

УДК 576.367:611.65

## РЕГУЛЯТОРЫ АПОПТОЗА И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ В ЖЕНСКОЙ ГОНАДЕ

В.Г. Зенкина, В.С. Каредина, О.А. Солодкова, А.О. Михайлов

*ГОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет,  
г. Владивосток, [zena-74@mail.ru](mailto:zena-74@mail.ru)*

Поддержание биологической целостности организма является основным принципом функционирования физиологических систем. На клеточном уровне данный процесс реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, поддерживающих сложное равновесное состояние между интегративными физиологическими процессами: пролиферацией, дифференцировкой и физиологической клеточной гибелью. Важность каждого из этих процессов определяется их ролью в функционировании органов и систем. Исследование программированной клеточной гибели (апоптоза) в данном контексте представляет собой новый этап развития медико-биологических наук. На протяжении менструального цикла гибель клеток путем апоптоза и их регенерация происходят в строго регулируемой последовательности и зависят от стадии цикла. Апоптоз играет решающую роль в координировании функций женской репродуктивной системы. Ввиду того, что гибель клеток путем апоптоза — судьба большинства ооцитов и фолликулов в яичниках женщины, углубленное исследование механизмов регуляции этого физиологического процесса может способствовать пониманию патологических состояний репродуктивной системы.

**Ключевые слова:** регуляторы апоптоза, яичник.

## APOPTOSIS REGULATORS AND THEIR MECHANISM OF ACTION IN THE FEMALE GONADS

V.G. Zenkina, V.S. Karedin, O.A. Solodkova, A.O. Mikhailov

*Vladivostok State Medical University, Vladivostok  
[zena-74@mail.ru](mailto:zena-74@mail.ru)*

Maintain biological integrity of the organism is the main principle of the functioning of physiological systems. At the cellular level, this process is realized through the regulatory impact efferent signals that support the complex equilibrium between the integrative physiological processes: proliferation, differentiation and physiological cell death. The importance of each of these processes is determined by their role in the functioning of organs and systems. The study of programmed cell death (apoptosis) in this context represents a new stage of development of Biomedical Sciences. During the menstrual cycle, cell death by apoptosis and regeneration occur in a strictly regulated sequence and depend on the stage of the cycle. Apoptosis plays a crucial role in coordinating the functions of the

**female reproductive system. Given that cell death by apoptosis — the fate of the majority of oocytes and follicles in the ovaries of women, in-depth study of regulatory mechanisms of this physiological process may contribute to the understanding of pathological conditions of the reproductive system.**

**Keywords: regulators of apoptosis, ovary.**

Во время эмбриогенеза в развивающихся гонадах закладывается избыточное количество половых клеток и в течение всего онтогенеза наблюдается гибель ооцитов, достигающая 99,9% популяции. Апоптоз является одним из естественных путей редукции популяции клеток яичников. Современные данные о роли апоптоза в функционировании яичников не только в норме, но и при развитии опухолевого процесса играют огромную роль в достижении глобальной цели: предотвращение и возможности профилактики целого ряда заболеваний репродуктивной системы [2, 12].

Начиная с 2000 г., апоптозу в яичниках посвящено огромное количество работ [1-30]. Было доказано на культуре клеток яичника, что апоптоз — основной механизм атрезии фолликулов [3, 6, 22], а также запрограммированная клеточная гибель происходит в эпителии органа в момент овуляции и в желтом теле [6, 11].

Клетками, более всего подверженными апоптозу, связанному с атрезией фолликулов, являются клетки гранулезы [3, 10, 11]. Позднее апоптоз обнаруживается в клетках теки (Tilly, 2004), хотя некоторые авторы считают, что апоптоз характерен, как правило, для клеток гранулезы, но не для клеток теки [24]. Есть доказательства, что атрезии фолликулов на всех стадиях развития предшествует апоптоз ооцитов [24, 26].

Возможно, начальные проявления апоптоза и гибель ооцита, а также выживаемость клеток гранулезы зависит от образования межклеточных контактов и экспрессии коннексина-43, который обеспечивает образование щелевых контактов и передачу сигналов, ведущих к апоптозу [18].

Японскими учеными изучались возможности апоптоза в доминантных фолликулах перед овуляцией в период 2-й и 3-й фолликулярных волн в связи с возрастом фолликулов. Исследования показали, что клетки, подвергнутые апоптозу, встречаются на 18 день доминантных фолликулов перед овуляцией в период, как второй, так и третьей фолликулярных волн. На программированную клеточную гибель в яичниках влияют не только гены регуляторы, но и различные цитокины и гормоны [30].

По данным английских исследователей апоптоз лютеинизированных клеток гранулезы и клеток яйценосного бугорка зависит от возраста женщины. Доказано, что в возрасте 31-35 лет частота апоптоза этих клеток значительно выше, чем до 31 года. Сделан вывод о присутствующем в фолликулярной жидкости прогестероне, играющим защитную роль и уменьшающим частоту апоптоза лютеинизированных клеток гранулезы [11].

По данным Сергеева (2008г.) гестагены косвенно или напрямую взаимодействуют с системами регуляции пролиферации

на всех известных уровнях [26]. Однако это действие в большой мере зависит от дозы, времени, кофакторов действия, а также фазы клеточного цикла и, возможно, от других, не определенных пока факторов. Показано, что гестагены могут влиять на уровень активности некоторых факторов апоптоза, запуская каскады реакций. Прогестерон подавляет апоптоз гранулезных клеток в ранних фолликулах. Апоптоз гранулезных клеток связан с дисбалансом между прогестероном и эстрадиолом в фолликулярной жидкости [1, 2, 3, 26]. Уровень прогестерона и эстрадиола в фолликулярной жидкости меняется независимо от концентрации в сыворотке в течение менструального цикла, но зависит от размера фолликула и степени атрезии [3]. Концентрация эстрадиола и прогестерона и уровень апоптоза в доминантных фолликулах меняются прямо противоположно в сравнении со средними фолликулами, подтверждая мнение о том, что доминантные фолликулы подавляют рост субдоминантных [2, 3].

Прогестины также влияют на активность некоторых ферментов клеток-мишеней, задействованных в процессах проведения сигнала гибели клеток, модулируя ответ клетки на апоптотический сигнал. Каспаза-3 — фермент, индуцируемый прогестероном, является компонентом проведения сигнала рецепторной системы Fas/FasL, которой отводится роль в реализации апоптоза, в частности в клетках ткани яичника. Прогестерон ингибирует апоптоз в клетках желтого тела путем подавления Fas и активности каспазы-3. Значение этой системы показано в реализации гибели различных опухолевых клеток, в том числе клеток опухолей

репродуктивной системы, а также нормальных клеток яичников [8, 27, 28, 29]. Рост и атрезия малых фолликулов у новорожденных и половозрелых мышей, по данным некоторых авторов, не связана с активностью каспазы-3 [27, 29]. Согласно другому мнению в яичниках позвоночных апоптоз опосредуется именно каспазами, благодаря чему обеспечивается удаление избыточных или нежизнеспособных зародышевых и гранулезных клеток, при этом чрезмерность апоптоза и атрезия фолликулов могут отрицательно влиять на фертильность [16]. Нарушения апоптоза вовлечены также в патогенез хронической ановуляции и овариальной дисфункции [3, 24]. Таким образом доказано, что половые стероиды, воздействуя на экспрессию про- и антиапоптотических белков, могут контролировать процессы апоптоза в репродуктивной системе.

К. Киги и ряд других авторов идентифицировали в яичниках белки bcl, bax и p53 [20, 21, 23, 27]. Семейству белков bcl-2 принадлежит важная роль в регуляции апоптоза. Данные факторы принимают участие в формировании ионных каналов, а также проявляют специфическую ферментативную активность или являются транскрипционными факторами [3, 14]. Среди них bcl-2 и bcl-xL предотвращают апоптоз, в то время как bax и bcl-xS индуцируют клеточную смерть. Иммуногистохимически доказано, что bcl-2 экспрессируется в середине лютеиновой фазы в лютеиновых клетках, но не в регрессирующем желтом теле. Наиболее высокие уровни bax, наоборот, определяются в регрессирующем желтом теле [14]. Прогестерон в концентрации  $10^{-8}$  М повышает экспрессию фактора bcl-2, снижает экспрес-

сию фактора Вах и снижает активность участвующих в реализации апоптозного сигнала протеаз, в частности, каспазы-3 [3].

Важным регулятором развития фолликула и желтого тела является р53 [1]. Апоптоз клеток гранулезы связан с экспрессией р53, который запускает процесс апоптоза только в гранулезных клетках зрелого преовуляторного фолликула [23]. Однако согласно другим исследованиям, экспрессия р53 увеличивается одновременно с ростом количества апоптогических клеток гранулезы и тека-клеток, а также изменяется при созревании фолликула и находится в обратной зависимости от уровня хорионического гонадотропина, так как ХГ блокирует апоптоз и подавляет индукцию р53 [1]. Сопутствующая аккумуляция органелл стероидогенеза в перинуклеарном пространстве, способность протеосом к дегенерации совпадает с аккумуляцией р53 в ядре [3, 23].

Концентрация sFas в сыворотке крови значительно ниже в группе больных с СПКЯ по сравнению с этим показателем у женщин с мужским фактором бесплодия в браке. Концентрация sFas в сыворотке крови у больных с доброкачественными кистами яичников и у здоровых женщин составляет соответственно в среднем 2,3 нг/мл (в пределах 1,3-4,1) и 1,5 нг/мл (0,1-5,6),  $p < 0,01$  [13, 15]. В работах некоторых авторов продемонстрировано, что продукция sFas у больных со злокачественными опухолями яичников не зависит от стадии заболевания и степени дифференцировки опухоли, наличия асцита, но зависит от размеров первичной опухоли [20, 25, 27, 28]. Отмечается повышенный уровень ФСГ, ЛГ в сыворотке крови и, особенно, в содержимом кист

при неопластических процессах по сравнению с таковым в функциональных кистах. Кроме того, в аспирате содержимого функциональных кист, напротив, повышено содержание эстрадиола. Таким образом, концентрации гонадотропинов и эстрадиола в содержимом неопластических и функциональных кист прямо противоположны [13].

У самок млекопитающих число ооцитов в яичниках, как известно, уменьшается посредством апоптоза на протяжении всей жизни. Авторы данной гипотезы, согласно которой запас питательных веществ у особи регулирует жизнеспособность ооцитов, показали, что пентозно-фосфатный путь генерации NADPH играет решающую роль в выживании генеративных клеток, а мишенью этой регуляции служит каспаза-2, которая вызывает гибель ооцитов. Опосредованное пентозно-фосфатным путем ингибирование гибели ооцитов обусловлено подавлением фосфорилирования каспазы-2 посредством Са-кальмодулин-зависимой протеинкиназы II. Сделан вывод о том, что истощение питательных веществ для ооцита приводит к неспособности генерирования NADPH и апоптозу половых клеток. Следовательно, существует прямая связь между метаболизмом ооцита, Са-кальмодулин-зависимой протеинкиназой II и каспазой-2 [16, 27, 29].

Опыты *in vitro* на яичниках крыс позволили сделать вывод о том, что перекись водорода зависимо от концентрации и времени вызывала сморщивание незрелых и зрелых ооцитов крысы, образование пузырьков в плазматической мембране и дегенеративные изменения, характерные для апоптоза. Также, в 3 раза повышалась экспрессия белка Вах, в 2,5 раза увеличивалась актив-

ность каспазы-3 и повышалась фрагментация ДНК [16, 20]. Таким образом, перекись водорода стимулирует апоптоз в половых клетках.

Наиболее значимые паракринные регуляторы пролиферативных процессов в клетках эпидермального происхождения представлены семействами инсулиноподобного фактора роста (IGF), эпидермального фактора роста (EGF) и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [15]. Семейство IGF стимулирует пролиферацию и дифференцировку, являясь антиапоптотическими факторами [17]. Показано, что повышение экспрессии рецепторов группы EGF в клетках нормального эпителия яичников положительно коррелирует с введением препаратов гестагенов [15, 24]. TGF- $\beta$  рассматривается в качестве мультифункционального фактора роста, является ингибитором роста для клеток различных типов, в то время как TGF- $\alpha$  играет важную роль в качестве стимулирующего фактора роста [5].

По данным болгарских исследователей ингибин А снижает интенсивность апоптоза и стимулирует образование эстрадиола гранулезными клетками [10]. Аполипротеин Е является предположительно аутокринным регулятором компартамента текальных клеток яичников крыс, стимулируя апоптоз текальных и интерстициальных клеток яичников крыс, подтверждаемый увеличением числа пикнотических клеток, TUNEL-положительных клеток и лестничных электрофореграммами ДНК [3]. Базовым моментом фрагментации ДНК в поверхностных эпителиальных клетках яичника в норме при овуляции является воздействие прогестерона [28]. Фрагментация

ДНК, апоптоз происходят в эпителиальных клетках в месте овуляции. Клетки, содержащие фрагментированную ДНК, экспрессируют p53 [21, 23].

В условиях *ex vivo* с применением непрямой иммунофлуоресценции изучалась экспрессия тканевого ингибитора — 4 металлотеиназы (ТИМП-4) в яичниках мышей. У интактных неполовозрелых мышей ТИМП-4 был локализован в теке, антральных фолликулах, в предовуляторных фолликулах и в прилегающей строме яичников. При воздействии ХГЧ отмечалась локализация ТИМП-4 в гранулезе при лютеинизации и дальнейшая устойчивая экспрессия в желтом теле. У половозрелых мышей ТИМП-4 был локализован в желтых телах, сохранившихся с предшествующих циклов, в теке предовуляторных фолликулов и, в меньшей степени, во вновь образуемых желтых телах. Экспрессия ТИМП-4 повышалась при лютеинизации гранулезы, но существенно не изменялась на стадиях эволюции желтых тел. На основании этих данных сделан вывод о ведущей роли ТИМП-4 в поддержании функций желтого тела на всех этапах его эволюции [7].

Австралийскими морфологами впервые в 2005 году показано, что секретируемые ооцитом факторы, а также костные морфогенетические белки предотвращают апоптоз фолликулярных клеток в яичнике у млекопитающих [15].

В последнее время появилось много работ по изучению процесса апоптоза в опухолях [4, 25]. Лю Б.Н. подтверждает представление о том, что «стартовым моментом» для индукции канцерогенеза и апоптоза является дисфункция клеточного дыхания,

приводящая к окислительному стрессу сначала в митохондриях, затем в цитоплазме и клетке в целом. Избыточное образование активных форм кислорода, перекисей липидов и белков, рассматриваемые как сигнальные молекулы, создает дисбаланс, величина которого возрастает в стареющих клетках, но еще более — в опухолевых и апоптических. Далее эти сигнальные молекулы играют ключевую роль на всех этапах работы исполнительных звеньев (теломераз, онкобелков, факторов транскрипции, протеинкиназ, эндонуклеаз, каспаз и др.). Сурвивин принадлежит к семейству белков — ингибиторов апоптоза. Показана корреляция между экспрессией сурвивина и выраженностью апоптоза в клеточных линиях рака яичников у человека [25]. Другие работы посвящены роли противоопухолевых препаратов в индукции апоптоза в яичниках [4]. Так цисплатин индуцирует апоптоз, предотвратить который возможно с помощью киназ ERK1/2. Ксанторризол оказывает антипролиферативное действие на клетки MCF-7 индуцируя апоптоз путем модуляции уровней белков bcl-2, p53 и PARP-1 [14, 20, 21, 23]. Альтерация регулирования этого процесса может привести к снижению клеточной смерти и развитию неопроцесса. Содержание bcl-2 выше в нормальных тканях, в то же время высокий уровень bax и bcl-xS отмечается в карциноме [9, 14, 25, 28]. Доказано, что в развитии рака яичника играет роль семейство генов-регуляторов апоптоза bcl-2, но не p53 [25]. Накопление же белка p53 в клетках приводит не к гибели раковых клеток, а к анти-p53-антителопродукции и к появлению соответствующих антител в сыворотке крови [21].

Японские исследователи изучали влияние теплового шока на функции клеток гранулезы крыс. Тепловой шок приводил к уменьшению количества рецепторов ФСГ и ЛГ клеток гранулезы антральных фолликулов и снижал эстрогенную активность созревающих фолликулов. Клетки гранулезы в условиях теплового шока проявляют повышенную чувствительность к апоптозу. Система генов bcl-2/bax не связана с апоптозом клеток гранулезы, стимулированным тепловым шоком [26]. Изучалось влияние иммобилизационного стресса, антиоксидантов, а также комплексного воздействия этих факторов на апоптоз [9]. Установлено влияние ключевых гормонов стресса — глюкокортикоидов на экспрессию генов апоптоза в неонатальном периоде. В процессе возрастной инволюции усиливается перекисное окисление липидов, которое приводит к повышению уровня апоптоза. Этот процесс, вероятно, отличается от физиологического апоптоза по биохимическим характеристикам. С другой стороны, снижение уровня апоптоза может привести к канцерогенезу. Витамин E, обладая выраженным антиоксидантным действием, принимает участие в регуляции апоптоза, в том числе в гонадах [14].

По данным отечественных ученых на клеточную пролиферацию и апоптоз могут влиять и аминокислоты. Так, гистидин, аспарагиновая кислота, валин, треонин, пролин, метионин и др. эффективно снижают частоту апоптоза в тканях различного генеза. Полученные данные указывают на необходимость использования пептидных биорегуляторов для коррекции возрастной патологии, связанной с дисбалансом обновления



тканей [15, 24]. По данным Lea R.G. (2006) ограничение материнского питания во время раннего периода беременности влияет на регуляторы апоптоза в яичниках, повышая экспрессию некоторых факторов [19].

