

Apoptoza w oogenezie i wczesnym rozwoju zarodkowym ssaków

Ewelina Warzych, Dorota Lechniak

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Apoptosis in oogenesis and preimplantation embryo development of mammals

Summary

In this paper, the authors made an attempt to summarize the present knowledge on apoptosis in mammalian oocytes and embryos. On the contrary to necrosis, apoptosis is a programmed death of damaged or mutated cells. Several studies showed that it takes place during oogenesis (oocyte growth and maturation), as well as at some stages of preimplantation embryo development (morula, blastocyst). Although apoptosis is observed *in vivo*, the frequency of this phenomenon increases *in vitro*. There is a number of methods detecting apoptotic cells, however, none of them gives a clear evaluation of the studied process. A complex analysis with the use of several methods is therefore advised. Because in ovary the majority of oocytes undergo atresia (over 99%), the scientists concentrate on developing new methods aiming at improvement of females' reproductive performance. The process of apoptosis seems to be a crucial limiting factor.

Key words:

apoptosis, oocyte, embryo, TUNEL.

Adres do korespondencji

Ewelina Warzych,
Katedra Genetyki
i Podstaw Hodowli
Zwierząt,
Akademia Rolnicza
im. Augusta
Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 33,
60-637 Poznań;
e-mail: warzych@go2.pl

1. Wstęp

Apoptoza i nekroza są zjawiskami związanymi ze śmiercią komórkową. Apoptoza jest procesem konserwatywnym polegającym na samobójczej śmierci komórki, kontrolowanym zarówno przez czynniki wewnętrzne jak i zewnętrzne. Jest to najczęściej obserwowana forma degradacji komórki, będąca istotnym elementem rozwoju i różnicowania organizmów wielokomórkowych (1). Nekroza natomiast jest procesem biernym, katabolicznym

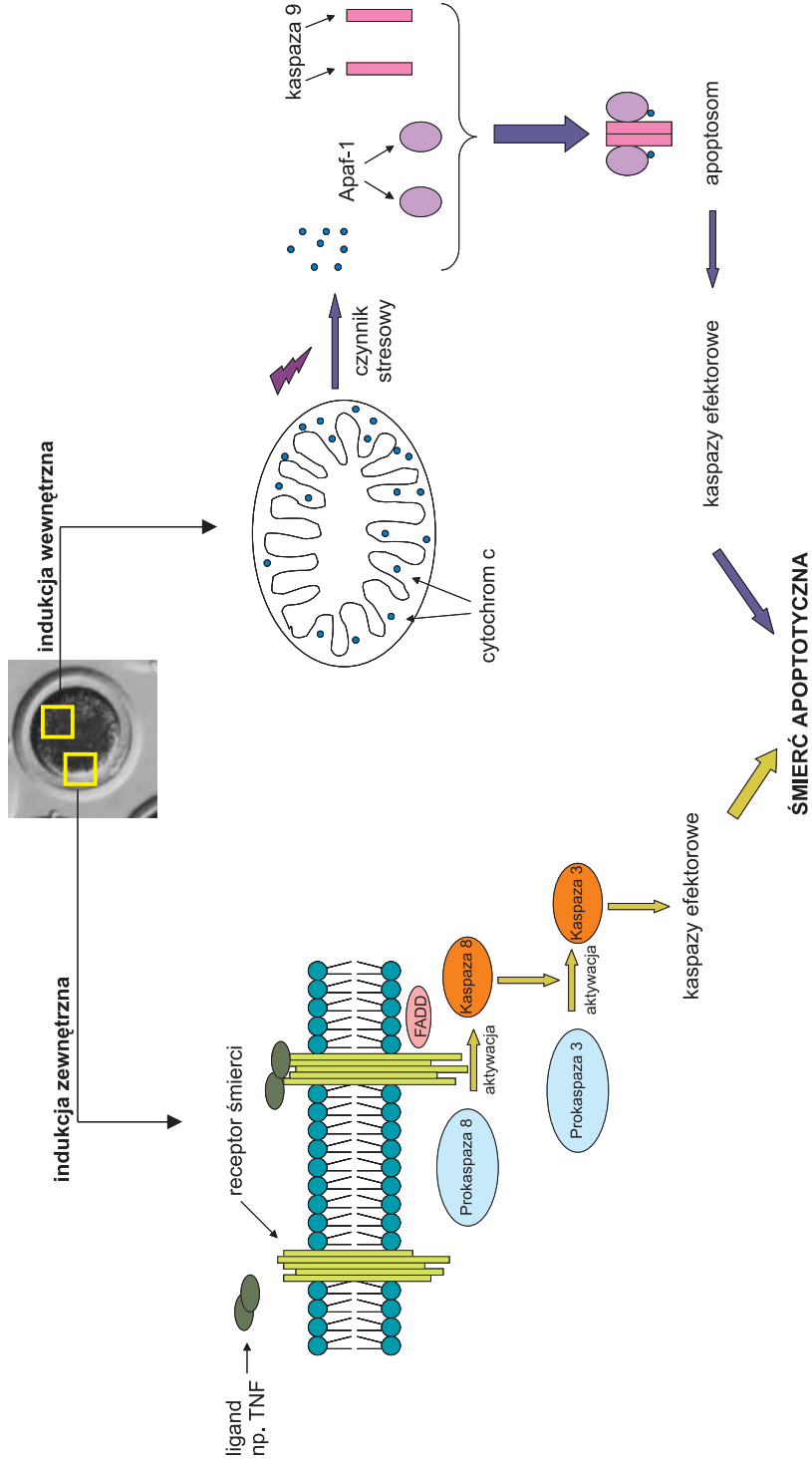
i degradacyjnym. Zachodzi pod wpływem bodźca zewnętrznego wywołanego mechanicznym uszkodzeniem komórki, szokiem termicznym, wolnymi rodnikami tlenowymi czy toksynami metabolicznymi. Komórkę podlegającą nekrozie charakteryzuje rozpad jądra, pęcznienie i przerwanie integralności błony komórkowej, co powoduje uwolnienie enzymów litycznych i uszkodzenie sąsiednich komórek. W efekcie powstaje ognisko martwicy, do którego napływają granulocyty obojętnochłonne, limfocyty i makrofagi, biorące udział w procesie zapalnym (2).

