Роль эндотелина и сосудисто-эндотелиального фактора роста в процессе фолликулогенеза

Асп. Е.А. ТЕПЛЯШИНА[1,3], к.б.н., доц., исп. дир. Е.А. ПОЖИЛЕНКОВА[1,3], д.м.н., проф. М.В. ЕКИМОВА[2], д.м.н., проф., зав. каф. А.Б. САЛМИНА[1,3]

Role of endothelin and vascular endothelial growth factor during folliculogenesis

E.A. TEPLYASHINA, E.A. POZHILENKOVA, M.V. EKIMOVA, A.B. SALMINA

[1]Кафедра биологической химии с курсами медицинской фармацевтической и токсикологической химии; [2]кафедра лабораторной диагностики с курсом последипломного обучения Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (ректор — проф. И.П. Артюхов); [3]НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (рук. — проф. А.Б. Салмина), Красноярск

В обзоре представлены современные данные о роли ангиогенных факторов роста в функционировании яичников как в норме, так и при развитии различных патологических состояний. Авторы приходят к заключению, что нарушение формирования сосудистой сети может стать причиной дисфункции репродуктивной системы у женщин.

Ключевые слова: эндокринное бесплодие, фолликулогенез, ангиогенез, ангиогенные факторы роста.

The review gives an update on the role of angiogenic growth factors in the function of the ovaries both in health and in the development of various abnormalities. The authors conclude that impaired vasculature formation can be a cause of female reproductive failure.

Key words: endocrine infertility, folliculogenesis, angiogenesis, angiogenic growth factors.

Одной из основных медико-социальных проблем в Российской Федерации является низкая рождаемость, связанная с репродуктивной дисфункцией. При этом репродуктивные расстройства не всегда поддаются успешной терапии. В последнее время в качестве одной из причин развития бесплодия идентифицированы нарушения ангиогенеза как на ранних стадиях фолликулогенеза, так и при селекции доминантного фолликула и созревания овоцита [6].

Изучение особенностей ангиогенеза в процессе роста и созревания фолликулов позволяет разобраться в причинах репродуктивной дисфункции женщин и выявить дополнительные резервы для повышения эффективности современных методов восстановления фертильности в программах вспомогательных репродуктивных технологий [1, 11, 30].

Ангиогенез является одним из важнейших процессов физиологического моделирования, необходимого для формирования и развития полноценного доминантного фолликула [42]. В женской репродуктивной системе постоянно происходят циклический рост и развитие новых сосудов. В процессе развития фолликула и последующего образования желтого тела в текаклетках яичника формируется сосудистая система. Дополнительные сосуды могут формироваться в месте разорвавшегося фолликула [4, 29, 36, 38].

Процесс ангиогенеза регулируется действием целого ряда таких факторов роста, как эндотелин, сосудисто-эндотелиальный фактор роста (СЭФР), фактор роста фибробластов (ФРФ), фактор роста плаценты (ФРП), ангиопоэтин, тромбоспондин, ангиостатин, которые обеспечивают сохранность менструального цикла и стабильный кровоток в сосудах репродуктивной системы женщины. При этом непосредственный контроль процесса образования новых капилляров осуществляется благодаря скоординированному действию индукторов и ингибиторов ангиогенеза [2]. В нормальных условиях секреция тканевых ингибиторов ангиогенеза доминирует над индукторами [7, 19, 22, 32].

В табл. 1 представлены характеристики СЭФР — одного из важнейших регуляторов ангиогенеза.

Необходимо отметить, что в процессе фолликулогенеза наименее изученным является такой фактор, как эндотелин. Вместе с тем постоянным «спутником» эндотелина в процессе фолликулогенеза является СЭФР. Указанные маркеры позволяют оценить степень нарушения системы кровоснабжения фолликулов на разных стадиях их развития.

Формирование сосудистой сети имеет сходные временные рамки с активным ростом и преобладанием доминантного фолликула [36]. Это обстоятельство имеет первостепенное значение для диагностики патологических состояний, связанных с развивающимся бесплодием и использованием таких значимых маркеров ангиогенеза, как СЭФР и эндотелин.

