

## РОЛЬ ПРОТЕОМНОГО ДИСБАЛАНСА ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

Томай Л.Р.<sup>1</sup>, Линде В.А.<sup>1</sup>, Ермолова Н.В.<sup>1</sup>, Гунько В.О.<sup>1</sup>, Погорелова Т.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России (344012 г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова 43), e-mail: tomay.rniiap@yandex.ru

С помощью двумерного электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии изучен протеомный профиль перитонеальной жидкости при наружном генитальном эндометриозе. Выявлены белки отличия, появляющиеся при наружном генитальном эндометриозе: аполипопротеин А-IV, глобулин, связывающий половые гормоны, компоненты системы комплемента С3 и С4b. К числу белков, отсутствующих при наружном генитальном эндометриозе, относятся фактор дифференцировки пигментного эпителия, транстиретин, гаптоглобин,  $\alpha$ -1-антитрипсин и ингибитор апоптоза 6. Обсуждается возможное значение идентифицированных белков в развитии основных нарушений при эндометриозе. Обнаруженные белки отличия могут быть использованы в качестве маркеров этого заболевания.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, перитонеальная жидкость, протеомный анализ, белки отличия.

## ROLE PROTEOMIC IMBALANCE PERITONEAL FLUID IN THE PATHOGENESIS OF EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

Tomay L.R.<sup>1</sup>, Linde V.A.<sup>1</sup>, Ermolova N.V.<sup>1</sup>, Gunko V.O.<sup>1</sup>, Pogorelova T.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Rostov Scientific-Research Institute of Obstetrics and Pediatrics» of Ministry of Health of Russia (344012, Rostov-on-Don, street Mechnikova, 43), e-mail: tomay.rniiap@yandex.ru

With the help of two-dimensional electrophoresis and time-of-flight mass-spectrometry the proteomic profile of peritoneal fluid is studied in external genital endometriosis. The proteins of difference which are appearing in external genital endometriosis are identified: apolipoprotein A-IV, sex hormone-binding globulin, complement of C3 and C4b. To number of the proteins which are absent in external genital endometriosis belong pigment epithelium-derived factor, transthyretin, haptoglobin,  $\alpha$ -1-antitripsin and apoptosisinhibitor 6. The possible meaning of the identified proteins in the development of the main violations in endometriosis is discussed. Discovered proteins differences can be used as markers of this disease.

Keywords: external genital endometriosis, peritoneal fluid, proteomic analysis, protein differences.

Актуальность изучения наружного генитального эндометриоза (НГЭ) связана с высокой частотой распространения этой патологии среди женщин детородного возраста и ее существенным влиянием на их репродуктивное здоровье и уровень жизни [1]. В настоящее время показана важная роль перитонеальной жидкости (ПЖ) в патогенезе эндометриоза, т.к. именно в ней происходит развитие и рост эндометриоидных очагов [7]. Исследование белкового состава ПЖ с помощью протеомных технологий, направленных на изучение совокупности экспрессируемых геномом белков, создает качественно новые возможности для углубления представлений о молекулярных механизмах развития эндометриоза, его прогнозирования и ранней диагностики [2, 5].

**Цель работы.** Изучить протеомный спектр ПЖ женщин с НГЭ и без НГЭ.

## Материал и методы исследования

В исследование были включены 20 пациенток репродуктивного возраста (средний возраст  $29,3 \pm 0,3$  года), из них 10 пациенток с НГЭ с III–IV стадиями заболевания согласно классификации r-AFS (основная группа) и 10 – без эндометриоза (контрольная группа). Материалом исследования служила ПЖ, полученная из позади-маточного пространства при выполнении лапароскопии. Протеомный анализ ПЖ проводили с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (приборы Protein IEFCell и ProteanXiMulti-Cell, Bio-Rad, США) с последующим окрашиванием белков ионами серебра [8]. Идентификацию белков после их трипсинолиза проводили методом времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии на масс-спектрометре AutoflexII (Bruker, Германия) с использованием программы MascotMSSearch (MatrixScience, США) и баз данных NCBI и Swiss-Prot. Результаты идентификации белков принимались как достоверные при уровне значимости не менее 95% и показателе сиквенс-покрытия не менее 60 %.

Достоверность различий в протеомном спектре ПЖ женщин контрольной и основной групп определяли с помощью  $\chi^2$ -критерия (программа Statistica версия 6.0. фирмы StatSoft, Inc.). Результаты оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного протеомного анализа ПЖ выявлен ряд белков отличия, присутствие или отсутствие которых имеет место только при НГЭ (см. табл., рис.). Так, в ПЖ женщин основной группы установлено появление следующих белков: **аполипопротеина А-IV, глобулина, связывающего половые гормоны (ГСПГ), компонентов системы комплемента С3 и С4b**, не обнаруженных у пациенток контрольной группы.