2. Molekularne podłoże apoptozy

Po raz pierwszy zjawisko programowej śmierci komórki opisał Walther Fleming, który w 1885 r. opublikował pracę o degeneracji komórek w jajniku królika (3). Termin apoptoza wprowadził dopiero Kerr i wsp. (4) jako zjawisko zamierania komórek, w którym dochodzi do kondensacji chromatyny, fragmentacji jądra i tworzenia tzw. ciałek apoptotycznych. Dziś wiadomo, że apoptoza jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się w momencie izolowania danej komórki od otoczenia, co oznacza utratę wszelkich połączeń międzykomórkowych. Następnie dochodzi do kondensacji chromatyny, obkurczania cytoplazmy, agregacji chromatyny przy błonie jądrowej oraz do fragmentacji jądra. Procesy te najczęściej są poprzedzone cięciem DNA na odcinki odpowiadające długości nukleosomu (ok. 180-200 pz). Końcowym etapem apoptozy jest fragmentacja cytoplazmy i rozdział organelli komórkowych na struktury zwane ciałkami apoptotycznymi. Zostają one usunięte np. na drodze fagocytozy, bez uszkodzania komórek otaczających, dlatego opisywany proces może dotyczyć tylko pojedynczych komórek, a nie całych tkanek.

Z obszernego piśmiennictwa wynika, że proces apoptozy jest regulowany przez wiele czynników (5-13). Zakłada się, że każda komórka posiada potencjalną zdolność wejścia na ścieżkę apoptozy, natomiast decyzja o rozpoczęciu owego szlaku zależy od zrównoważonej proporcji wewnątrzkomórkowych czynników pro- i antyapoptotycznych.

Opisując przebieg apoptozy w komórce należy rozróżnić dwa jej główne szlaki: zewnętrzny (receptorowy) i wewnętrzny (mitochondrialny). Uproszczony schemat ilustrujący te procesy przedstawiono na rysunku. W szlaku receptorowym obserwuje się tworzenie tzw. receptosomu, który powstaje w wyniku pobudzenia receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF (czynnika martwicy nowotworu, ang. *Tumour Necrosis Factor*). Pojawienie się aktywnej formy receptosomu prowadzi do auto-proteolizy enzymu prokaspazy 8, który jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3. Natomiast w szlaku wewnętrznym, zasadniczą funkcję w przekazywaniu sygnału śmierci odgrywają czynniki mitochondrialne uwalniane do cytosolu (AIF – *Apoptosis Inducing Factor*, cytochrom c). Aktywują one prokaspazy 9 i powodują utworzenie aktywnego kompleksu zwanego apoptosomem. Obydwa opisane szlaki prowadzą do aktywacji zasadniczego etapu regulacji apoptozy, którym jest kaskada kaspaz (14).