Как нам представляется, ангиогенез следует рассматривать через призму стадий, составляющих данный физиологический процесс.

Классификация (Pedersen & Peters, 1968) развернуто отражает картину основных морфологических событий в

© Коллектив авторов, 2011

e-mail: elenateplyashina@mail.ru

Таблица 1. **Сосудисто-эндотелиальный фактор роста и его свойства**

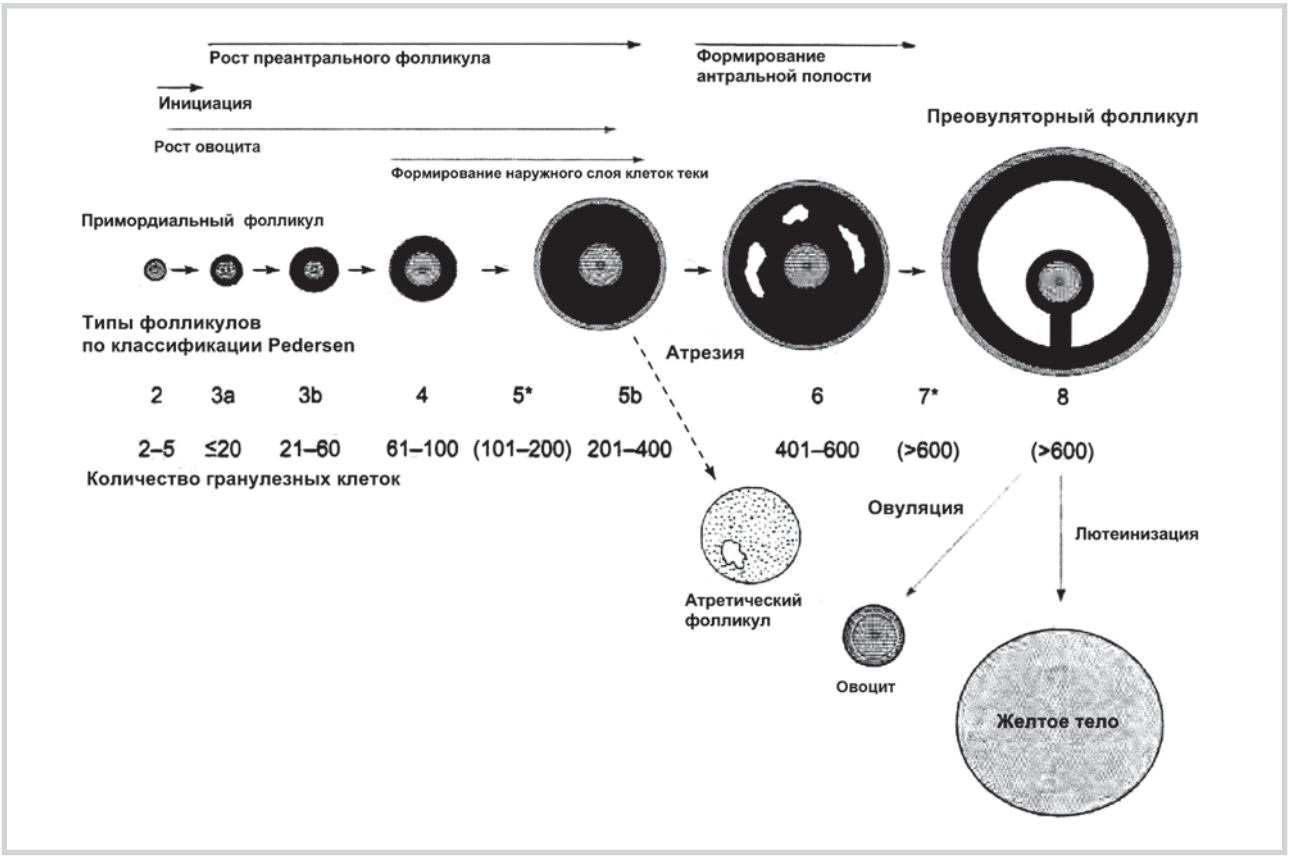
Лиганд	Изоформа	Биохимические свойства	Специфические рецепторы	Функция
Индукторы ангиогенеза СЭФР	$СЭФР_{121}$, $СЭФР_{145}$, $СЭФР_{165}$, $СЭФР_{189}$, $СЭФР_{206}$	Гепаринсвязывающий гликопротеин (исключение $СЭФР_{121}$) $СЭФР_{121}$ и $СЭФР_{145, 165}$ секретируются и растворяются, в то время как формы $СЭФР_{189, 206}$ непосредственно связываются с клеткой	СЭФР Р-1(Flt-1), СЭФР Р-2 (KDR/murine аналог Flt-1, обладающий тирозинкиназной активностью), СЭФР Р-3 (Flt-4), нейрофилин-1 и нейрофилин-2	Стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, индуцирует действие сериновых протеаз и коллагеназ, увеличивает хемотаксис эндотелиальных клеток и вазодилатацию