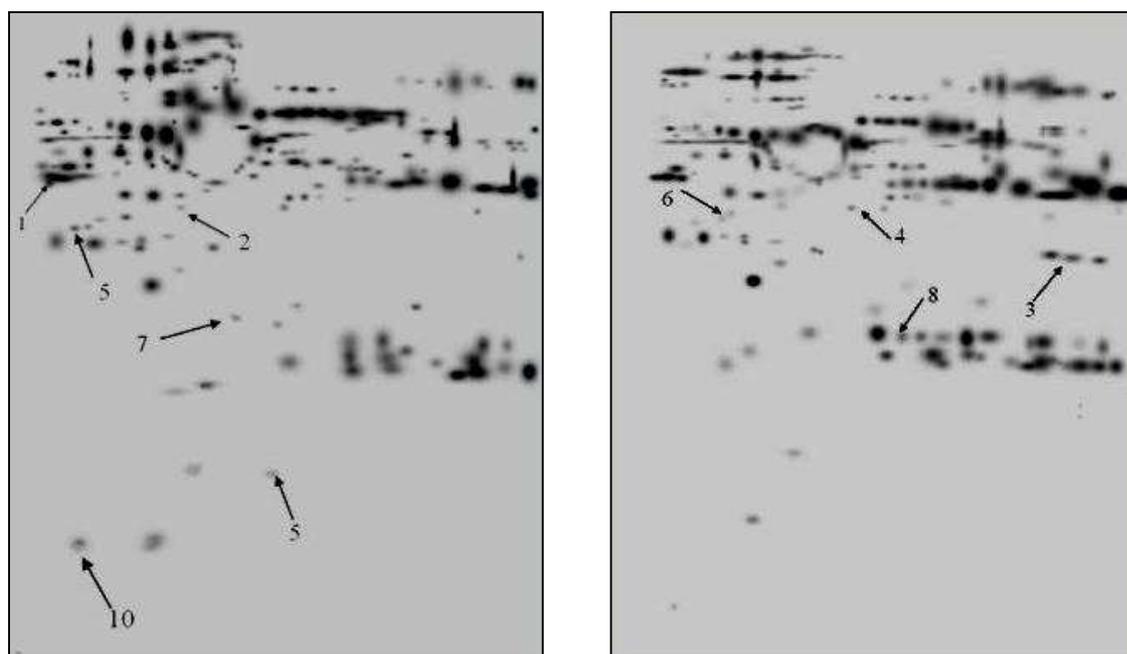
Таблица 1

Идентифицированные белки ПЖ женщин контрольной и основной групп

№	Название белка	№ в базе Swiss-Prot	Мм, кДа	pI	Конт. группа	Основ. группа	p
1	$\alpha$ -1-антитрипсин	P01009	58.6	5.4	+	–	0.011
2	Фактор дифференцировки пигментного эпителия	P36955	48.8	5.7	+	–	0.021
3	Компонент системы комплемента С3	P01024	48.8	8.4	–	+	0.031
4	Аполипопротеин А-IV	P06727	45.1	5.5	–	+	0.003

5	Гаптоглобин	P00738	44.4	5.5	+	-	0.003
6	Глобулин, связывающий половые гормоны	P04278	44.3	5.6	-	+	0.011
7	Ингибитор апоптоза 6	O43866	21.3	5.9	+	-	0.001
8	Компонент системы комплемента C4-b	P0C0L5	21.3	6.6	-	+	0.026
9	Транстиретин	P02766	12.6	5.5	+	-	0.000

Примечание: pI – изоэлектрическая точка, Мм-молекулярная масса, «+» – присутствие белка, «-» – отсутствие белка, р – достоверность отличий между группами.



А

Б

**Рис. 1. Протеомные карты перитонеальной жидкости женщин контрольной (А) и основной (Б) групп**

*Примечание. Нумерация белков соответствует таковой в таблице*

Увеличение продукции (и, как следствие, появление в ПЖ) **аполипопротеина А-IV**, обладающего антиоксидантными и антиинфламаторными свойствами [13], очевидно, имеет компенсаторное значение в условиях окислительного стресса и воспаления, сопровождающих развитие данной патологии.

Повышенное содержание при эндометриозе **ГСПГ**, регулирующего биодоступность стероидных гормонов для эндометриальных клеток, создает условия для локальной гиперэстрогении [9]. В этих условиях становится возможным усиление пролиферативного потенциала клеток эндометриоидных гетеротопий.

Усиление секреции перитонеальными макрофагами **компонентов системы комплемента С3 и С4b**, участвующими в воспалительной реакции, обезвреживании

апоптозных клеток и иммунных комплексов, вносит определенный вклад в механизмы развития эндометриоза и эндометриоз-ассоциированного бесплодия [10].

Наряду с этими отклонениями при НГЭ в протеомном спектре ПЖ отсутствуют 5 белков: **фактор дифференцировки пигментного эпителия, транстиретин, ингибитор апоптоза 6, гаптоглобин и  $\alpha$ -1-антитрипсин.**

**Фактор дифференцировки пигментного эпителия** является одним из наиболее мощных антиангиогенных и антипролиферативных факторов [6], поэтому угнетение его экспрессии может быть одной из причин, приводящих к снижению эндометриального апоптоза и усилению ангиогенеза, способствуя имплантации и росту гетеротопий.