Rys. Uproszczony schemat ilustrujący aktywację procesu apoptozy w oocytach ssaków. Wyróżniono szlak zewnętrzny związany z aktywacją receptorów błonowych (śmierci), oraz szlak wewnętrzny skupiony wokół mitochondriów. Obie drogi indukcji prowadzą do wzbudzenia kaskady kaspaz efektorowych, które są bezpośrednimi wykonawcami przemian komórkowych charakterystycznych dla procesu apoptozy (7).

Kaspazy są syntetyzowane w formie nieaktywnych proenzymów (zymogenów), których aktywacja może przebiegać na drodze homo- lub heteroaktywacji. Homoaktywacja polega na oligomeryzacji cząsteczek enzymów, co prowadzi do wzrostu ich aktywności proteolitycznej. Te z kolei, na drodze heteroaktywacji aktywują kaspazy wykonawcze. Kaspazy selektywnie tną białka zawsze w pozycji za kwasem asparaginowym. Wykazują one dwojaką aktywność – z jednej strony inaktywują białka poprzez cięcie proteolityczne, z drugiej natomiast mogą działać aktywująco, gdy dochodzi do usunięcia negatywnej domeny regulatorowej lub dezaktywacji czynnika regulatorowego. Nukleaza CAD (*Caspase Activated Deoxiribonuclease*) w taki właśnie sposób zostaje aktywowana przez kaspazę 3, co uruchamia proces cięcia DNA na fragmenty o długości 180-200 pz. Kaspazy aktywowane są hierarchicznie – w początkowej fazie apoptozy pobudzane są kaspazy inicjatorowe (najczęściej poprzez autoproteolizę), a następnie kolejne aż do kaspaz wykonawczych, których substratami są różne białka komórkowe (15).

Dotychczas opisano wiele białek związanych z kontrolą apoptozy, z których naderżną rolę pełnią białka z rodziny Bcl-2 (*oncogene B-cell leukemia 2*). Cechą charakterystyczną tych białek jest występowanie homologicznych sekwencji BH1, BH2, BH3 i BH4 (*Bcl-2 homology regions*). Stanowią one kryterium podziału rodziny Bcl-2 na trzy podrodziny: Bcl-2 (*Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_L, A1, Mcl-1*), Bax (*Bax, Bak, Bok*) oraz BH3 (*Bak, Bid, Bik*). Białka z podrodziny Bcl-2 są inhibitorami apoptozy, natomiast pozostałe dwie podrodziny należą do grupy promotorów śmierci komórkowej. Uważa się, że gen *Bcl-2* jest najsilniejszym inhibitorem apoptozy, natomiast najlepiej poznanym jej promotorem jest gen *Bax* (*Bcl-2 associated X protein*).

Białka z rodziny Bcl-2 regulują proces apoptozy poprzez system wzajemnych oddziaływań sprowadzających się głównie do zdolności tworzenia heterodimerów złożonych z białek pro- i antyapoptotycznych. Podstawową funkcję w procesie powstawania dimerów pełni domena BH3. W większości białek z rodziny Bcl-2 występuje domena transbłonowa na końcu karboksylowym, umożliwiającą ich adaptację w błonach organelli. Struktura czwartorzędowa tych białek pozwala na tworzenie kanałów błonowych, które powstają pod wpływem sygnału apoptotycznego powodującego oligomeryzację białka Bax, a następnie wbudowywanie uzyskanych oligomerów w błony organelli. Opiswane zjawisko wpływa na wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych dla wody, jonów i związków drobnocząsteczkowych, pęcznienie mitochondriów, pęknięcie zewnętrznej błony mitochondrialnej i uwalnianie z przestrzeni międzybłonowej cytochromu c i AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) – dwóch głównych czynników indukujących apoptozę na opisywanym wcześniej szlaku wewnętrznym. Natomiast ochronna rola białek Bcl-2 w mitochondriach polega prawdopodobnie na kontrolowaniu przepuszczalności kanałów błonowych lub tworzeniu dodatkowych kanałów stabilizujących homeostazę mitochondrium (9).

3. Wykorzystanie metody TUNEL do wykrywania komórek apoptotycznych

Istotną cechą komórek apoptotycznych wykorzystywaną do detekcji apoptozy jest fragmentacja DNA na odcinki równe wielokrotności długości nukleosomów. Różnice w sposobie degradacji DNA stanowią podstawę odróżnienia martwicy od apoptozy. W komórkach nekrotycznych dochodzi do uwolnienia proteaz, które trawią białka histonowe, natomiast aktywne nukleazy niszczą nieosłonięte DNA. Na skutek przypadkowych cięć powstają odcinki DNA o zróżnicowanej długości, które w żelu elektroforetycznym tworzą obraz smugi (*smear*). Natomiast w przypadku apoptozy obserwuje się fragmentację DNA odzwierciedlającą strukturę oktamerów histonowych, w wyniku której na żelu powstaje obraz tzw. drabinki (*ladder*) odcinków stanowiących wielokrotność długości nukleosomu (180-200 pz).

Podczas apoptozy, wskutek trawienia DNA powstaje wiele pęknięć jedno- i dwuniciowych, których znakowanie jest wykorzystywane w technice TUNEL (*Terminal de-oksynukleotydyl transferase mediated d-UTP Nick End-Labeling*) (16). W metodzie tej enzym terminalna transferaza (TdT) dobudowuje znakowane nukleotydy bez obecności matrycy do wolnych końców wodorotlenkowych. Technika TUNEL pozwala na wykrycie sześciokrotnie większej liczby komórek apoptotycznych niż przy użyciu technik barwień histologicznych, prawdopodobnie dzięki detekcji komórek we wczesnych stadiach apoptozy, w których zmiany morfologiczne są trudne do oznaczenia (16).

4. Apoptoza w oogenezie

Potencjał rozrodczy samicy wyrażający się określoną liczbą oocytów w jajniku ustala się w życiu płodowym, po czym zmniejsza się w każdym cyklu płciowym. Przyjmuje się, że ponad 99% pęcherzyków jajnikowych podlega atrezji (17). Badania nad potencjałem rozwojowym żeńskich komórek płciowych nabierają obecnie coraz większego znaczenia zarówno w medycynie jak i hodowli zwierząt. W rozrodzie człowieka najważniejszymi zagadnieniami są poszukiwanie sposobów ochrony oocytów u kobiet poddawanych chemioterapii oraz opracowanie metod przedłużania żywotności pierwotnych pęcherzyków jajnikowych i odsuwania w czasie zjawiska menopauzy. W przypadku hodowli zwierząt głównym celem jest ustalenie optymalnych warunków hodowli *in vitro* preantralnych pęcherzyków zmierzające do lepszego wykorzystania potencjału rozrodczego wartościowych samic (18).

Najnowsza publikacja Tilly i wsp. (19) wykazująca istnienie w jajnikach dojrzałych płciowo myszy pierwotnych komórek rozrodczych (GSC, *germinal stem cells*) i odnawiania się populacji pęcherzyków jajnikowych, całkowicie zmienia dotychczasowe teorie obowiązujące w tej dziedzinie (19). Wykazano, że w jajnikach dojrzałych płciowo samic myszy może dochodzić do powstawania nowych oocytów wywodzących się z komórek GSC. W obrębie tkanki jajnikowej wykryto aktywność

genu SCP3 (białko kompleksu synaptonemalnego), który podlega ekspresji tylko podczas profazy pierwszej mejozy. Należy jednak pamiętać, że mysz stanowi jedynie model doświadczalny i nie wiadomo w jakim zakresie uzyskane wyniki odzwierciedlają analogiczne zjawiska u innych gatunków ssaków.

Prawidłowe funkcjonowanie jajnika w okresie rozrodczym w jednakowym stopniu zależy od proliferacji jak i degeneracji komórek. Apoptoza jest zjawiskiem obserwowanym we wszystkich stadiach oogenezy, od pierwotnych komórek płciowych, przez oogonia, do oocytów I rzędu (20). Przypuszcza się, że ok. dwie trzecie pierwotnych komórek płciowych kobiet ulega degeneracji już podczas życia płodowego lub zaraz po urodzeniu (3). Do wyjaśnienia opisywanego zjawiska proponowane są trzy mechanizmy określane jako „śmierć przez zaniedbanie” (*death by neglect*), „śmierć przez uszkodzenie” (*death by defect*) oraz „śmierć przez samo poświęcenie” (*death by self-sacrifice*). W pierwszym przypadku apoptozę indukuje zbyt niska aktywność czynników wzrostowych działających za pośrednictwem swoistych receptorów. Przy utrudnionym dostępie do receptorów dochodzi do upośledzenia przekazu sygnałów międzykomórkowych i do śmierci komórek. Drugi mechanizm wynika z błędów podczas rekombinacji mejotycznej indukujących apoptozę. Natomiast „śmierć przez samo poświęcenie” zachodzi, wówczas gdy grupa pierwotnych komórek płciowych zamiera na drodze sterowanego samobójstwa, poświęcając się dla komórki lepiej odżywionej i mającej większe szanse na rozwój (3).

Apoptozę w oocytach owulowanych lub dojrzewających *in vitro* stwierdzono m.in. u ludzi (3,21,22) i bydła (23,24) oraz u myszy (22,25,26). Wykazano, że częstość występowania zmian apoptotycznych w oocytach niedojrzałych jest stosunkowo niska, bowiem u bydła wynosi 7%. W oocytach dojrzałych zmiany te dotyczą już 23% komórek (24). Ponadto, z całą pewnością stwierdzono, że częstość apoptozy w oocytach wzrasta wraz z wiekiem samicy. Dotychczas zależność tę zaobserwowano u ludzi (27) oraz myszy (26,28). Wykazano indukujący wpływ suboptymalnych warunków dojrzewania oocytów *in vitro* na częstość występowania apoptozy m.in. u ludzi (29), bydła (20) i myszy (28). Jednakże wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu znanych metod detekcji apoptozy (np. TUNEL, przemieszczenie fosfatydyloseryny) nie są jednoznaczne m.in., dlatego że omawiane techniki mogą generować tzw. fałszywe wyniki pozytywne. Nie zawsze stwierdza się bowiem związek pomiędzy wynikami uzyskanymi po zastosowaniu tych metod a występowaniem zmian morfologicznych, charakterystycznych dla apoptozy (22,30). Sugeruje się, że szlaki aktywacji oraz przebieg apoptozy mogą być na tyle zróżnicowane, iż kompleksowa analiza tego zjawiska w oocytach powinna obejmować różne techniki (21).

Proces apoptozy badany jest również na poziomie transkrypcji lub translacji poprzez analizę ekspresji genów. Dotyczy to głównie genów kodujących czynniki pro- lub antyapoptotyczne z rodziny *Bcl-2*. W oocytach myszy stwierdzono obecność transkryptów genów *Bax* i *Bcl-2* (31). W badaniach Yang i wsp. (1) stwierdzono, że oocyty bydłace charakteryzujące się nieprawidłową morfologią przed dojrzewaniem *in vitro* częściej wykazywały zmiany apoptotyczne oraz podwyższony poziom białka

Bax. Natomiast wśród oocytów o prawidłowej morfologii rzadziej obserwowano apoptozę i w przeciwieństwie do poprzedniej grupy wyższy poziom białka Bcl-2 (1).

Wiadomo, że przez cały okres wzrostu i dojrzewania oocyty pozostają w ścisłym związku z komórkami pęcherzykowymi za pośrednictwem tzw. złączy szczelinowych. Na podstawie otrzymanych wyników Yang i wsp. (1) donoszą, że oocyty bydłce pozbawione kilku zwartych warstw komórek wzgórka jajonośnego, w późniejszych etapach rozwoju zarodkowego po zapłodnieniu *in vitro* znacznie częściej wykazują zmiany apoptotyczne (np. fragmentację cytoplazmy). Jednak w innych badaniach nie stwierdzono bezpośredniego związku pomiędzy morfologią komórek ziarnistych i ściany pęcherzyka a jakością oocytu (32). Autorzy wskazują, że w pęcherzykach jajnikowych zwykle występuje pewna liczba komórek ze zmianami apoptotycznymi, przy czym sygnał apoptotyczny przekazywany jest z komórek pęcherzykowych do oocytu dopiero po przekroczeniu pewnego krytycznego poziomu.

5. Apoptoza w zarodkach

W okresie przedimplantacyjnym zarodki cechuje stosunkowo wysoka częstość zamierania jeszcze przed osiągnięciem stadium blastocysty. Pomimo że apoptoza zachodzi naturalnie w warunkach *in vivo*, jakość blastocyst uzyskanych *in vitro* jest zdecydowanie niższa (10). Blastomery ze zmianami apoptotycznymi obserwowano zarówno w zarodkach prawidłowych jak i zahamowanych w rozwoju (30). Na podstawie uzyskanych wyników w licznie przeprowadzonych badaniach dowodzi się, że warunki hodowli zarodków *in vitro* wpływają na podwyższoną częstość apoptozy (33). Jednakże nadal z całą pewnością nie można stwierdzić jaka jest rola apoptozy w rozwoju zarodkowym i czy zaobserwowane zjawisko jest przede wszystkim odpowiedzią zarodka na odmienne środowisko rozwoju.

Do identyfikacji blastomerów apoptotycznych w przedimplantacyjnych zarodkach ssaków najczęściej stosuje się metodę TUNEL. Komórki takie stwierdzono w 70-80% blastocyst ludzkich (6) i mysich (16) oraz w prawie wszystkich blastocystach bydłczych (34,35). Przeanalizowano także zarodki we wcześniejszych stadiach rozwoju. U bydła, Matwee i wsp. (24) stwierdzili apoptotyczne blastomery w przypadku ok. 5% zarodków 8-16-blastomerowych i 79% morul. Natomiast w zarodkach we wcześniejszych stadiach (od zygoty do siedmiu blastomerów) nie obserwowano zmian apoptotycznych, co świadczy o zależności apoptozy od stadium zarodka. Jednakże, podobnie jak w przypadku oocytów, metodyka użyta do detekcji apoptozy w zarodkach ma istotny wpływ na interpretację wyników. Stwierdzono bowiem, że w zarodkach bydłczych fragmentacja cytoplazmy nie zawsze znajduje potwierdzenie w badaniu fragmentacji DNA metodą TUNEL i tylko zarodki pozytywne pod względem obu cech można uznać za apoptotyczne (30).

Apoptoza jest zjawiskiem naturalnie występującym w zarodkach, jednak w suboptimalnych warunkach *in vitro* obserwuje się to zjawisko znacznie częściej (33).

W badaniach wykazano, że skład i rodzaj pożywki hodowlanej w istotny sposób wpływają na jakość zarodków. Stwierdzono, że obecność w podłożu czynników wzrostu np. IGF 1, IGF 2, insuliny i hormonu wzrostu, znacząco podwyższa procent uzyskiwanych blastocyst oraz całkowitą liczbę blastomerów w zarodku (23,36-39).

Prawdopodobnie celem apoptozy jest także eliminacja komórek z nieprawidłowościami chromosomowymi lub blastomerów węzła zarodkowego blastocysty nadal zachowujących zdolność przekształcania się w komórki trofoblastu. Obydwa te zjawiska mogą ograniczać prawidłowy rozwój zarodka (6). Blastomery ze zmianami apoptotycznymi obserwowano w większości (93%) blastocyst bydłęcych pochodzących z hodowli *in vitro*. Komórki takie obecne były w obrębie całej blastocysty ze znaczną przewagą w węźle zarodkowym, a ich liczba wzrastała wraz z czasem hodowli (35). Potwierdza to znaczenie apoptozy w eliminacji nieprawidłowych genetycznie blastomerów węzła zarodkowego, które mogłyby dać początek zarodkom o obniżonym potencjale rozwojowym. Ponadto, Liu i wsp. (40) w swoich badaniach wykazali wpływ ploidalności zarodka na częstość zachodzenia apoptozy. W mysich zarodkach partenogenetycznych o haploidalnej liczbie chromosomów znacznie częściej obserwowano blastomery apoptotyczne niż w zarodkach diploidalnych. W badaniach tych udowodniono również, że obecność genomu ojcowskiego nie jest konieczna do aktywacji procesu apoptozy.

Apoptozę stwierdzono w zarodkach pozyskanych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, jednak w każdych warunkach proces ten ma nieco odmienny przebieg. Różnice dotyczą momentu zachodzenia procesu degradacji DNA oraz fragmentacji jądra podczas rozwoju przedimplantacyjnego. Zjawiska te obserwuje się we wcześniejszych stadiach rozwojowych zarodków hodowanych *in vitro* w porównaniu z warunkami *in vivo*. Proces degradacji DNA *in vitro* występuje od stadium 3-8-blastomerów, natomiast *in vivo* od stadium moruli. Fragmentacja jądra jest obserwowana *in vitro* od stadium 9-16-blastomerów, a *in vivo* – podobnie jak poprzednio – od stadium moruli (30). Autorzy konkludują, że opisane różnice są prawdopodobnie wynikiem aktywacji genomu zarodkowego u bydła w stadium 8-16-blastomerów. Suboptymalne warunki *in vitro* modyfikują proces ekspresji genów hamujących apoptozę, przez co jest on uaktywniany wcześniej. Należy jednak podkreślić, że wyniki różnych grup badawczych nie są jednoznaczne. Gjorret i wsp. (30) wykazali aktywność apoptotyczną w zarodkach bydła już w stadium 3-8-blastomerów, podczas gdy Matwee i wsp. (24) oraz Byrne i wsp. (34) dopiero w stadium 8-16-blastomerów. Nasuwa się zatem wniosek, podobny jak w przypadku badań oocytów, że kompleksowa analiza procesu apoptozy w zarodkach powinna obejmować kilka technik detekcji. Ponadto sugeruje się, że we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego (do stadium 8-16-blastomerów) pomimo uruchomienia procesu apoptozy, szlaki apoptotyczne są prawdopodobnie blokowane, a proces ten ulega aktywacji dopiero pod wpływem silnego bodźca zewnętrznego jak czynniki chemiczne lub szok termiczny. Wynika to najprawdopodobniej z niższej wrażliwości zarodków na bodźce zewnętrzne (41).

Badaniami ekspresji wybranych genów regulujących proces apoptozy objęto również zarodki przedimplantacyjne. Transkrypty dla genów *Bax* i *Bcl-2* wykryto metodą RT-PCR we wszystkich stadiach rozwojowych od zygoty do blastocysty zarówno u myszy (28,31) jak i u bydła (11). Również w badaniach immunochemicznych potwierdzono obecność białek tych genów w zarodkach bydła (1,11). Na podstawie wyników z licznie przeprowadzonych badań potwierdzono teorię, że proporcja pomiędzy poziomem ekspresji genów *Bax* i *Bcl-2* może być markerem determinującym przeżywalność zarodków (1,31,42). W badaniach zarodków człowieka powiązano poziom białek *Bax* i *Bcl-2* z ich morfologią, stwierdzając wyższy poziom białka *Bcl-2* w zarodkach prawidłowych, a przewagę białka *Bax* w pofragmentowanych (42). Podobne rezultaty uzyskano w przypadku zarodków bydłłych (1). W wyniku analizy ekspresji genów kodujących kaspazy wykazano zmienność w obecności poszczególnych kaspaz w zarodkach bydłłych (31). Niektóre z nich (np. *kaspazę 12*) wykryto we wszystkich badanych stadiach (od zygoty do blastocysty), natomiast innych (np. *kaspazy 11*) nie wykryto w żadnej badanej próbce. Jednakże pomimo tego zróżnicowania, potwierdzono ich podstawowe funkcje w procesie apoptozy w zarodkach przedimplantacyjnych (5,11,43). Wykazano istotny związek pomiędzy aktywnością kaspaz a fragmentacją jądra komórkowego (11). Stwierdzono również jednoczesną aktywację kaspaz, ekspresję genu *Bad* i zainicjowanie apoptozy (11). Nie we wszystkich doniesieniach potwierdza się jednak te wyniki. Martinez i wsp. (44) nie wykazali związku aktywności kaspaz ani z procesem apoptozy, ani z fragmentacją blastomerów w ludzkich zarodkach przedimplantacyjnych. Po zastosowaniu uniwersalnego inhibitora kaspaz sprzężonego z FITC, aktywność tej grupy enzymów stwierdzono we wszystkich stadiach rozwojowych zarodków, jednakże nie powiązano jej z morfologią pofragmentowanych blastomerów. Na podstawie tych wyników zasugerowano, że kaspazy mogą być pobudzane również poprzez mechanizmy nie powiązane z apoptozą, przez co mogą mieć nie tylko funkcję formatywną, ale też destrukcyjną.

6. Podsumowanie

Obecnie, zarówno w medycynie jak i w hodowli zwierząt duże znaczenie ma jakość zarodków uzyskiwanych w warunkach *in vitro*. Częstość występowania apoptozy stanowi ważny marker potencjału rozwojowego zarodków. Wykazano, że uruchomienie procesu apoptozy jest cechą specyficzną dla stadium rozwojowego zarodka. Stwierdzono też, że zachodzi on zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, jednak jego częstość *in vitro* jest znacznie większa. Istnieją hipotezy wyjaśniające to zjawisko i niewątpliwie celem wielu prowadzonych aktualnie badań jest takie zoptymalizowanie warunków hodowli *in vitro*, aby ograniczyć proces degeneracji blastomerów.

Istotnym problemem oceny apoptozy są niedoskonałości stosowanych technik detekcji. Stosunkowo często obserwuje się tzw. fałszywe wyniki pozytywne, będące podstawą nieprawidłowych wniosków. Dotyczy to zarówno badań oocytów jak i za-

rodków. Dlatego też pomimo zaawansowania badań, nadal istnieje szereg nie wyjaśnionych dotąd zagadnień, a część uzyskanych dotychczas wyników wymaga weryfikacji.

Praca finansowana ze środków KBN w latach 2003-2005 jako projekt badawczy zamawiany nr PBZ/KBN 084/PO6/2002.