ходе развития фолликула: инициация роста овоцита, пролиферация гранулезных и слоя текаклеток, формирование антрального фолликула. На представленном ниже рисунке показан также процесс атрезии, овуляции и лютеинизации фолликула.

Развитие фолликула в репродуктивном периоде женщины имеет ряд особенностей и претерпевает следующие стадии развития. Стадия примордиального роста — единичный овоцит частично или полностью окружен несколькими упорядоченными клетками гранулезы, размер фолликула 30—40 мкм. У человека такие фолликулы обнаруживаются на 4-м месяце развития эмбриона. Стадия первичного роста — овоцит окружен одним слоем кубических клеток гранулезы. Стадия раннего вторичного роста — два полных слоя клеток гранулезы, размер фолликула составляет около 50 мкм. Стадия преантрального роста — овоцит увеличивается в объеме, его окружают несколько слоев клеток гранулезы, размер фолликула около 100 мкм. Стадия антрального роста — образуется полость, окруженная клетками гранулезы и заполненная фолликулярной жидкостью, количество ее возрастает по мере созревания фолликула, размер фолликула более 0,2 мм в диаметре. Каждый из антральных фолликулов в этой стадии развития обладает индивидуальной чувствительностью к ФСГ, что определяется наличием и количеством рецепторов к ФСГ в клетках гранулезы [18].

Важно отметить, что инициация васкуляризации начинается в текаклетках. Примордиальные (первичные) фолликулы получают необходимые вещества и кислород путем пассивной диффузии из клеток стромы. Формирование индивидуальной капиллярной системы вокруг каждого фолликула является обязательным и неотъемлемым процессом для его дальнейшего развития [14, 21, 36].

Формирование капиллярной сети на этапах фолликулогенеза имеет ряд особенностей. На стадии примордиального роста капиллярная сеть выглядит тонкой с неровными границами и представлена единственным слоем. Она окружена слоем текаклеток и слоем гранулезных кле-



Стадии фолликулогенеза (СЭФР) [18].

ток. В таком виде капиллярная сеть остается на всем протяжении процесса фолликулогенеза [14, 19, 32].

Инициация формирования капиллярной сети в гранулезных и текаклетках происходит под действием СЭФР, в то время как формирующаяся структурная и функциональная полноценность васкулярной системы требует координированного действия целого комплекса факторов. В экспериментах на крупном рогатом скоте было показано, что ангиопоэтин не обнаруживается в клетках теки до антральной стадии развития фолликула, а введение СЭФР в циклах стимуляции способствует развитию вторичных фолликулов [20, 36].

Обращаясь к преантральной стадии фолликулогенеза, необходимо отметить, что плотность сосудов капиллярной системы преантрального фолликула в этот период значительно увеличивается. Отмечено, что до 40% всех пролиферирующих клеток теки составляют эндотелиальные клетки. Для преантрального фолликула также характерна значительная экспрессия матричной РНК (мРНК) СЭФР в гранулезных и текаклетках. На данной стадии развития наблюдается положительная корреляция между степенью пролиферации и областью васкуляризации. Возможно, что последующая селекция преантральных фолликулов связана со степенью васкуляризации [19, 21, 36, 39].

На антральной стадии развития фолликула его васкулярная оболочка состоит из двух капиллярных сетей — внутренней (основной мембраны) и наружной (текальной). Неоваскуляризация важна для роста антрального фолликула, а также доминирования преовуляторного фолликула. Выбор лидирующего фолликула зависит от качества его кровоснабжения и функционирования капилляров. Каждый зрелый фолликул обладает разветвленной системой кровоснабжения. Таким образом, доминантный фолликул характеризуется обширной васкуляризацией и высокой концентрацией СЭФР [21, 36].

Практическая значимость рассматриваемых процессов прослеживается в работе Д.А. Ниаури и соавт. [6], которыми было отмечено, что нарушения менструального цикла и функциональное бесплодие характеризуются изменением кровоснабжения яичников и матки. В своем исследовании авторы провели оценку гемодинамических параметров репродуктивной системы женщины при различных формах овариальной недостаточности, включая гиперпролактинемию и овариальную гиперандрогению. Исследование кровотока в яичниках в период селекции предполагаемого доминантного фолликула из когорты синхронизированных фолликулов показало усиление кровотока в строме яичника с доминантным фолликулом у здоровых женщин. Достоверных различий параметров кровотока в яичнике, содержащем доминантный фолликул, при разных видах овариальной недостаточности не было выявлено. Нарушение процесса васкуляризации, по мнению этих исследователей, является ключевой причиной развития овариальной недостаточности, приводящей к ослаблению функции лидирующего фолликула в процессе фолликулогенеза и дальнейшим затруднениям неоангиогенеза желтого тела [6].

СЭФР (гепаринсвязывающий гликопротеин) выступает как ключевой ангиогенный маркер, и ему отводится значительная роль в регуляции фолликулярного ангиогенеза, также необходимо отметить его способность к инициированию данного процесса и пролиферации клеток фолликула. Действие СЭФР имеет несколько аспектов, что обусловлено существованием его 5 изоформ с различными биохимическими свойствами (см. табл. 1). По данным литературы, мРНК рассматриваемого фактора впервые обнаруживается в тека- и гранулезных клетках зрелых вторичных фолликулов, но отсутствует в первичных и ранних вторичных фолликулах [3, 19, 44].

Экспрессия изоформ СЭФР различна в процессе фолликулогенеза. Так, матричная РНК $СЭФР_{165}$ экспрессируется в гранулезных клетках крупного рогатого скота и не зависит от концентрации эстрадиола, но находится в прямой зависимости от концентрации прогестерона. Противоположный эффект данные стероиды оказывают на экспрессию мРНК $СЭФР_{121}$. Такое явление возможно в силу оказания рецепторами СЭФР — нейрофилином-1 и нейрофилином-2 — различного эффекта на изоформы данного фактора [31, 43]. Известно, что $СЭФР_{121}$ не способен связываться нейрофилином-1 в силу низкой митогенной активности; мРНК нейрофилина-1 присутствует в гранулезных и текаклетках, а мРНК нейрофилин-2 экспрессируется только в слое текаклеток. В эксперименте на клетках гранулезы крупного рогатого скота было показано, что секреция нейрофилина-1 регулируется прогестероном и эстрадиолом. Более того, авторы большинства работ отмечают локализацию этого фактора в васкулярной зоне гранулезных клеток [10, 12, 37].

Биологические эффекты СЭФР значительно модулируются скоординированным действием других ангиогенных маркеров (ангиопоэтин, ФРФ, ФРП). Концентрация фактора роста фибробластов 2-го типа заметно увеличивается на заключительной стадии развития фолликулов у крупного рогатого скота, а максимальная концентрация тромбоспондина и его рецептора CD36 обнаруживается в малых антральных фолликулах. Таким образом, предполагается, что регуляция тромбоспондином может играть ключевую роль в фолликулярной атрезии путем ингибирования ангиогенеза. Экспрессия данного ангиогенного маркера увеличивается под действием ЛГ в гранулезных клетках крыс и присутствует на ранних стадиях формирования желтого тела [9, 19, 35].

