

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕПАРАНСУЛЬФАТОВ В ОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ЭНДОМЕТРИОИДНЫХ КИСТ ЯИЧНИКОВ

*С.В. Айдагулова, Ю.С. Тимофеева, А.В. Волчек, В.М. Кулешов, И.О. Маринкин*

*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

С помощью метода иммуногистохимии изучена экспрессия гепарансульфат протеогликанов в эутопическом и гетеротопическом эндометрии у пациенток с эндометриозом яичников. Одновременное повышение уровня экспрессии коровых белков всех исследованных гепарансульфат протеогликанов и содержания гепарансульфата в патологических тканях свидетельствует о важной роли гликозилированных молекул в патогенезе эндометриоза яичников.

*Ключевые слова:* эндометриоз яичников, внеклеточный матрикс, протеогликаны, гепарансульфаты, гепараназа, иммуногистохимия.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-96-99

## HEPARAN SULFATES EXPRESSION IN SURGERY MATERIAL OF OVARIAN ENDOMETRIAL CYSTS

*S.V. Aidagulova, Yu.S. Timofeeva, A.V. Volchek, V.M. Kuleshov, I.O. Marinkin*

*FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation*

The expression of heparan sulfate proteoglycans in eutopic and heterotopic endometrium in patients with ovarian endometriosis was studied using the method of immunohistochemistry. The simultaneous increase in the level of expression of core proteins of all studied heparan sulfate proteoglycans and the content of heparan sulfate in pathological tissues indicates the important role of glycosylated molecules in the pathogenesis of ovarian endometriosis.

*Key words:* ovarian endometriosis, extracellular matrix, proteoglycans, heparan sulfates, heparanase, immunohistochemistry.

Эндометриоз яичников (ЭЯ) – эстроген-зависимое воспалительное заболевание с прогрессирующим ростом эктопических очагов эндометрия за пределами полости матки, клинически ассоциированное с болевым синдромом, бесплодием и потенциально – с риском опухолевой трансформации [1, 3, 4]. Фундаментальные характеристики предопухолевых изменений и опухолевого роста связаны с ремоделированием внеклеточного матрикса, в котором за исключением волокон соединительной ткани наибольший удельный вес приходится на протеогликаны (ПГ) – белково-углеводные макромолекулы, состоящие из коровых белков с ковалентно прикрепленными углеводными цепочками гликозаминогликанов [5].

Гепарансульфат протеогликаны (ГСПГ) являются одним из классов ПГ, организуют межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия и имеют тканевую специфичность. Среди них ведущие роли принадлежат синдекану-1 (SDC-1) и глипикану-1 (GPC-1), локализованным на плазмолеммах, а также перлекану (HSPG2), экспрессируемому в базальных мембранах эпителиальных и эндотелиальных клеток [6].

Гепарансульфат протеогликаны связаны с различными белками внеклеточного матрикса и молекулами клеточной адгезии (интегрины, факторы

роста, ламинин-1, фибронектин, коллаген IV типа и т.д.), участвуя в широком спектре физиологических и патологических процессов, в том числе опухолевых [5, 7]. Например, SDC-1 посредством передачи сигналов TGF- $\beta$  модулирует инвазивный потенциал эндометриомы при ЭЯ [4].

Функциональная активность ГСПГ во многом определяется ферментом гепараназой (HPSE) [8], которая расщепляет углеводные цепи гепарансульфата (ГС), приводя к изменению архитектуры межклеточного матрикса и высвобождению биологически активных лигандов ГС – факторов роста, хемокинов и морфогенов, что лежит в основе ослабления межклеточных контактов при воспалении, инвазии и опухолевой трансформации [9].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

С помощью метода иммуногистохимии изучить экспрессию гепарансульфат протеогликанов в эутопическом и гетеротопическом эндометрии у пациенток с эндометриозом яичников.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен операционный материал эндометриоидных кист яичников и биоптаты эндометрия 11 женщин с наружным генитальным эндометриозом III стадии в пролиферативной фазе цикла.

С помощью иммуногистохимии (ИГХ) на парафиновых срезах исследована экспрессия суммарных ГСПГ, коровых белков SDC-1, HSPG2, GPC-1 и фермента деградации их углеводных цепей HPSE.