Literatura

1. Yang M. Y., Rajamahendran R., (2002), *Anim. Reprod. Sci.*, 70, 159-169.
2. Trzczińska M., (2003), *Biotechnologia*, 1(60), 93-105.
3. Tilly J. L., (2001), *Nature Rev.*, 2, 838-848.
4. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., (1972), *Br. J. Cancer*, 26(4), 239-57.
5. Betts D. H., King W. A., (2001), *Theriogenology*, 55, 171-191.
6. Hardy K., (1999) *Rev. Reprod.*, 4, 125-134.
7. Hengartner M. O., (2000), *Nature*, 407, 770-776.
8. Kiliańska Z. M., Miśkiewicz A., (2003), *Post. Biol. Kom.*, 30(1), 129-152.
9. Motyl T., Gajkowska B., Płoszaj T., Waręski P., Orzechowski A., Zimowska W., Wojewódzka U., Ry-niewicz Z., Rekiel A., (2000), *Post. Biol. Kom.*, 27(1), 31-51.
10. Rożynkowa D., Filip A., (1999), *Post. Biol. Kom.*, 26(3), 561-578.
11. Spanos S., Rice S., Karagiannis P., Taylor D., Becker D. L., Winston R. M. L., Hardy K., (2002), *Repro-duction*, 124, 353-363.
12. Sulejczak D., (2000), *Post. Biol. Kom.*, 27(4), 527-568.
13. Wyllie A. H., (1997), *British Medical Bulletin*, 53(3), 451-465.
14. Bielak-Żmijewska A., (2003), *Kosmos*, 52(2-3), 157-171.
15. Handyside A. H., Hunter S., (1986), *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 195, 519-526.
16. Gavrielli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A., (1992), *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
17. Kątska L., (2001), *Post. Biol. Kom.*, 28, 177-187.
18. Kątska L., Ryńska B., (1998), *Theriogenology*, 50, 213-222.
19. Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J. K., Tilly J. L., (2004), *Nature*, 428, 145-150.
20. Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M. P., Lonergan P., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 234-248.
21. Morita Y., Tilly J. L., (1999), *Dev. Biol.*, 213, 1-17.
22. van Blerkom J., Davis P. W., (1998), *Hum. Reprod.*, 13(5), 1317-1324.
23. Kolle S., Stojkovic M., Boie G., Wolf E., Sinowatz F., (2003), *Biol. Reprod.*, 68(5), 1584-1589.
24. Matwee C., Betts D. H., King W. A., (2000), *Zygote*, 8, 57-68.
25. Reynaud K., Driancourt M. A., (2000), *Mol. Cell Endocrinol.*, 163, 101-108.
26. Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H., (1995), *Tohoku J. Exp. Med.*, 175(1), 69-76.
27. Wu J., Zhang L., Wang X., (2000), *Fertil. Steril.*, 74(6), 1137-1141.
28. Jurisicova A., Rogers I., Fasciani A., Casper R. F., Varmuza S., (1998), *Mol. Hum. Reprod.*, 4(2), 139-145.
29. Trounson A., Anderiesz C., Jones G. M., Kausche A., Lolatgis N., Wood C., (1998), *Hum. Reprod.*, 13(3), 52-62.
30. Gjorret J. O., Knijn H. M., Dieleman S. J., Avery B., Larsson L. I., Maddox-Hyttel P., (2003), *Biol. Re-prod.*, 69, 1193-1200.
31. Exley G. E., Tang C., McElhinny A. S., Warner C. M., (1999), *Biol. Reprod.*, 61, 231-239.
32. Zeuner A., Müller K., Reguszynski K., Jewgenow K., (2003), *Theriogenology*, 59, 1421-1433.
33. Briston A. R., Schultz R. M., (1997), *Biol. Reprod.*, 56, 1088-1096.
34. Byrne D. T., Southgate J., Brison D. R., Leese H. J., (1999), *J. Reprod. Fertil.*, 117, 97-105.
35. Neuber E., Luetjens C. M., Chan A. W. S., (2002), *Theriogenology*, 57, 2193-2202.
36. Augustin R., Pocar P., Wrenzycki C., Niemann H., Fischer B., (2003), *Reproduction*, 126, 91-99.

37. Byrne A. T., Southgate J., Brison D. R., Leese H. J., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 62, 489-495.
38. Makarevich A. V., Markkula M., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 386-392.
39. Spanos S., Becker D. L., Winston R. M. L., Hardy K., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 1413-1420.
40. Liu L., Trimarchi J. R., Keefe D. L., (2002), *Biol. Reprod.*, 66(1), 204-210.
41. Weil M., Jacobson M. D., Coles H. S., Davies T. J., Gardner R. L., Raff K. D., Raff M. C., (1996), *J. Cell Biol.*, 133, 1053-1059.
42. Hardy K., (1997), *Mol. Hum. Reprod.*, 3(10), 919-925.
43. Jurisicova A., Varmuza S., Casper R. F., (1996), *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 93-98.
44. Martinez F., Rienzi L., Iacobelli M., Ubaldi F., Mendoza C., Greco E., Tesarik J., (2002), *Hum. Reprod. Dev.*, 17(6), 1584-1590.