Отсутствие в ПЖ женщин основной группы **транстиретина**, осуществляющего транспорт  $T_3$  и  $T_4$ , по-видимому, создает локальный избыток гормонов щитовидной железы, токсическое действие которых приводит к поражению репродуктивных органов [11]. Тиреоидные гормоны, модулируя эффекты эстрогенов на клеточном уровне, могут способствовать развитию нарушений гисто- и органогенеза гормоночувствительных структур и ухудшению течения эндометриоза [4].

Среди белков, не выявленных при НГЭ, важную роль в регуляции иммунного ответа выполняет секретируемый макрофагами **ингибитор апоптоза 6** [12]. Возможно, именно нарушение экспрессии этого белка приводит к формированию дисбаланса иммунокомпетентных клеток в ПЖ (за счет подавления апоптоза Т-лимфоцитов и НК-клеток).

Отсутствие в ПЖ неферментативного антиоксиданта **гаптоглобина** [14], можно полагать, вносит вклад в усиление окислительного стресса, развивающегося при эндометриозе.

При указанной патологии в ПЖ также не обнаружен  **$\alpha$ -1-антитрипсин** – ингибитор сериновых протеаз, которые непосредственно вовлечены в процессы инвазии эндометриальных клеток [3], что, по-видимому, обуславливает дисбаланс в системе протеаза-ингибитор, способствуя имплантации эндометриальных клеток.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что развитие эндометриоза происходит на фоне изменения продукции ряда важных белков, участвующих в регуляции действия гормонов, ангиогенеза, апоптоза, редокс-процессов, воспаления и иммунного ответа.

## **Выводы**

1. Модификация протеомного спектра ПЖ является важным патогенетическим фактором развития НГЭ.

2. Белки, которые отсутствуют или появляются в ПЖ при эндометриозе, могут служить информативными маркерами данного заболевания.

### Список литературы

1. Адамян, Л.В. Эндометриозы: руководство для врачей / Л.В. Адамян, В.И. Кулаков, Е.Н. Андреева // М.: Медицина, 2006. – 416 с.
2. Говорун, В.М. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке / В.М. Говорун, А.И. Арчаков // Биохимия. – 2002.– № 10.– С.1341–1359.
3. Дедуль, М.И. Система протеолиза в сыворотке крови и перитонеальной жидкости при хирургическом лечении больных эндометриозом / М.И. Дедуль, Л.Е. Радецкая, Л.Н. Кирпиченок // Новости хирургии. – 2006. – № 3. – С.74-80.
4. Ищенко, А.И. Эндометриоз: диагностика и лечение / А.И. Ищенко, Е.А. Кудрина // М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 104 с.
5. Линде, В.А. Протеомные технологии в изучении эндометриоза / В.А. Линде, Л.Р. Томай, В.О. Гунько и др. // Мед. вестн. Юга России. – 2013. – № 4. – С.12-16.
6. Минкевич, Н.И. PEDF-нейнгибиторный серпин с нейропротекторной и антиангиогенной активностями / Н.И. Минкевич, В.М. Липкин, И.А.Костанян // ActaNaturae. – 2010. – № 3. – С.74-84.
7. Bedaiwy, M.A. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications / M.A. Bedaiwy, T.Falcone // Minerva Ginecol. –2003. – V.55, N 4. – P.333-345.
8. Bernard, K.R. Methods in functional proteomics: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients, in-gel digestion and identification of proteins by mass spectrometry / K.R. Bernard, K.R. Jonscher, K.A. Resing, N.G.Ahn //Methods Mol. Biol. – 2004. –V. 250.– P. 263-282.
9. Hammond, G.L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction / G.L. Hammond // Biol. Reprod. – 2011. – V. 85, N 3. – P.431-441.
10. Kabut, J. Levels of complement components iC3b, C3c, C4, and SC5b-9 in peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis / J. Kabut, Z. Kondera-Anasz, J. Sikora et al. // Fertil. Steril. –2007. – V.88, N 5. – P.1298-1303.
11. Richardson S.J. Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones / S.J. Richardson // Int. Rev. Cytol. – 2007. – V. 258. – P.137-193.
12. Sarrias M.R. A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor / M.R. Sarrias, S. Roselló, F. Sánchez-Barbero et al. // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, N 42. – P. 35391-35398.

13. Spaulding H.L. Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions / H.L. Spaulding, E. Delvin, M. Lambert et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V.1631, N 2. – P.177-187.
14. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism / J.Wassell // Clin. Lab. –2000. – V. 46, N 11-12. – P.547-552.

**Рецензенты:**

Авруцкая В.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела, заведующая поликлиническим отделением ФГБУ «РНИИАП» Минздрава России. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Каушанская Л.В., д.м.н., главный научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела ФГБУ «РНИИАП» Минздрава России. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону.