguća reparacija zaustavlja ćeliju u kasnoj G1 fazi ćelijskog ciklusa [3]. Međutim, ako se radi o nereparabilnim oštećenjima DNK, protein p53 upućuje ćeliju u apoptozu intenzivirajući sintezu Bax-proteina, kojom se menja odnos Bax/Bcl-2 [8]. U okviru jajnika protein p53 je za sada imunocitohemijski dokazan samo u jedrima apoptotskih granuloza ćelija atretičnih folikula pacova [58] Ispitivanjima *in vitro* je ustanovljeno da gonadotropni hormoni inhibiraju apoptozu granuloza ćelija upravo značajnim smanjivanjem nivoa iRNK za protein p53 [51].

### **Caspaze / Caspases**

*Caspaze (cistein-proteaze)* predstavljaju čitavu grupu enzima koji katalizuju ključne događaje tokom razvoja apoptoze (slika 1). Sintetišu se u formi proenzima (pro-caspaza,) a aktiviraju se proteolizom [1, 7]. U fazi fragmentacije jedra, koja traje nekoliko minuta, caspaze aktiviraju caspaza-zavisne endonukleaze (CAD\* ; slika 1) koje izazivaju, za apoptozu specifičan, internukleozomski prekid molekula DNK. Dokazano je da se DNK granuloza ćelija atretničnih folikula cepa na fragmente od 185 do 200 parova kilobaza [6, 58, 59]. U kulturi granuloza luteinskih ćelija inhibitor protein kinaza, staurosporin, podstiče cepanje caspaze-9 i tako utiče na aktivaciju i porast aktivnosti caspaze-3. Supstrat za caspazu-3 je poli-ADP-riboza-polimeraza koja fragmentira molekul DNK između nukleozoma [53]. Sličan efekat izaziva i antagonist progesteronskih receptora (RU486S), dok deksametazon i dihidrotosteron, dodati u kulturu granuloza luteinskih ćelija, ne pokreću ovakav efekat [46]. Caspaza-3 je ključni egzekutor apoptoze jer, osim što izaziva fragmentaciju DNK, fragmentira i različite strukturne, signalne i druge intracelularne proteine (slika 1). S obzirom da je ovaj enzim imunocitohemijski dokazan u luteinskim ćelijama razvijenog žutog tela, u teki folikula i u granuloza ćelija atretničnih folikula, ali ne i u zdravim folikulima, može da se zaključi da ekspresiju gena za caspazu-3 regulišu gonadotropni hormoni [60].

### **Zaključak / Conclusion**

U ovom radu pokušali smo da damo pregled iz obilja informacija o raznim aspektima apoptoze ćelija jajnika. U tom cilju smo naveli podatke o, za sada poznatim, signalima, biohemijskim i morfološkim promenama koje karakterišu apoptotsko odumiranje folikularnih ćelija, ovocita, ćelija klicinog epitela, ćelija teke i žutog tela, kao i podatke o pokušajima uspostavljanja kontrole toka apoptoze.

Jajnik je vrlo dobar model za izučavanje promena koje karakterišu apoptotsko odumiranje ćelija, budući da se njegovo tkivo neprekidno remodelira, zahvaljujući između ostalog i apoptotskom odumiranju njegovih ćelija, kako tokom intrauterinog tako i za vreme postnatalnog razvoja. Osim toga tkivo jajnika je, iz istih razloga, veoma podesno i za izučavanje poremećaja apoptoze, odnosno prekomerne proliferacije koja može da dovede do razvoja preneoplastičnih i neoplastičnih promena ili do prekomernog uklanjanja ćelija koje se manifestuju atrofijom tkiva jajnika.

\* CAD – DNK-aze koje se aktiviraju pomoću caspaza.



## Literatura / References

1. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 11, 391-403, 1998.
2. Roulston A., Marcellus R. C., Branton P. E.: Viruses and apoptosis, *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 577-628, 1999.
3. Ruley H. E.: p53 and responses to chemotherapy and radiotherapy, In: *Important Advances in Oncology*, ed. De Vita VT, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 37-56, 1996.
4. Wahl G. M., Carr A. M.: The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell. Biol.* 3, 277-286, 2001.
5. Bratton S. B., Cohen G. M.: Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 306-315, 2001.
6. Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Curie A. R.: Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, 1980.
7. Cohen G. M.: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 3261-3216, 1997.
8. Israels L. G., Israels E. D.: Apoptosis, *The Oncologist*, 4, 4, 332-339, 1999.
9. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.: Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257, 1972.
10. Morita Y., Tilly J. L.: Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.* 213, 1-17, 1999.
11. Sadler T. W.: Gametogenesis. In: *Langman's medical embryology sixth edition*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 3-20, 1990.
12. Hsueh A. J. W., Billing H., Tsafirri A.: Ovarian follicle atresia: Hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15, 707-725, 1994.
13. Vaskivuo T.: Regulation of apoptosis in the female reproductive system, *Academic Dissertation*, University of Oulu, Finland, 2002.
14. Peter A. T., Dhanasekaran N. Apoptosis of granulosa cells: a review on the role of MAPK-signalling modules. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 209-213, 2003.
15. Palumbo A., Yeh J.: *In situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol. Reprod.*, 51, 888-895, 1994.
16. Svensson P. A., Johnson M. S. C., Ling C., Carlsson L. M. S., Billig H., Carlsson B.: Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells. *Endocrinol.*, 140, 2494-2500, 1999.
17. Foghi A., Teerds K. J., van der Donk H., Moore N. C. Dorrington J.: Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) $\alpha$  plus TGF $\beta$  on bcl-2 and interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *J. Endocrinol.* 157, 489-494, 1998.
18. Pesce M., De Felici M.: Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat. Embryol. (Berl)* 189, 435-440, 1994.
19. Ratts V. S., Flaws J. A., Kolp R., Sorenson C. M., Tilly J. L.: Ablation of bcl-2 gene expression decreased the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinol.*, 136, 3665-3668, 1995.
20. Devine P. J., Payne C. M., Mccuskey M. K., Hoyer P. B.: Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol. of Reprod.*, 63, 1245-1252, 2000.
21. Radovanović A.: Uticaj smanjene funkcije štitaste žlezde na jajnike pacova tokom polnog sazrevanja, *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Beogradu, 2003.
22. Ackerman R.C., Murdoch W. J.: Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins* 45, 475-485, 1993.
23. Kuranaga E., Kanuka H., Furuhata Y., Yonezawa T., Suzuki M., Nishihara M., Takahashi M.: Requirement of the Fas ligand-expressing luteal immune cells for regression of corpus luteum, *FEBS Letters.* 472, 137-142, 2000.
24. Ingram D. L.: The effect of hypophysectomy on the number of oocytes in the adult albino rat, *J. Endocrinol.* 9, 307-311, 1953.
25. Braw R. H., Tsafirri A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 59, 267-272, 1980.
26. Billig H., Furuta I., Hsueh A. J. W.: Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinol.*, 133, 2204-2212, 1993.
27. Billig H., Furuta I., Hsueh A. J. W.: Gonadotrophin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells, *Endocrinol.* 134, 245-251, 1994.
28. Radovanović A.: Efekat hipotireoidizma majki i perinatalnog hipertireoidizma na

jajnike juvenilnih pacova, Magistarska teza, Univerzitet u Beogradu, 1993. - 29. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Jajnici juvenilnih pacova tretiranih DL-tiroksinom. *Folia Anatomica* .21/22, Suppl. 1, Zbornik radova XXIII kongresa Društva anatoma Jugoslavije, 38, 1994. - 30. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Dose-dependent effects of thyroxin on the ovaries of juvenile rats. XII-th Int. Symp. on Morphol. Sci., Abstracts, Thessaloniki, 111-112, 1995. - 31. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Follicular development and atresia in the ovaries of thyroxine treated juvenile rats, *Acta Veterinaria*, 47, 87-94, 1997. - 32. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: The effect of hypothyroidism in pregnant and lactating dams on the ovaries of juvenile pups, *Acta Anatomica, Timisoara*, 1, 99-100, 1994. - 33. Radovanović A., Stošić-Bogdanović N., Gledić D.: Follicular atresia in ovaries of hypothyroid juvenile rats, *Folia Anatomica* .4, 134, 1996. - 34. Radovanović A., Marković D., Gledić D.: Effects of prenatal and postnatal goitrogen treatment on folliculogenesis and follicular atresia in rats. XVII Int. Symp. on Morphol. Sci., Timisoara, Romania, The Abstracts book, 264-265, 2002. - 35. Šimić M., Gledić D., Radovanović A.: Some neuroendocrine aspects of hypothyroidism in juvenile rats. *Basic and Clinical Aspects of the Theory of Functional Systems*. Eds.: Lažetić and Sudakov, Medical Faculty University of Novi Sad and P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology RAM Moscow, Novi Sad, 233-241, 1998. - 36. Stevanović J., Radovanović A., Merčep D.: Apoptoza kao način umiranja ćelije: biohemijske i morfološke karakteristike, Zbornik predavanja XXIII seminara za inovacije znanja veterinara, 93-101, 2002. - 37. Ojeda S. R., Dissen G.: Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors, *Trends Endocrinol. Metab.*, 5, 317-323, 1994. - 38. Yoshimura Y.: Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J. Obstet. Gynecol. Res.* 24, 305-323, 1998. - 39. Chun S. Y., Eisenhauer K. M., Minami S., Billig H., Perlas E., Hsueh A. J. W.: Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinol.* 137, 1447-1456, 1996. - 40. Chun S. Y., Billig H., Tilly J., Furuta I., Tsafiri A., Hsueh A. J. W.: Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous IGF-I. *Endocrinol.* 135, 1845-1853, 1994. - 41. Hernandez E. R., Roberts C. T. J., LeRoith D., Adashi E. Y.: Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinol.*, 136, 2770-2775, 1995. - 42. Liu X. J., Malkowski M., Guo Y., Erickson G. F., Shimasaki S., Ling N.: Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology*, 132, 1176-1183, 1993. - 43. Erickson G. F., Danmei L., 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. *Endocrinol.* 134, 1365-1372, 1994. - 44. Eisenhauer K. M., Chun S-Y., Billig H., Hsueh A. J. W.: Growth hormone suppression of ovarian follicle apoptosis and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). *Biol. Reprod.* 53, 13-20, 1995. - 45. Driancourt M. A., Thuel B.: Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 345-362, 1998. - 46. Baker S. J., Reddy E. P.: Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12, 1-9, 1996. - 47. Hakuno N., Koji T., Yano T., Kobayashi N., Tsutsumi O., Taketani Y., Nakane P. K.: Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinol.*, 137, 1938-1948, 1996. - 48. Krakauer D. C., Mira A.: Mitochondria and germ-cell death. *Nature* 400, 125-126, 1999. - 49. Bernardi P., Petronilli F. L., Fortte M.: A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 112-117, 2001. - 50. D'Herde K., De Prest B., Mussche S., Schotte P., Beyaert R., Coster R.V., Roels F.: Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Cell Death Differ.* 7, 331-337, 2000. - 51. Tilly J. L., Tilly K. I.: Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinol.*, 136, 242-252, 1995. - 52.