Характер ангиогенеза, определяемый синтезом ангиогенных факторов роста и их рецепторов, является не единственным параметром, определяющим состояние кровоснабжения фолликула на каждой отдельной стадии развития, поскольку во многом этот процесс зависит также от свойств эндотелия и баланса эндотелиальных факторов, контролирующих тонус сосудов [15]. Эндотелины плазмы крови оказывают влияние на различные физиологические и патологические процессы во многих тканях и органах, а увеличение их концентрации можно использовать в качестве маркеров патологических процессов в организме человека [16, 24, 45, 27, 41]. Эндотелиальные клетки выстилают внутреннюю поверхность сосудов, эндотелий формирует барьер между кровью и гладкой мускулатурой сосудов и функционирует в качестве модулятора функций сосудов. Под контролем эндотелина происходит регулирование сосудистого тонуса, гемостаза, транспорта липидов и иммунной реактивности [8, 17, 28, 34].

Для выяснения физиологической роли эндотелина фолликулярной жидкости в динамике развития фолликулов при эндокринном бесплодии и оценки влияния указанного маркера на величину пула малых антральных фолликулов, их рост и селекцию доминантного фоллику-

***Таблица 2*. Свойства эндотелинов, места их синтеза и рецепторы**

Эндотелин-1	Эндотелин-2	Эндотелин-3
	Синтез	
Эндотелиальные клетки, гладкие мышечные клетки, нейроны, астроциты головного и спинного мозга, мезангиальные клетки почек, внутриматочные клетки, гепатоциты, клетки Сертоли, эпителиоциты молочной железы	Почки, кишечник, в небольших количествах обнаруживается в миокарде, матке, плаценте	Циркулирует в плазме крови, источник неизвестен. В высоких концентрациях обнаруживается в головном мозге
	Функции	
Стимулирует образование ряда простагландинов	Неизвестна	Стимулирует образование ряда простагландинов

***Таблица 3*. Сродство эндотелиновых рецепторов к различным изоформам эндотелина**

Тип эндотелинового рецептора	Сродство к изоформам
$ЭТ_A$	ЭТ-1>ЭТ-2>>ЭТ-3
$ЭТ_B$	ЭТ-1= ЭТ-2= ЭТ-3
$ЭТ_C$	ЭТ-3> ЭТ-1

ла необходимо рассмотреть особенности химического строения эндотелина.

Семейство эндотелинов представлено четырьмя эндотелиновыми пептидами, имеющими сходную химическую структуру. Хорошо изученными являются эндотелин-1 (ЭТ-1), эндотелин-2 (ЭТ-2) и эндотелин-3 (ЭТ-3). Эндотелин-2 отличается от эндотелина-1 двумя аминокислотными остатками в структуре N-концевого участка, а эндотелин-3 и эндотелин-1 различаются шестью аминокислотными остатками. Сходство аминокислотной последовательности позволяет выдвинуть гипотезу об общности происхождения групп молекул эндотелинов [8, 25, 45].

Синтез эндотелина заключается в последовательном отщеплении олигопептидных фрагментов у неактивного предшественника препроэндотелина, после чего он превращается в активную форму. В свою очередь препроэндотелин человека состоит из 212 аминокислотных остатков, а N-концевой участок характеризуется наличием гидрофобной последовательности, назначением которой, как предполагают, является транспорт данного предшественника через мембрану клеточного ядра для последующих его превращений [5, 23, 28, 46].

В табл. 2 представлены функции основных видов эндотелина, места их синтеза, а также их специфические рецепторы.

В табл. 3 показано сродство эндотелиновых рецепторов к различным изоформам эндотелина.

Рецепторы эндотелина экспрессируются не только на начальной стадии процесса формирования доминантного фолликула, но и в период овуляции как в гранулезных, так и в текаклетках. В период овуляции в гранулезных клетках обнаруживаются высокие концентрации эндотелина-2 [13, 25, 26, 33, 40]. При этом наблюдаются экспрессия эндотелина-1 в гранулезных клетках яичников человека и проявление данного фактора иммунореактивности в фолликулярной жидкости, полученной у женщин при индукции суперовуляции в лечебных циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В полученной фолликулярной жидкости уровень эндотелина-1 выше в гонадотропинстимулированных циклах по сравнению со спонтанными циклами. В ходе экспериментов [13] была доказана экспрессия эндотелиновых рецепторов типов А и В ($ЭТ_A$ и ЭТв) в яичниках человека, причем наблюдали $ЭТ_B$ в гораздо более высокой концентрации, чем $ЭТ_A$.

$ЭТ_A$ и ЭТв имеют высокую экспрессию в период формирования кровеносной системы яичников. В овуляторном фолликуле отмечали концентрацию большого количества рецепторов к $ЭТ_A$, локализованных в *theca interna*. В качестве контроля использовались яичники крыс, в которых была обнаружена значительная экспрессия рецепторов к $ЭТ_B$ в предоминантных фолликулах, локализованных в гранулезных клетках. Был сделан вывод о том, что рецепторы к $ЭТ_B$ отрицательно регулируют накопление эстрадиола в гранулезных клетках крыс. В яичниках человека в гранулезных и лютеиновых клетках оба рецептора также не влияют на секрецию эстрадиола и прогестерона [25].

Интересно проанализировать исследование M. Zhao и соавт. [46]. Они сделали вывод о возможном влиянии концентраций СЭФР, оксида азота, эндотелина-1 фолликулярной жидкости на благоприятный исход манипуляций ЭКО. Ранее было доказано, что число антральных фолликулов или размер развивающихся фолликулов может играть прогностическую роль в прогнозировании ответа на суперовуляцию в циклах ЭКО [46]. Таким образом, целью работы стало исследование взаимозависимости между концентрацией СЭФР, оксида азота, эндотелина-1 фолликулярной жидкости и числом антральных фолликулов, обеспечивающих более точное прогнозирование наступления беременности. В исследовании принимала участие 131 женщина с бесплодием. Среди них 39 пациенток имели первичное бесплодие, и у 92 пациенток диагностировано вторичное бесплодие. Возраст женщин варьировал от 25 до 35 лет, средний возраст составил 30 лет. Женщины страдали бесплодием от 2 до 15 лет. У пациенток было подтверждено отсутствие симптомов эндометриоза, кист яичников, синдрома поликистозных яичников. Контроль стимуляции овуляции осуществлялся на 2—6-й дни. Стимуляцию проводили антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона (трипторелином в суточной дозе 0,1 мг), а через 3 дня женщинам вводили рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон (пурегон, 75 МЕ). Рекомбинантный хорионический гонадотропин вводили в момент достижения диаметра 16—18 мм как минимум тремя фолликулами (овитрель). Концентрация эстрадиола в сыворотке на момент введения овитреля превышала 2000 пмоль/л. Через 36 ч была проведена аспирация овоцитов [46]. Результаты исследований M. Zhao и соавт. показали, что содержание СЭФР и оксида азота в фолликулярной жидкости антральных фолликулов через 36 ч после введения хорионического гонатропина значительно увеличивалось у женщин с наступившей беремен-

ностью по сравнению с таковым у женщин, у которых беременность не наступила (p<0,05). Концентрация эндотелина-1 была немного ниже у 1-й группы женщин по сравнению с таковой во 2-й группе (p<0,05) [46].

Таким образом, СЭФР идентифицирован как ангиогенный и васкулярный фактор, способствующий секреции и аккумулированию антральной жидкости; оксид азота — как модулятор преобразований овоцита и регулятор формирования капиллярной сети, а ЭТ-1 — как потенциальный вазоконстриктор [46]. Представленные данные о комбинировании измерений овариального объема или количества антральных фолликулов и таких факторов, как СЭФР, оксид азота, ЭТ-1, дают возможность прогнозировать результат лечебных циклов ЭКО.

Присутствие рассматриваемого фактора в фолликулярной жидкости у женщин, включенных в лечебный цикл ЭКО и подвергающихся индукции суперовуляции, показывает степень вовлечения эндотелиновой системы в процесс фолликулогенеза человека. Данное обстоятельство демонстрирует значительную практическую значимость исследований эндотелинов в динамике развития фолликулов при эндокринной патологии.

Возрастающее число исследований в области ангиогенеза как такового и ангиогенных факторов роста, в частности, подтверждает, что физиологический ангиогенез является одним из ключевых процессов в репродукции человека. В настоящее время можно считать доказанным, что дисфункция процесса ангиогенеза может рассматриваться как один из ключевых патофизиологических факторов, обусловливающих развитие заболеваний репродуктивной системы человека. Понимание этого аспекта применительно к фолликулогенезу открывает новые перспективы в разработке методов диагностики и лечения репродуктивных расстройств и позволит определить новые направления терапевтических воздействий в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Дубинская Е.Д. и др.* Диагностическое значение маркеров ангиогенеза в биологических жидкостях больных с аденомиозом. Пробл репрод 2009; 1: 86—88.
2. *Бурлев В.А., Зайдиева З.С., Ильясова Н.А.* Регуляция ангиогенеза гестационного периода (обзор литературы). Пробл репрод 2008; 3: 18—22.
3. *Капустина И.Н., Сидорова И.С.* Значение сосудистого фактора в развитии опухолей яичников (обзор). Рос вестн акушгин 2003; 3: 6: 27—32.
4. *Линде В.А., Иванов А.В.* Фолликулогенез: от примордиальной зародышевой клетки до белого тела (обзор литературы). Пробл репрод 2007; 4: 21—25.
5. *Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е.* Межклеточные взаимодействия. М: Медицина 2003; 288.
6. *Ниаури Д.А., Джемлиханова Л.Х., Гзгзян А.М.* Репродуктивное здоровье женщины и недостаточность функции яичников. Журн акуш и женских болезней 2010; 1: 84—89.
7. *Орлов В.И., Авруцкая В.В., Крымшокалова З.С., Крукиер И.И.* Продукция факторов роста и вазоактивных веществ при синдроме задержки роста плода. Журн акуш и женских бол 2008; 2: 84—89.
8. *Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А. и др.* Биохимия и физиология семейства эндотелинов (обзор литературы). Кардиология 2000; 6: 78—85.
9. *Соколян А.В., Мурашко А.В., Кречетова Л.В. и др.* Динамика ангиогенных факторов роста во время беременности и в послеродовом периоде у беременных с хронической венозной недостаточностью. Пробл репрод 2009; 2: 20—23.
10. *Abramovich D., Celin A., Hernandez F. et al.* Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats without hormonal treatment. Reproduction 2009; 137: 309—320.
11. *Bassini G., Bussolati S., Santini S. et al.* Hydroxyestrogens inhibit angiogenesis in swine ovarian follicles. Endocrinology 2008; 199: 127—135.
12. *Ben-Ami I., Freimann S., Armon L. et al.* Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. Mol Hum Reprod 2006; 12: 7: 413—419.
13. *Bridges P., Jo M., Alem L. et al.* Production and binding of endothelin-2 (EDN-2) in the rat ovary: endothelin receptor subtype A (EDNRA)-mediated contraction. Reprod Fertil Dev 2010; 22: 780—877.
14. *Bruno J., Matos M., Chaves R. et al.* Angiogenic factors and ovarian follicle development. Anim Reprod 2009; 6: 2: 371—379.
15. *Clapp C., Thebault S., Jeziorski M. et al.* Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. Physiol Rev 2009; 89: 1177—1215.
16. *Donckier J.E., Mertens-Strijthagen J., Flamion B.* Role of the endothelin axis in the proliferation of human thyroid cancer cells. Clin Endocrinol (Oxf) 2007; 67: 4: 552—556.
17. *Earley S., Resta T.* Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: 1: 86—93.
18. *Elvin J., Martin M.* Mouse models of ovarian failure. Rev Reprod 1998; 3: 183—195.
19. *Fraser H.* Regulation of the ovarian follicular vasculature. Reprod Biol Endocrinol 2006; 4: 4—18.
20. *Geva E., Jaffe R.* Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. Fertil Steril 2000; 74: 3: 429—438.
21. *Grasul-Bilska A., Navanukraw C., Johnson M. et al.* Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. J Anim Sci 2007; 85: 1914—1922.
22. *Greenaway J., Gentry P., Feige J. et al.* Trombospondin and Vascular Endothelial Growth Factor Are Cyclically Expressed in an Inverse Pattern During Bovine Ovarian Follicle Development. Biol Reprod 2005; 72: 1071—1078.
23. *Grimshaw M.* Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. Endocr Relat Cancer 2007; 14: 2: 233—244.
24. *Kedzierski R., Yanagisawa M.* Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. Ann Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41: 851—876.
25. *Ko C., Gieske M., Al-Alem L. et al.* Endothelin-2 in Ovarian Follicle Rupture. Endocrinology 2006; 147: 4: 1770—1779.
26. *Kim J., Indrani C., Bagchi M. et al.* Signaling by Hypoxia-Inducible Factors Is Critical for Ovulation In Mice. Endocrinology 2009; 150: 3392—3400.
27. *Klipper E., Levit A., Mastish Y. et al.* Induction of Endothelin-2 Expression by Luteinizing Hormone and Hypoxia: Possible Role in Bovine Corpus Luteum Formation. Endocrinology 2010; 151: 1914—1922.