Для визуализации суммарных ГСПГ в качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела к углеводным цепям ГС млекопитающих («Millipore», разведение 1:100); первичные антитела к коровому белку SDC-1 («ThermoScientific», готовые к использованию); мышинные антитела к HSPG2 («Abcam», 1:100); кроличьи антитела к GPC-1 («Abcam», 1:100) и кроличьи антитела к HPSE («Abcam», 1:100). Продукты ИГХ-реакции визуализировали с помощью набора «HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit («Abcam»)). Результаты ИГХ-реакции изучали на 40–55 полях зрения (с обязательным наличием эпителия) на группу при увеличении 400 с помощью микроскопа Axio Scope.A1 с фотокамерой AxioCam MRc5 и программой анализа изображения Zen blue (C.Zeiss). Статистическую обработку проводили с использованием пакета RStudio (<http://www.rstudio.com/>); применяли критерий Колмогорова – Смирнова для двух независимых выборок с нормальным распределением. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Исследование одобрено этическим комитетом НГМУ (протокол № 63 от 27.03.2014). Пациентками подписано информированное согласие на хирургическое лечение и использование результатов исследования в научных целях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном светооптическом исследовании биоптатов эндометрия и операционного материала пациенток в пролиферативную фазу цикла выявлен гетерогенный характер экспрессии суммарных ГСПГ в эпителиальном компартменте и строме – от выраженного до незначительного. В биоптатах ГСПГ локализовались внутриклеточно, на плазмолеммах и в межклеточном матриксе; в эпителии желез реакция была очень гетерогенной, строма эндометрия характеризовалась менее интенсивной иммунопозитивной реакцией, в основном в межклеточном матриксе и за счет одиночных плазмоцитов. В гетеротопиях эндометрия суммарные ГСПГ локализовались также неравномерно, в основном в эпителии и межклеточном матриксе цитогенной стромы. Светооптически экспрессия суммарных ГСПГ в операционном материале менее интенсивна по сравнению с эуэндометрием, однако строма кист превосходила

эуэндометрий, и площадь продуктов ИГХ-реакции статистически значимо ( $p = 0,0208$ ) повышена в патологических очагах (рис.).

Далее был изучен вклад индивидуальных представителей семейства ГСПГ в их суммарную экспрессию с помощью антител к коровым белкам синдекана-1, глипикана-1 и перлекана. В гетеротопиях экспрессия SDC-1 была минимальной, она отмечена лишь в базальных и базолатеральных цитолеммах эпителиоцитов. Реакция на HSPG2 была наибольшей в эпителии при очень слабой реакции в цитогенной строме и фиброзной части капсулы эндометриом.

Однако реакция на GPC-1 была выраженной в строме и отсутствовала в эпителии. Следует отметить, что HSPG2 может действовать как проангиогенный фактор, способствуя усилению проницаемости сосудов и пролиферации эндотелиоцитов [5].

В целом, статистически значимое превышение площади продуктов реакции выявлено в операционном материале по сравнению с эуэндометрием тех же пациенток для всех коровых белков ГСПГ, однако наибольшая площадь продуктов реакции была установлена для GPC-1 (рис.), содержание которого повышено в опухолях яичников [10].

По данным [11], при эндометриозе экспрессия HPSE в эуэндометрии в первую фазу цикла находится на минимальном уровне и нарастает к концу секреторной фазы цикла, способствуя десквамации функционального слоя.

В нашем исследовании HPSE в эуэндометрии локализовалась в одиночных эпителиоцитах и мелких очагах перигландулярной стромы, при этом в операционном материале экспрессия HPSE локализована в эпителиальной компоненте гетеротопий и была повышенной ( $p = 0,0466$ ).

Ранее нами показано [2], что выраженная экспрессия HPSE в эпителии овариальных эндометриоидных кист у пациенток раннего репродуктивного возраста с эндометриозом яичников III стадии ассоциирована с воспалительно-клеточной инфильтрацией и наличием болевого синдрома.

Проведенный недавно кластерный генный анализ [4] продемонстрировал, что ткань эндометриоидных гетеротопий вариабельна в отношении паттерна экспрессии генов: из 15 образцов выделено всего 2 образца с высоким уровнем экспрессии генов SDC-1, SDC-4 и молекул, вовлеченных в TGF- $\beta$ -сигналинг (TGF- $\beta$ 1, ESR1, CTNNB1, SNAI1, BMI1); остальные 13 из 15 образцов демонстрировали низкий профиль экспрессии указанных генов.

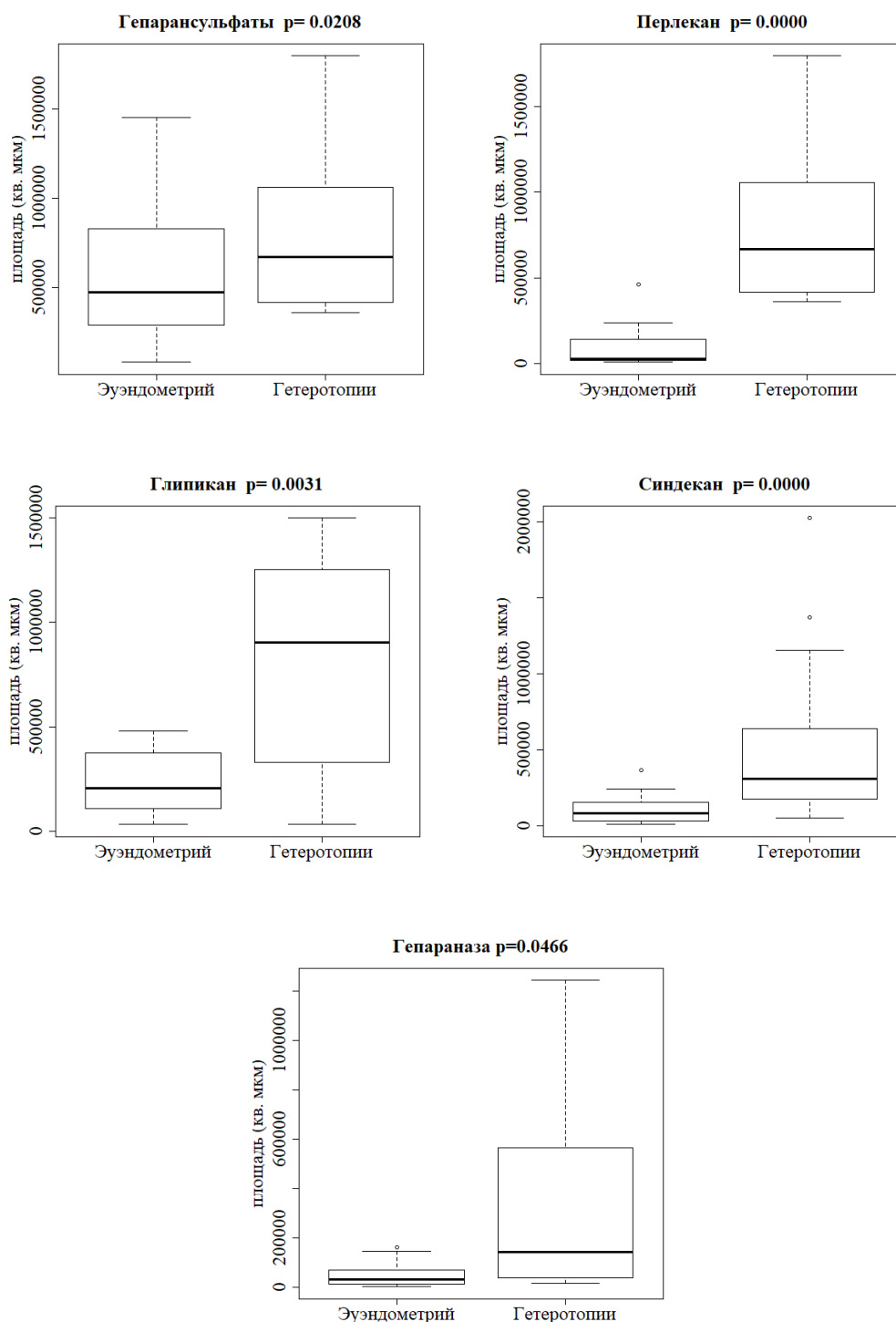


Рис. Экспрессия гепарансульфата, коровых белков ГСПГ и гепараназы в эутопическом эндометрии и гетеротопиях у пациенток с эндометриозом яичников III стадии в пролиферативную фазу цикла. Данные представлены в виде Ме (Q1; Q3).  $P < 0,05$  является статистически значимым

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, у пациенток с эндометриозом яичников III стадии сравнительный ИГХ-анализ содержания гепарансульфата, экспрессии коровых белков отдельных представителей ГСПГ и фермента биodeградации углеводных цепей ГС выявил статистически значимые различия

между эутопическим и гетеротопическим эндометрием. Одновременное повышение уровня экспрессии коровых белков всех исследованных ГСПГ и содержания ГС в патологических тканях свидетельствует о важной роли гликозилированных молекул в патогенезе эндометриоза яичников.

## ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Маринкин И.О., Непомнящих Д.Л., Кулешов В.М. и др. / Marinkin I.O., Nepomnyashchikh D.L., Kuleshov V.M., et al. Ультроструктурное исследование рецептивности эндометрия в условиях предгравидарной подготовки при привычном невынашивании беременности / Ultrastructural study of endometrial receptivity during pregravid treatment of recurrent miscarriage // Бюллетень Сибирского отделения РАМН / *Bulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh nauk* [Bulletin of Siberian branch of RAMS]. – 2014. – Т. 34, № 2. – С. 29–33. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Маринкин И.О., Тимофеева Ю.С., Кулешов В.М. и др. / Marinkin I.O., Timofeeva Yu.S., Kuleshov V.M., et al. Особенности экспрессии синдекана-1 и гепараназы в эпителии эндометриодных кист яичников третьей стадии / Osobennosti expressii sindekana-1 i geparanazy v epiteliy endometrioidnykh kist yaichnikov tret'ey stadii [Syndecan-1 and heparanase expression in epithelial ovarian endometriomas at IIIrd stage of endometriosis] // Акушерство и гинекология / *Akusherstvo i Ginekologiya* [Obstetrics and Gynecology]. – 2018. – № 11. – С. 86–91. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Bulun S.E., Yilmaz B.D., Sison C., et al. Endometriosis // *Endocr. Rev.* – 2019. – Vol. 40 (4). – P. 1048–1079.
4. Ponandai-Srinivasan S., Saare M., Boggavarapu N.R., et al. Syndecan-1 modulates the invasive potential of endometrioma via TGF- $\beta$  signalling in a subgroup of women with endometriosis // *Hum. Reprod.* – 2020. – Vol. 35 (10). – P. 2280–2293.
5. Iozzo R.V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans // *Matrix Biol.* – 2015. – Vol. 42. – P. 11–55.
6. Annaval T., Wild R., Créton Y., Sadir R., et al. Heparan sulfate proteoglycans biosynthesis and post synthesis mechanisms combine few enzymes and few core proteins to generate extensive structural and functional diversity // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25 (18). – P. 4215. – doi: 10.3390/molecules25184215.
7. Farach-Carson M.C., Warren C.R., Harrington D.A., Carson D.D. Border patrol: Insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders // *Matrix Biol.* – 2014. – Vol. 34. – P. 64–79.
8. Vlodaysky I., Gross-Cohen M., Weissmann M., et al. Opposing functions of heparanase-1 and heparanase-2 in cancer progression // *Trends Biochem. Sci.* – 2018. – Vol. 43. – P. 18–31.
9. Masola V., Bellin G., Gambaro G., Onisto M. Heparanase: A multitasking protein involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and intracellular events // *Cells.* – 2018. – Vol. 7 (12). – P. 236–246.
10. Davies E.J., Blackhall F.H., Shanks J.H., et al. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10 (15). – P. 5178–5186.
11. Xu X., Ding J., Ding H., Shen J., et al. Immunohistochemical detection of heparanase-1 expression in eutopic and ectopic endometrium from women with endometriosis // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 88 (5). – P. 1304–1310.

Авторы статьи благодарят заведующую лабораторией гликобиологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» д. б. н. Григорьеву Эльвиру Витальевну за консультирование по протеогликанам и научного сотрудника лаборатории к. б. н. Казанскую Галину Михайловну за иммуногистохимическое окрашивание суммарных гепарансульфатов.

## Контактная информация

Айдагулова Светлана Владимировна – д. б. н., профессор, зав. лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции, Новосибирский государственный медицинский университет, e-mail: s.aydagulova@gmail.com