

УДК 618.11-007.41-018-053.86

Носенко О.М., Чужик О.І., Постоліук І.Г., Межова О.К.
Донецький національний медичний університет ім М. Горького

СТАН АПОПТОЗУ В ЕНДОМЕТРІОМАХ ЯЄЧНИКІВ У ПАЦІЄНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВІКУ

РЕЗЮМЕ. Мета: вивчення активності каспази-3 в ендометріомах яєчників у жінок репродуктивного віку.

Матеріал та методи: під наглядом знаходилося 60 прооперованих жінок репродуктивного віку з ендометріомами яєчників. Контрольну групу склали 30 жінок репродуктивного віку, прооперованих з приводу трубного безпліддя. Каспазу-3 в операційних зразках визначали авідін-біотин-пероксидазним методом з використанням кролячих моноклональних антитіл (МАТ) до каспази-3 ((Asp175) MAб (Clone 269518), catalog: MAV835 «R and D Systems», Росія).

Результати: кількість імунореактивних залозистих клітин до каспази-3 варіювала в ендометріомах від 3,79% до 34,65% і в середньому складала $15,87 \pm 0,67\%$; кількість імунореактивних клітин цитогенної стромы в ендометріомах від 1,11 до 38,42% і в середньому складала $9,36 \pm 0,25\%$; в стромі яєчника навколо ендометрію відповідно коливалася від 0,15 до 9,37% і в середньому складала $3,72 \pm 0,35\%$, тоді як в стромі яєчників контрольної групи була вище в 1,36 рази і складала в середньому $5,05 \pm 0,14\%$ ($p < 0,01$). Виявлена зворотня кореляційна залежність між кількістю імунореактивних клітин до каспази-3 в залозистому епітелії ендометрію та розповсюдженістю перитонеального ендометріозу – $r = -0,51$ ($p < 0,01$).

Висновки. Порушення процесів апоптозу грає важливу роль у виникненні та прогресуванні ендометрію яєчників. Існує зворотна кореляційна залежність між кількістю імунореактивних клітин до каспази-3 в ендометріомах яєчників та розповсюдженістю перитонеального ендометріозу.

Ключові слова: ендометріома яєчника, репродуктивний вік, апоптоз, каспаза-3

Термін "апоптоз", запропонований в 1972 р. англійськими вченими J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie и A.R. Currie [1], походить від давньогрецького *απόπτωσις* и означає в буквальному сенсі "відділення пелюсток від квітів", а стосовно до клітини – особливий тип смерті шляхом поділу її на частини ("апоптозні тільця"), які згодом фагоцитуються сусідніми клітинами різного типу. Термін "програмована клітинна смерть" відображає функціональне призначення цього процесу, що представляє природну частину життя багатоклітинного організму, пов'язаного з метаморфозом и розвитком [2]. Це генетично запрограмований шлях клітинної смерті, необхідний у розвитку багатоклітинного організму и бере участь у підтримці тканинного гомеостазу.

Якщо в здоровій тканині існує баланс між процесами проліферації і загибелі клітини, то в тканині пухлини має місце автономна і необмежена проліферація клітин. При цьому в трансформованих клітинах виникає стійкість до індукції апоптозу [3, 4]. У результаті генетичних мутацій знижується зда-

тність трансформованих клітин активувати програму апоптозу, що, з одного боку, сприяє прогресуванню пухлинного процесу, а з іншого – може стати причиною множинної лікарської стійкості [5]. У зв'язку з цим останнім часом приділяється велика увага вивченню молекулярних маркерів, що характеризують апоптоз і проліферацію при різних гіперпроліферативних захворюваннях і пухлинах [6, 7].

Згідно з рекомендаціями міжнародного Комітету з номенклатури клітинної загибелі слід розрізняти такі її типи: апоптоз, автофагію, некроз, мітотичну катастрофу, аноїкоз, ексайтотоксичність, валерівське переродження, зроговіння, параптоз, піроптоз, піронекроз і ентоз [8]. Залежно від участі в програмі загибелі клітини внутрішньоклітинних ферментів сімейства каспаз розрізняють 2 групи типів клітинної смерті. До першої з них, що отримала назву апоптотичної (для розвитку якої необхідна активація каспаз), відносяться апоптоз, аноїкоз і піроптоз. Всі інші типи загибелі називають неапоптотичними і для їх реалізації каспази не

потрібні. Таким чином, під апоптозом сьогодні прийнято розуміти каспазозалежний процес упорядкованої загибелі окремих клітин, який відбувається в нормальних і патологічно змінених органах і тканинах організму під дією позаклітинних або внутрішньоклітинних стимулів [9-11]. Апоптоз може бути поділений на апоптоз одноядерних клітин і мітотичну катастрофу. Остання при цьому підрозділяється на апоптоз власне в мітозі і апоптоз поліплоїдних клітин, утворений в результаті патологічного мітозу.