28. *Klipper E., Gilboa T., Levy N. et al.* Characterization of endothelin-1and nitric oxide generating system in corpus luteum-derived endothelial cells. Reproduction 2004; 128: 463—473.

29. *Lam P., Haines C.* Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system. Fertil Steril 2005; 84: 6: 1775—1778.

30. *Losordo D., Isner J.* Estrogen and Angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 6—12.

31. *Martelli A., Bernabo N., Berardinelli P. et al.* Vascular supply as a discriminanting factor for pig preantral follicle selection. Reproduction 2009; 137: 45—58.

32. *Muller K., Ellenberger C., Schoon C.* Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. Res Veterinary Sci 2009; 87: 3: 421—431.

33. *Orio F., Palomba S., Cascella T. et al.* Early Impairment of Endothelial Structure and Function in Young Normal-Weight Women with Polycystic Ovary Syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4588—4593.

34. *Palanisamy G., Cheon Y., Kim J. et al.* A Novel Pathway Involving Progesterone Receptor, Endothelin-2, and Endothelin Receptor B Controls Ovulation in Mice. Mol Endocrinol 2006; 20: 11: 2784—2795.

35. *Parborell F., Abramovich D., Tesone M.* Intrabursal administration of the antiangiopoietin 1 antibody produces a delay in rat follicular associated with an Increase in ovarian apoptosis mediated by changes in the expression of BCL2 related genes. Biol Reprod 2008; 78: 506—513.

36. *Robinson R., Woad K.J., Hammond A. et al.* Angiogenesis and vascular function in the ovary. Reproduction 2009; 138: 869—881.

37. *Shimizu T., Jiang J., Iijiama K. et al.* Induction of Follicular Development by Direct Single Injection of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Fragments into the Ovary of Miniature Gilts. Biol Reprod 2003; 69: 1388—1393.

38. *Shimizu T., Jiang J., Sasada H., Sato E.* Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. Biol Reprod 2002; 67: 1846—1852.

39. *Shirota K., Tateishi K., Koji T. et al.* Early human preantral follicles have relaxin and relaxin receptor (LGR7), and relaxin promotes their development. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 516—521.

40. *Shirota K., Tateishi K., Emoto M. et al.* Relaxin-induced angiogenesis in ovary contributes to follicle development. Ann N Y Acad Sci 2005; 144—146.

41. *Spinella F., Rosano L., Castro V., Decandia S., Natali P., Bagnato* A. Endothelin-1 and endotelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1α in human melanoma cells. Cancer Res 2007; 67: 4: 1725—1734.

42. *Tatone C., Fernanda A., Carbone M. et al.* Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. Hum Reprod 2008; 14: 2: 131—142.

43. *Taylor P., Hillier S., Fraser H.* Effect of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. Journal of Endocrinology 2004; 183: 1—17.

44. *Watts S.* Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 2010; 298: 254—260.

45. *Wülfing P., Kersting C., Tio J. et al.* Endothelin-1-, Endothelin-A-, and Endothelin-B-Receptor Expression Is Correlated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis in Breast Cancer. Clin Cancer Res 2004; 10: 2393—2400.

46. *Zhao M., Chang C., Liu Z. et al.* The level of vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and endothelin-1 was correlated with ovarian volume or antral follicle counts: A potential predictor of pregnancy outcome in INF. Growth Factors 2010; 28: 5: 299—305.