De Pol A., Vaccina F., Forabosco A., Cavazzuti E., Marzona L.: Apoptosis of germ cells during human prenatal oogenesis. *Hum Reprod* 12, 2235-2241, 1997. - 53. Khan S. M., Daufenbach L. M., Yeh J.: Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 269-275, 2000. - 54. Muller Y., Rocchi E., Lazaro J. B., Clos J.: Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons, *Int.J. Dev. Neurosci.*, 13, 875-885, 1995. - 55. Singh R., Upadhyay G., Godbole M. M.: Hypothyroidism alters mitochondrial morphology and induces release of apoptogenic proteins during rat cerebellar development. *J. Endocrinol.* 176, 321-329, 2003. - 56. Vacca R. A., Moro L., Caraccio G., Guerrieri F., Marra E., Greco M.: Thyroid hormone administration to hypothyroid rats restores the mitochondrial membrane permeability properties. *Endocrinol.* 44, 3783-3788, 2003. - 57. Perez G. I., Robles R., Knudson C. M., Flaws J. A., Korsmeyer S. J., Tilly J.: Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Gen.* 21, 200-203, 1999. - 58. Tilly J. L., Kowalski K. I., Johnson A. L., Hsueh A. J. W.: Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol.*, 129, 2799-2801, 1991. - 59. Zeleznik A. J., Ihrig L. L., Bassett S. G.: Developmental expression of Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinol.* 125, 2218-2220, 1989. - 60. Boone D. L., Tsang B. K.: Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.*, 58, 1533-1539, 1998.

## ENGLISH

### APOPTOSIS AS FORM OF NATURAL OVARIAN CELL DEATH

Anita Radovanović, Jelka Stevanović, D. Gledić

Different hormones, cytokines, the absence of growth factors, and others, are some of the signals for initiating apoptosis in ovarian cells. Each of them, in its own way, trigger apoptosis as a form of death in which the cell actively participates by precisely implementing a genetically programmed sequence of biochemical and morphological changes which lead to selfdestruction. Apoptosis is a physiological form of death, which helps establish a dynamic balance among proliferation, differentiation, and death of ovarian cells.

It has been confirmed so far that follicular cells, oocytes, cells of the germinal epithelium, theca cells, and corpus luteum cells die through apoptosis. The physiological deaths of these cells are an integral part of normal ovarian function, both during intrauterine and postnatal life. Namely, during intrauterine ovarian development, about half the total number of germinative cells (future oocytes) die through apoptosis, and their population is gradually reduced after birth by so-called selection of follicles which will continue further growth (folliculogenesis) and the apoptosis of cells of those follicles which will be subjected to atresion. Most ovarian cells die by apoptosis continuously until the end of the reproductive life period of healthy females, and some can continue dieing in this way until the death of the given individual (e.g. germinal epithelium cells).

Key words: ovarian cells, apoptosis.

## АПОПТОЗ КАК СПОСОБ ПРИРОДНОГО ОТМИРАНИЯ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ

Анита Радванович, Елка Стеванович, Д. Гледич

Между сигналами для побуждения апоптоза в клетках яичников относятся разные гормоны, цитокины, отсутствие факторов роста и пр. Каждый из них, по-своему, побуждает апоптоз как форму смерти в которой клетка активно участвует так, что точно проводит генетическую программированную последовательность биохимических и морфологических изменений, которые её ведут в автодеструкцию. Апоптоз физиологическая форма смерти, с помощью которой обеспечивается установление динамического равновесия среди пролиферации, дифференциации и отмирания клеток яичников.

До сих пор подтверждено, что в яичниках апоптозом отмирают фолликулярные клетки, ооциты, клетки бациллового эпителия, клетки теки и жёлтого тела. Физиологическая смерть этих клеток составная часть нормальной функции яичников, как в течение внутриматочного развития яичников апоптозом отмирает около половины из совокупного числа герминативных клеток (будущих ооцитов), а после рождения их популяция постепенно уменьшается „отбором фолликулов”, которые продолжают более далёкое развитие (фолликулогенез) и апоптотическим отмиранием клеток тех фолликулов, которые подпадут атрезии. Большинство клеток отмирает апоптозом неразрывно до конца репродуктивного периода жизни здоровых самок, а некоторые могут отмирать этим способом всё до смерти отдельного животного (на пример клетки бациллового эпителия).

Ключевые слова: клетки, яичников, апоптоз