



Бурлев В.А.

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

Департамент охраны здоровья женщин и детей, Университет Уппсалы, Уппсала, Швеция

Акценты деградации белков в эутопическом и эктопическом эндометрии у пациентов с эндометриозом через активацию убиквитинлигазы и накопления конъюгированного убиквитина

Конфликт интересов: не заявлен.

Благодарности: выражаем благодарность honorary professor M. Olovsson, MD N. Ilyasova, PhD Th. Kunovac Kallak, E. Davey Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden и consultant Emilian Prodromov, Republic of Bulgaria, за участие, обсуждение и поддержку. Научное и финансовое содействие осуществлялось ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Шведской королевской академией наук, Шведским медицинским исследовательским советом, Фондом планирования семьи в Уппсале, Университетом Уппсалы, Швеция, Rudbeck laboratory in Uppsala, The Human Protein Atlas and Atlas Antibody in Uppsala, Akademiska sjukhuset i Uppsala.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ: «Разработка дифференцированного подхода к ведению пациенток репродуктивного возраста с различными формами эндометриоза», № госрегистрации: 122020900125-8.

Подана: 29.01.2024

Принята: 15.04.2024

Контакты: vbourlev@mail.ru

Резюме

Введение. Не установлена роль конъюгированного с белками убиквитина и активности фермента убиквитинлигазы у пациентов с эндометриозом, бесплодием и болью. Исследований, связанных с одновременным изучением активации убиквитинлигазы и увеличения конъюгированного убиквитина, не проводилось, и в доступной научной литературе эти сведения не установлены.

Цель. Установить взаимосвязь и сопоставить данные о наличии хронической тазовой боли и бесплодия у пациентов с перитонеальной формой эндометриоза и накоплением конъюгированного с белком убиквитина за счет активации убиквитинлигазы в эутопическом и эктопическом эндометрии для обоснования выбора нового направления таргетной терапии.

Материалы и методы. Проведен анализ 73 пациентов в возрасте 27–37 лет с перитонеальной формой эндометриоза, хронической тазовой болью и бесплодием, подтвержденным при проведении лапароскопии. Использовался метод вестерн-блоттинга, количественной полимеразной цепной реакции, иммуногистохимического анализа в эутопическом и эктопическом эндометрии, для перитонеальной жидкости и сыворотки крови применялся иммуноферментный анализ. Результаты сопоставлены с хронической тазовой болью.

Результаты. Установлено, что при перитонеальной форме эндометриоза, наличии хронической тазовой боли и бесплодия в эутопическом и эктопическом эндометрии происходит одновременное увеличение экспрессии убиквитинлигазы и конъюгированного убиквитина по данным вестерн-блоттинга, количественной полимеразной

цепной реакции в реальном времени и иммуногистохимического анализа. Данные иммуноферментного анализа в крови и перитонеальной жидкости показали статистически значимое увеличение белка убиквитинлигазы и убиквитина у пациентов с болью и бесплодием.

Заключение. Полученные данные убедительно доказывают, что повышение активности убиквитинлигазы связано с накоплением конъюгированного убиквитина при эндометриозе и зависит от наличия болевого синдрома. Дальнейшее развитие перспективных направлений в лечении эндометриоза, болевого синдрома и бесплодия может быть основано на терапии ингибиторами убиквитинлигазы в различных модификациях.

Ключевые слова: эндометриоз, боль, эутопический и эктопический эндометрий, убиквитинлигаза, конъюгированный убиквитин, деградация белков

Burlev V.

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Acad. V.I. Kulakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden

Protein Degradation Accents in Eutopic and Ectopic Endometrium of Patients with Endometriosis through Activation of Ubiquitin Ligase and Accumulation of Conjugated Ubiquitin

Conflict of interest: nothing to declare.

Acknowledgments: we express our gratitude to honorary professor M. Olovsson, MD N. Ilyasova, PhD Th. Kunovac Kallak, E. Davey Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden and consultant Emilian Prodromov, Republic of Bulgaria for participation, discussion and support. Scientific and financial assistance was provided by the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of AGP named after Acad. V.I. Kulakov" Ministry of Health of Russia, Royal Swedish Academy of Sciences, Swedish Medical Research Council, Family Planning Foundation in Uppsala, Uppsala University, Sweden, Rudbeck laboratory in Uppsala, The Human Protein Atlas and Atlas Antibody in Uppsala, Akademiska sjukhuset i Uppsala.