Характерною ознакою апоптозу є фрагментація ДНК у міжнуклеосомальних ділянках специфічною ендонуклеазою – CAD (caspase activated DNase) на фрагменти з розміром, кратним 180-200 нуклеотидам. У результаті апоптозу відбувається утворення апоптичних тілець – мембранних везикул, які містять цілісні органели та фрагменти ядерного хроматину. Ці тільца поглинаються сусідніми клітинами або макрофагами в результаті фагоцитозу. Так як позаклітинний матрикс не уражається клітинними ферментами, навіть при великій кількості апоптозів клітин, запалення не спостерігається. Порушення нормального апоптозу клітин веде до неконтрольованого розмноження клітин та появи пухлини.

Апоптоз викликається різними сигналами: зв'язування з рецепторами специфічних кілерних лігандів, нестача факторів росту / виживання, пошкодження ДНК і руйнування цитоскелету, гіпоксія та інші несприятливі умови [12] і ініціюється або за участю рецепторів клітинної поверхні («рецепторів смерті»), або внаслідок ушкоджень внутрішньоклітинних структур (найчастіше мітохондрій). Виходячи з цього, поділяють рецепторний і мітохондріальний шляхи реалізації апоптозу. Обидва цих сигнальних шляхи призводять до активації каспазного каскаду.

Два найкраще вивчені сигнальні шляхи активації каскаду каспаз у клітинах ссавців називаються зовнішній і внутрішній (мітохондріальний), кожен із них використовує власні ініціаторні прокаспази [13].

Клітина може отримувати сигнал, що індукуює апоптоз, іззовні, наприклад, від цитотоксичних лімфоцитів. В такому разі активується так званий зовнішній шлях (*extrinsic pathway*), що починається із рецепторів смерті. Рецептори смерті – це трансмембранні білки, що належать до ро-

дини рецепторів фактора некрозу пухлин (ФНП), наприклад сам рецептор ФНП і рецептор смерті Fas. Вони формують гомо-тримери, в яких кожен мономер має позаклітинний ліганд-зв'язувальний домен, трансмембранний домен і цитоплазматичний домен смерті, що через адаптерні білки залучає та активує прокаспази [13].

Ліганди рецепторів смерті також є гомо-тримерами. Вони споріднені між собою і належать до родини сигнальних молекул фактора некрозу пухлин. Наприклад, цитотоксичні лімфоцити несуть на своїй поверхні ліганди Fas, що можуть приєднуватись до рецепторів смерті Fas на плазмалемі клітин-мішеней. В такому разі внутрішньоклітинні домени цих рецепторів з'єднуються із адаптерними білками (FADD, Fas-associated death domain), а ті у свою чергу залучають ініціаторні прокаспази 8 і/або 10. Внаслідок цієї серії подій формується сигнальний комплекс, що індукуює смерть, – DISC (death inducing signaling complex). Після активації в цьому комплексі ініціаторні каспази розрізають ефektorні прокаспази і запускають апоптичний каскад [13].

Багато клітин синтезують молекули, що у певній мірі захищають їх від активації зовнішнього шляху апоптозу. Прикладом такого захисту може бути експресія так званих рецепторів-приманок (*decoy receptors*), що мають позаклітинні домени зв'язування лігандів, проте не мають цитоплазматичних доменів смерті, а отже не можуть запускати апоптозу і конкурують зі звичайними рецепторами смерті за ліганди. Клітини також можуть продукувати білки, що блокують зовнішній шлях апоптозу, наприклад FLIP, що схожий за структурою до прокаспаз 8 і 10, проте не має протеолітичної активності. Він пригнічує зв'язування ініціаторних прокаспаз із комплексом DISC [13].

Апоптоз також може запускатись із середини клітини, наприклад у випадку її травмування, пошкодження ДНК, нестачі кисню, поживних речовин або позаклітинних сигналів виживання. У хребетних цей сигнальний шлях називається внутрішнім (*intrinsic pathway*) або мітохондріальним, ключовою подією в ньому є вивільнення певних молекул із міжмембранного простору мітохондрій. До таких молекул зокрема належить цитохром С, що за звичайних

умов входить до електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Цитохром С синтезується мітохондрією та виходить з неї завдяки формуванню мітохондріальний апоптоз-індукуючий канал (МАК) та виконує регуляторну роль до настання морфологічних змін, пов'язаних з апоптозом. Після виходу цитохрому С, відбувається його зв'язування з адаптерним білком Араф (*apoptotic protease activating factor-1*), викликаючи олігомеризацію останнього у колесоподібну семичленну структуру, що називається апоптосою. Апоптосома залучає і активує ініціаторну прокаспазу-9, яка після цього може активувати ініціаторні прокаспазы [13].

У деяких клітинах зовнішній шлях апоптозу повинен активувати внутрішній для того щоб ефективно знищити клітину. Внутрішній шлях строго регулюється білками родини Bcl-2 [13].

Клітинні системи, що забезпечують проходження апоптозу, аналогічні у всіх тварин, центральне місце в них займає родина білків каспаз. Каспази – це протеази, що мають в активному центрі залишок цистеїну, і розрізають свої субстрати по специфічному залишку аспарагінової кислоти (звідси назва: *c* від *cysteine* і *asp* від *aspartic acid*). Безпосередню участь у реалізації апоптозу приймають тільки 7 з 12 каспаз, виявлених у людини. Залежно від функції їх поділяють на два типи: ініціаторні (каспаза-2, -8, -9, -10) і ефекторні (каспаза-3, -6, -7). Каспази синтезуються в клітині у вигляді неактивних прокаспаз, які можуть ставати субстратами для інших, вже активованих каспаз, що ріжуть їх в одному або двох місцях по залишку аспартату. Два утворені фрагменти – більший і менший – з'єднуються між собою, формуючи димер, що асоціює із таким самим димером. Сформований таким чином тетрамер і є активною протеазою, що може розрізати білки субстрати. Крім ділянок, що відповідають більший і менший субодинаціям, прокаспазы інколи також містять інгібіторні продомени, які деградують після відщеплення [13].

Активация ініціаторних каспаз відбувається шляхом автопротеолізу прокаспазних молекул після олігомеризації останніх у складі сигнальних мультімерних білкових комплексів. Для активации ефекторних каспаз необхідно дію ініціаторних каспаз – такий процес послідовної (і незворотної) ак-

тивації цих ендopeптидаз називають каспазним каскадом [14]. Гени прокаспаз активні у здорових клітинах, а отже білки необхідні для перебігу апоптозу постійно наявні, потрібна лише їх активация для запуску клітинного суїциду. До складу ініціаторних прокаспаз входить довгий продомен, що містить CARD (*caspase recruitment domain*, домен залучення каспаз). CARD дає змогу ініціаторним прокаспазам приєднуватись до адаптерних білків утворюючи активационні комплекси, коли клітина отримує сигнал, що стимулює апоптоз. В активационних комплексах кілька молекул прокаспаз опиняються безпосередньо поблизу одне одної, чого достатньо для їх переходу в активний стан, після чого вони розрізають одна одну [13].

Внаслідок розщеплення й активации одних каспаз іншими формується протеолітичний каскад, який суттєво посилює сигнал і робить апоптоз із певного моменту незворотним процесом. Ті прокаспазы, які розпочинають цей каскад називаються ініціаторними, а їхні субстрати – ефекторними. Після активации ефекторні каспази можуть розщеплювати інші ефекторні прокаспазы або білки-мішені. До мішеней ефекторних каспаз, що руйнуються під час апоптозу належать зокрема білки ядерної ламіни, розщеплення яких призводить до розпаду цієї структури. Також деградує білок, що за нормальних умов пригнічує ендонуклеазу CAD, внаслідок цього розпочинається фрагментація ДНК. Розщеплюються каспазами і білки цитоскелету та міжклітинної адгезії, внаслідок чого апоптичні клітини округлюються і від'єднуються від сусідніх клітин, і таким чином стають легшою мішенню для фагоцитів [13].

Набір каспаз, необхідний для проходження апоптозу залежить від типу тканини і шляху, за яким активується клітинна смерть. Наприклад у мишей при «вимкненні» гену, що кодує ефекторну каспазу-3, апоптоз не відбувається у мозку, проте нормально протікає в інших тканинах [13].

Каспаза-3 є центральним ферментом апоптозу, так як на ній сходяться рецепторний і мітохондріальний шляхи активации протеолітичного каскаду. В активному стані вона ініціює активацию інших ефекторних каспаз і гідролізує різні клітинні субстрати. Фермент представляє інтерес як терапевтична мішень при впливі на клітину різних

лікарських препаратів, які індукують апоптоз. Рівень активності каспаз-3 є важливим прогностичним маркером для оцінки агресивності патологічних процесів і ефективності дії лікарських засобів [15].

Каспазний каскад, описаний вище, є центральною ланкою в реалізації програми апоптозу і заснований на послідовному розщепленні субстратів каспаз-3 (включаючи самі каспази), що призводить, в кінцевому підсумку, до розпаду клітини на апоптотичні тільця. Після часткового протеолізу каспазного субстрату новий епітоп (неоепітоп), характерний тільки для його фрагмента, виявляють за допомогою специфічних антитіл. Ефекторна каспаза-3, що має найбільшу порівняно з іншими каспазами число клітинних субстратів, синтезується у вигляді прокаспази молекули. Утворення активної форми каспаз-3 відбувається після розщеплення прокаспази-3 ініціаторними каспазами. Цінність виявлення каспази-3 полягає в тому, що її активація відбувається на ранніх етапах апоптозу, коли багато інших характеристик апоптозу (наприклад фрагментація ДНК) ще не проявляються. Розроблено метод виявлення активної форми каспаз-3 в архівному матеріалі (укладені в парафін фіксовані формаліном препарати) за допомогою антитіл, які розпізнають тільки велику субодиницю каспази-3, але не зв'язуються з малою її субодиницею або неактивованою формою прокаспази-3 [16]. Важливими моментами для виявлення неоепітопов будь-яких каспазного субстратів за допомогою методу імуногістохімії є: їх наявність у відносно великій популяції клітин і стабільність виявляємої пептидного послідовності в умовах проведення фіксації клітин і їх укладення в парафін. Достовірну кореляцію між відсутністю каспаза-3-позитивних клітин в біопсійному матеріалі і їх резистентністю до проведеної терапії у разі хворих раком носоглотки відзначили J.J. Oudejans і співавт. (2005) [17]. Крім того, автори даного дослідження доходять висновку, що відсутність активної форми каспази-3 є несприятливим прогностичним ознакою у цієї категорії хворих. Схожа ситуація характерна для хворих на дифузну В-крупноклітинну лімфому: виявлення каспаза-3-позитивних клітин асоційоване з

кращою загальною здатністю до виживання хворих, які отримали індукційну терапію з включенням рітуксимабу [18].

В останні роки з'явилися роботи, які пов'язують розвиток ендометріозу з порушеннями апоптозу [19-22]. Деякі автори вказують на нездатність при ендометріозі клітин ендометрія до передачі "убивчого" сигналу і здатність до уникнення загибелі клітин внаслідок підвищеної експресії антиапоптотичних факторів і зниження експресії преапоптотичних факторів [19]. В ендометріодних стромальних клітинах підвищений рівень фактору некрозу пухлин- α та його сигнальний шлях через NF κ B є критичними регуляторами високо вираженої експресії білка інгібітора апоптозу-2 (IAP) [23]. Є вказівки на те, що в ектопічному ендометрії знижений рівень каспази-3 [21]. [22] довели, що в ендометріодних вогнищах аномально збільшена діяльність mTOR.

Протеїнкіназа мішені рапаміцину ссавців (mammalian target of rapamycin), mTOR, контролює процеси, які мають фундаментальне значення для організму: ріст клітин, їх проліферацію, міграцію, виживання та метаболізм. mTOR, яка інтегрує різні сигнальні шляхи, у тому числі шляхи інсуліну і ростових факторів, функціонує як сенсор рівня поживних речовин і енергії в клітині, а також окислювально-відновного статусу. Як ключовий компонент двох комплексів, mTORC1 і mTORC2, вона стимулює анаболічні процеси: виробку білків, жирів та органел. Обмежує катаболічні процеси, такі як автофагія. Порушення в тонко відрегульованій сигнальній сітці mTOR прямо пов'язано з розвитку таких тяжких захворювань, як рак, діабет та серцево-судинні захворювання [24-31].

J. Choi et al. (2014) [22] показали, що діяльність mTOR аномально збільшена в ендометріодних вогнищах. При ендометріозі аномальна активність mTOR може внести свій внесок у зміну автофагії ендометріальних клітин, яка прямо втягнута у процес апоптозу. Індукція автофагії ендометріальних клітин збільшується при інгібуванні mTOR в динаміці менструального циклу в нормальному ендометрії, що корелює з апоптозом. Тим не менш, в ендометріодній тканині з ендометріом яєчників mTOR активність автофагії і апоптоз постійні протягом всього менструального циклу, це підтвер-

джує, що постійний рівень автофагії підтримується розгальмуванням діяльності mTOR протягом менструального циклу в ендометріоїдній тканині і приводить до зниження апоптозу. У порівнянні з нормальним ендометрієм, збільшення активності mTOR під час секреторної фази в ендометріоїдній тканині інгібує автофагію та індукцію апоптозу.

МікроРНК (мікроРНК) є великим класом ендегенних, одноланцюгових, коротких ядерних РНК близько 22-нуклеотидів в довжину, які грають ключову роль в регуляції експресії генів через взаємодію з протейнокодуючими генами матричної РНК [32]. Експресія мікроРНК тканино- та клітинно-специфічна [33-35]. Було показано, що мікроРНК відіграють важливу роль в процесах розвитку, клітинної активності: ріст клітин, їх диференціювання та апоптоз [36]. Одне з досліджень мікроРНК ідентифікувало 48 з 287 мікроРНК, які по-різному експресувалися з прогресуючим зниженням рівня в еутопічному ендометрії у жінок без ендометріозу, парно в еутопічному і ектопічному ендометрії і ектопічному ендометрії у жінок з ендометріозом. Доведено, що перепрограмування експресії генів в ендометріоїдних гетеротопіях веде до змінення в них механізмів регулювання, їх виживання і зростання [37, 38].

Метою нашого дослідження стало вивчення активності каспази-3 в ендометріомах яєчників у жінок репродуктивного віку.

Матеріал та методи

Під наглядом знаходилося 60 прооперованих жінок репродуктивного віку з ендометріомами яєчників. Контрольну групу склали 30 жінок репродуктивного віку, прооперованих з приводу трубного безпліддя. Всі набрані пацієнти пройшли трансвагінальне ультразвукове дослідження, при необхідності – з використанням кольорового та енергетичного доплера, та обстеження на онкомаркери Ca 125 та HE-4.

Лапароскопічні операції проводилися під загальним наркозом в II групі в період ранньої або середньої фолікулярної фази менструального циклу, в I групі – через два тижні після другої ін'єкції агоніста ГнРГ. Відділення стінки кісти від нормальної тканини яєчників здійснювали після того, як яєчник був прорізаний ножицями над стінкою кісти. Потім стінку кісти відділяли від

нормальної тканини яєчників за допомогою тяги і протилежною тяги двома затискачами. Гемостаз ранової поверхні ложа кісти проводили біполярним електрокоагулятором. Всі зразки ендометріом, отримані в ході операцій, були представлені на патологоанатомічну експертизу. В контрольній групі проводилася біопсія яєчників з наступним гістологічним дослідженням біоптатів.

Після фіксації зразків операційних матеріалів в 10%-му забуференому формаліні і гістологічної проводки тканин за стандартною методикою виготовляли парафінові зрізи товщиною 3-4 мкм, забарвлені гематоксиліном і еозином. Імуногістохімічні (ІГХ) дослідження здійснювали авідін-біотинпероксидазним методом за стандартною методикою. Оцінювали питому кількість позитивно забарвлених клітин з використанням кролячих моноклональних антитіл (МАТ) до каспази-3((Asp175) MAb (Clone 269518), catalog: MAB835 «R and D Systems», Росія). Підраховували позитивно забарвлені клітин у трьох полях зору і розраховували відсоток позитивних клітин по відношенню до всіх клітин строми або залоз. Розрахунок здійснювався не менше, ніж на 1000 клітинних елементів строми або залоз.

Мікроскопію препаратів і усі морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Olympus AX70 Provis («Olympus», Японія) за допомогою програми аналізу зображення Analysis 3.2 Pro («Soft Imaging», Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника програмного забезпечення.

Статистичний аналіз матеріалів проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

При вивченні гістологічних зразків відмічалось цитоплазматичне забарвлення МАТ до каспази-3 ендометріоїдного епітелія та навколишньої цитогенної строми в ендометріомах яєчників. Також відмічено забарвлення ендотелію судин та строми яєчника навколо ендометріом. Кількість імунореактивних залозистих клітин до каспази-3 варіювала в ендометріомах від 3,79% до 34,65% і в середньому складала $15,87 \pm 0,67\%$; кількість імунореактивних клітин цитогенної строми в ендометріомах від 1,11 до 38,42% і в середньому складала $9,36 \pm 0,25\%$; в стромі яєчника

навколо ендометріом відповідно коливалася від 0,15 до 9,37% і в середньому складала $3,72 \pm 0,35\%$, тоді як в стромі яєчників контрольної групи була вище в 1,36 рази і складала в середньому $5,05 \pm 0,14\%$ ($p < 0,01$).

Виявлена зворотна кореляційна залежність між кількістю імунореактивних клітин до каспази-3 в залозистому епітелії ендометріом та розповсюдженістю перитонеального ендометріозу – $r = -0,51$ ($p < 0,01$).

Висновки

Порушення процесів апоптозу грає важливу роль у виникненні та прогресуванні ендометріом яєчників. Існує зворотна кореляційна залежність між кількістю імунореактивних клітин до каспази-3 в ендометріомах яєчників та розповсюдженістю перитонеального ендометріозу.

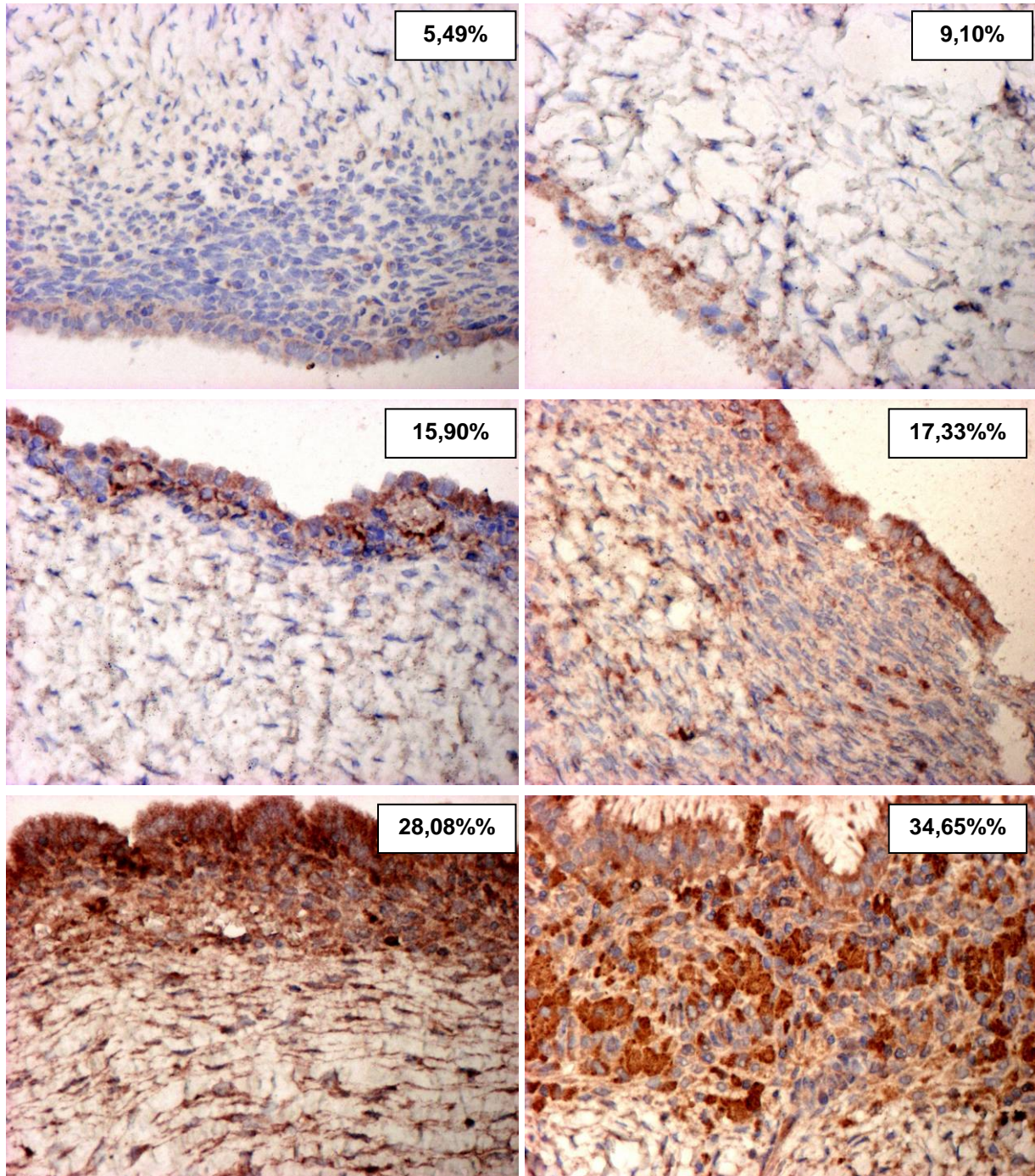


Рис. Різні рівні каспази-3 в стінці (в залозистому епітелії та цитогенній стромі) та навколо ендометріом яєчника у різних жінок (на фото вказаний відсоток імунопозитивних клітин до каспази-3 в залозистому епітелії ендометріом). ІГХ з МАТ до каспази-3. Збільшення $\times 150$.

Список літератури

1. Kerr J.F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. // *Br. J. Cancer*. – 1972. – Vol. 26, N 4. – P. 239-257.
2. Hedgecock E.M. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans* / Hedgecock E.M., Sulston J.E., Thomson J.N. // *Science*. – 1983. – Vol. 220, N 4603. – P. 1277-1279.
3. Райхлин Н.Т. Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н.Т. Райхлин, А.Н. Райхлин // *Вопр. онкол.* – 2002. – № 48. – С. 159-171.
4. Антонова И.И. Маркеры апоптоза и пролиферации опухолевых клеток в динамике прогрессирования рака яичника / И.И. Антонова, С.Б. Петров // *Онкология*. – 2008. – Т. 10, № 2. – С.234-237.
5. Абраменко И.В. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии / И.В. Абраменко, А.А. Фильченков // *Вопр. онкол.* – 2003. – № 49. – С. 21-30.
6. Пожарисский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К.М. Пожарисский, Е.Н. Леенман // *Арх. патол.* – 2000. – № 5. – С. 3-11.
7. Полушкина И.Н. Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза при серозном раке яичников III–IV стадии. [Автореф. дис ... канд. мед. наук]. – Москва, 2002. – 39 с.
8. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 / Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. [et al.] // *Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ.* – 2009. – Vol. 16, N 1. – P. 3-11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
9. Ogier-Denis E. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer / E. Ogier-Denis, P. Codogno // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2003. – Vol. 1603, N 2. – P.113-128.
10. Martinou J.C. Autophagy: evolutionary and pathophysiological insights / J.C. Martinou, G. Kroemer // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1793, N 9. – P.1395-1396. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.08.001.
11. Anti- and pro-tumor functions of autophagy / Morselli E., Galluzzi L., Kepp O. [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1793, N 9. – P. 1524-1532. doi: 10.1016/j.bbamcr.
12. Механизмы запрограммированной клеточной гибели. Апоптоз [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://toxicology.narod.ru/book30.html> 38.
13. *Molecular Biology of the Cell* (вид. 5th) / Alberts B., Johnson A., Lewis J. [et al.] – Garland Science, 2007. ISBN 978-0-8153-4105-5.
14. Фильченков А.А. Визуализация и оценка апоптоза, вызванного противоопухолевой терапией: клинические перспективы / А.А. Фильченков // *Онкология*. – 2011. – Т. 13, № 4. С. 266-277.
15. Арсланбаева Л.Р. Получение генетически кодируемых FRET-сенсоров на основе терббий-связывающего пептида и красных флуоресцентных белков DsRed2 И TagRFP: [Автореф ... дис. к мед.н. 03.01.04 – биохимия] // Учреждение РАН Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. – Москва, 2011. – 15 с.
16. Gown A.M. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using anti-bodies to cleaved caspase 3 // A.M. Gown, M.C. Willingham // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50. – P. 449-454.
17. Absence of caspase 3 activation in neoplastic cells of nasopharyngeal carcinoma biopsies predicts rapid fatal outcome / Oudejans J.J., Harijadi A., Cillessen S.A. [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2005. – Vol. 18, N 7. – P. 877-885.
18. Provencio M. New drugs and targeted treatments in Hodgkin's lymphoma / Provencio M., Sánchez A., Sánchez-Beato M. // *Cancer Treat. Rev.* – 2014. – Vol. 40, N 3. – P. 457-464. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.09.005.
19. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis / Nasu K., Yuge A., Tsuno A. [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2009. – Vol. 24, N 9. – P. 1181-1192.
20. Apoptosis in human endometrium and endometriosis / Harada T., Kaponis A., Iwabe T. [et al.] // *Hum. Reprod. Update*. – 2004. – Vol. 10, N 1. – P. 29-38.
21. Expression of suppressor of cytokine signaling-3 and caspase-3 in endometriosis and their correlation / Wei W.D., Ruan F., Tu F.X. [et al.] // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. – 2013. – Vol. 42, N 8. – P. 515-518.
22. Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts / Choi J., Jo M., Lee E. [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2014. – Vol. 20, N 4. – P. 309-317. doi: 10.1093/molehr/gat091.
23. The cellular inhibitor of apoptosis protein-2 is a possible target of novel treatment for endometriosis / Taniguchi F., Higaki H., Izawa M. [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2014. – Vol. 71, N 3. – P. 278-285. doi: 10.1111/aji.12193.
24. Dennis P.B. Target of rapamycin (TOR): Balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation / Dennis P.B., Fumagalli S., Thomas G // *Curr. Opin. Genet.* 1999. – Vol. 9. – P. 49-54.
25. Schieke S.M. Mitochondrial signaling, TOR, and life span / S.M. Schieke, T. Finkel // *Biol Chem.* – 2006. – Vol. 387. – P. 1357-1361.
26. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / [Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N.] // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 357-366.
27. Thomas G An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation / G. Thomas // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 71-72.
28. Rohde J. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth / Rohde J., Heitman J., Cardenas M.E. // *J. Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 9583-9586.
29. Bjornsti M.A. The TOR pathway: A target for cancer therapy / M.A Bjornsti, P.J. Houghton // *Nat. Rev. Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – P. 335-348.
30. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 alpha transcriptional complex / Cunningham J.T., Rodgers J.T., Arlow D.H. [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 450. – P. 736-740.
31. Capper C. Control of plant development by reactive oxygen species / C. Capper, L. Dolan // *Plant Physiol.* 2006. – Vol. 141. – P. 341-345.
32. Guo S.W. Epigenetics of endometriosis / S.W. Guo // *Mol. Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 15. – P. 587-607.
33. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism / [Xu P., Vernooy S.Y, Guo M., Hay B.A.] // *Curr. Biol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 790-795.
34. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the

proapoptotic gene hid in Drosophila / Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A. [et al.] // *Cell*. – 2003. – Vol. 113. – P. 25-36.

35. Numerous microRNAs in neuronal cells containing novel microRNAs / Dostie J., Mourelatos Z., Yang M. [et al.] // *RNA*. – 2003. – Vol. 9. – P. 180-186.

36. Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis / Filigheddu N., Gregnanin I., Porporato P.E. [et al.] // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2010:369549.

37. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression / [Pan Q., Luo X., Toloubeydokhti T., Chegini N.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 13. – P. 797-806.

38. An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe / Rello-Varona S., Kepp O., Vitale I. [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2010. – Vol. 1. – P. 25. doi: 10.1038/cddis.2010.6.

Отримано 30/04/2014

НОСЕНКО Е.Н., ЧУЖИК Е.И., ПОСТОЛЮК И.Г., МЕЖОВА О.К.
Донецкий национальный медицинский университет им М. Горького

СОСТОЯНИЕ АПОПТОЗА В ЭНДОМЕТРИОМАХ ЯИЧНИКОВ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

РЕЗЮМЕ. Цель: изучение активности каспазы-3 в эндометриомах яичников у женщин репродуктивного возраста.

Материал и методы: под наблюдением находилось 60 прооперированных женщин репродуктивного возраста с эндометриомами яичников. Контрольную группу составили 30 женщин репродуктивного возраста, прооперированных по поводу трубного бесплодия. Каспазу-3 в операционных образцах определяли авидин-биотин-пероксидазного методом с использованием кроличьих моноклональных антител (МАТ) к каспазе-3 ((Asp175) MAb (Clone 269518), catalog: MAB835 «R and D Systems», Россия).

Результаты: количество иммунореактивных железистых клеток к каспазе-3 варьировало в эндометриомах от 3,79 до 34,65% и в среднем составило $15,87 \pm 0,67\%$; количество иммунореактивных клеток цитогенной стромы в эндометриомах – от 1,11 до 38,42% и в среднем составило $9,36 \pm 0,25\%$; в строме яичника вокруг эндометриом колебалась от 0,15 до 9,37% и в среднем составило $3,72 \pm 0,35\%$, тогда как в строме яичников контрольной группы было выше в 1,36 раза и составляло в среднем $5,05 \pm 0,14\%$ ($p < 0,01$). Обнаружена обратная корреляционная зависимость между количеством иммунореактивных клеток к каспазе-3 в железистом эпителии эндометрия и распространенностью перитонеального эндометриоза – $r = -0,51$ ($p < 0,01$).

Выводы. Нарушение процессов апоптоза играет важную роль в возникновении и прогрессировании эндометриом яичников. Существует обратная корреляционная зависимость между количеством иммунореактивных клеток к каспазе-3 в эндометриомах яичников и распространенностью перитонеального эндометриоза.

Ключевые слова: эндометриома яичника, репродуктивный возраст, апоптоз, каспаза-3

NOSENKO OM, CHUZHNIKOV OI, POSTOLYUK IG, MEZHOVA OK
Donetsk National Medical University named after M. Gorky

APOPTOSIS IN OVARIAN ENDOMETRIOMA IN PATIENTS OF REPRODUCTIVE AGE

SUMMARY. Objective: To study the activity of caspase-3 in ovarian endometriomas in women of reproductive age.

Material and Methods: We observed 60 operated women of reproductive age with ovarian endometriomas. The control group consisted of 30 women of reproductive age, operated on for tubal infertility. Caspase-3 is determining in the samples was determined by the avidin-biotin-peroxidase method using rabbit monoclonal antibodies (MAb) to caspase-3 ((Asp175) MAb (Clone 269518), catalog: MAB835 «R and D Systems», Russia).

Results: The number of immunoreactive glandular cells to caspase-3 in endometriomas ranged from 3.79 to 34.65% and the average was $15,87 \pm 0,67\%$; number of immunoreactive cells in the cytogenous stroma of endometriomas – from 1.11 to 38.42% and the average was $9,36 \pm 0,25\%$; in the stroma around the ovary endometriomas ranged from 0.15 to 9.37% and the average was $3,72 \pm 0,35\%$, whereas in the control group of ovarian stroma was lower by 1.36 times and averaged $5,05 \pm 0,14\%$ ($p < 0,01$). It was found an inverse correlation between the amount of immunoreactive cells to caspase-3 in the glandular epithelium of the endometriomas and the prevalence of peritoneal endometriosis – $r = -0,51$ ($p < 0,01$).

Conclusions. Violation of apoptosis plays an important role in the onset and progression of ovarian endometriosis. There is an inverse correlation between the amount of immunoreactive cells to caspase-3 in ovarian endometriomas and the prevalence of peritoneal endometriosis.

Keywords: ovarian endometrioma, reproductive age, apoptosis, caspase-3