Таким образом, апоптоз представляет собой процесс, неотъемлемый от функционирования яичника. Он отвечает за развитие доминантного фолликула и желтого тела, фолликулярную атрезию и овуляцию. Нарушения в процессе апоптоза ведут к развитию многих патологических состояний, включающих ановуляцию, синдром поликистозных яичников, преждевременную недостаточность яичников, а также неопроцессы в гонадах [1]. Задачей будущих исследований является изучение возможности медикаментозного влияния на апоптоз с целью коррекции патологических изменений в женской половой железе, а также возможности повышения положительных исходов программ ЭКО.

#### Список литературы

1. Антонева И.И., Петров С.Б. // Онкология. — 2008. — Т.10. №2. С. 234.
2. Боярский К.Ю. // Пробл. репродукции. — 2006.- №4. С. 26.
3. Дубровина С.О. // Рос. вестн. акушера-гинеколога.— 2006.— N 3. С. 33.
4. Манухин И.Б., Высоцкий М.М., Горюн С.В. и др. // Пробл. репродукции.— 2006. С. 71.
5. Bauer Georg. // Int. J. Radiat. Biol.— 2007.— N 11-12. P. 873.
6. Brodowska A., Laszczynska M., Starczewski A. // Post. biol. komorki.— 2006. — N 1. P. 35.
7. Bu S., Cao Chenfu, Yang Yongjun. // Reproduction.— 2006.— N 6. P. 1099.
8. Campagnoli C., Abba C., Ambroggio S. et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. — 2007. — Vol.97. P. 441.
9. Cheah Yew Hoong, Azimahtol Hawariah Lope Pihie, Abdullah Noor Rain. // Anticancer Res.— 2006.— N 6B. P. 4527.
10. Denkova R., Bourneva V., Zvetkova E. et al. // Acta morphol. et anthropol.— 2005.— N 10. P. 95.
11. Dineva J., Nikolov G., Vangelov I. et al. // Докл. Бълг. АН.— 2004. — N 8. P. 113.
12. Fadeel B., Orrenius S. // J. Int. Med. — 2005.- Vol. 258, №6. — P. 479-517.
13. Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther O.J. // Reproduction. — 2006. — №4. P. 699.
14. Havelka P., Oborna I., Brezinova J. et al. // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub. — 2005. — Vol. 149, №2. P. 303.
15. Hussein, Tamer G., Froiland David A., Amato Fred. et al. // J. Cell Sci. — 2005.— N 22. P. 5257.
16. Johnson A., Bridgham Jamie T. // Reproduction. — 2002. — V. 124, N 1. P.19.
17. Kooijman R. // Cytokine Growth Factor Rev. — 2006. — Vol.17, №4. P. 305.
18. Krysko Dmitri V., Mussche Sylvie, Leybaert Luc, D'Herde Katharina. // J. Histochem. and Cytochem. — 2004. — N 9. P. 1199.
19. Lea R.G., Andrade L.P., Rae M.T. et al. // Reproduction.— 2006.— N 1. P. 113.
20. Liszewska E., Rekawiecki R., Kotwica J. // Prostaglandins Other Lipid Mediat. — 2005. — Vol. 78, № 1. P.67.
21. Lumachi F. // Anticancer Res. — 2006. — Vol. 26, №2A. P. 1305.
22. Peter A.T., Dhanasekaran N. // Reprod. Domest. Anim.— 2003. — N 3 P. 209.

23. Rivera A., Mavila A., Bayless K.J. et al. // *Cell. and Mol. Life Sci.*— 2006. — N 12. P. 1425.
24. Sato Eimei, Kimura Naoko, Yokoo Masaki et al. // *Microsc. Res. and Techn.* — 2006. — V.69, N 6. P. 427.
25. Sato Takaji, Aoki Noriko, Komaki Rei et al. // *Yakugaku zasshi.*— 2005.— P. 100.
26. Shimizu Takashi, Ohshima Izumi, Ozawa Manabu et al. // *Reproduction.*— 2005.— № 4. P. 463.
27. Slot K.A., Voorendt M., Boer-Brouwer M. et al. // *J. Endocrinol.* — 2006. — Vol. 188. №2. P. 179.
28. Terry K.L., De Vivo I., Titus-Ernstoff L. // *Am. J. Epidemiol.* — 2005. — Vol. 161. №5. P. 442.
29. Xu Q., Takekida S., Ohara N. et. al // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 90. №2. P. 953.
30. Yasuda K., Hagiwara E., Takeuchi A. et al. // *Zool. Sci.* — 2005. — №2. P. 237.
-