The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation: "Development of a differentiated approach to the management of patients of reproductive age with various forms of endometriosis", state registration number: 122020900125-8.

Submitted: 29.01.2024

Accepted: 15.04.2024

Contacts: vbourlev@mail.ru

Abstract

Background. The role of protein-conjugated ubiquitin and ubiquitinligase enzyme activity in patients with endometriosis, infertility and pain has not been established. There have been no studies examining the simultaneous activation of ubiquitin ligase and the increase in conjugated ubiquitin, and this information is not established in the available scientific literature.

Purpose. To establish the relationship and compare the data on the presence of chronic pelvic pain and infertility in patients with peritoneal form of endometriosis and the

accumulation of protein-conjugated ubiquitin due to ubiquitin ligase activation in eutopic and ectopic endometrium to justify the choice of a new direction of target therapy.

Materials and methods. 73 patients aged 27–37 years with peritoneal endometriosis confirmed in laparoscopic surgery, chronic pelvic pain and infertility were analyzed. Western blotting, quantitative real-time polymerase chain reaction, and immunohistochemical analysis in eutopic and ectopic endometrial tissue were used, and enzyme-linked immunosorbent assay was used in peritoneal fluid and serum. The results were compared with chronic pelvic pain.

Results. Found in the peritoneal form of endometriosis and the presence of chronic pelvic pain in eutopic and ectopic endometrium, there is a simultaneous increase in the expression of ubiquitin ligase and conjugated ubiquitin according to Western blotting, quantitative real-time polymerase chain reaction and immunohistochemical analysis. Enzyme immunoassay data to assess the content in the blood and peritoneal fluid showed a statistically significant increase in ubiquitin ligase and ubiquitin in patients with pain.

Conclusion. The obtained data convincingly prove that the increase in ubiquitin ligase activity is associated with the accumulation of conjugated ubiquitin in endometriosis and depends on the presence of pain syndrome. Further development of promising areas for the treatment of endometriosis and pain syndrome can be based on therapy with ubiquitin ligase inhibitors in various designs.

Keywords: endometriosis, pain, eutopic and ectopic endometrium, ubiquitin ligase, conjugated ubiquitin, protein degradation

■ ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз – хроническое заболевание, связанное с воспалением микроокружения в эутопическом и эктопическом эндометрии, которое имеет некоторое сходство со злокачественными опухолями, включая прикрепление (эктопический эндометрий) и инфильтрацию (инфильтративная форма эндометриоза) [1]. Одними из основных клинических симптомов при эндометриозе являются нарушения менструального цикла, хроническая тазовая боль и бесплодие, однако не установлены патогенетические механизмы реализации этих осложнений. Ретроградные менструации наблюдаются у большинства женщин, но лишь у некоторых из них развивается эндометриоз. Влияние эстрогенов и толерантность к прогестерону, иммунная дисфункция, ангиогенез и нейрогенез считаются важными этапами в развитии эндометриоза [2]. Эктопические очаги эндометрия на брюшине способствуют раннему проявлению ангиогенеза и приводят к активизации воспаления микроокружения [1].

Несмотря на наличие эктопического эндометрия на брюшине, приводящего к быстрому рекрутированию нейтрофилов и его инфильтрации, раннему ангиогенезу, воспалению микроокружения, нельзя сделать вывод о том, что эти процессы формируют и устанавливают прогрессирование эндометриоза [3].

До настоящего времени патогенез эндометриоза и методы его лечения находятся в области научных исследований [4]. Новой таргетной целью для перспективных терапевтических воздействий при эндометриозе могут быть изменения в протеосомальном пути деградации белков в эутопическом/эктопическом эндометрии и

в перитонеальной жидкости. Так, показано увеличение содержания неконъюгированного убиквитина за счет повышения активности деубиквитиназы в ткани эутопического и эктопического эндометрия при эндометриозе и наличии боли по данным исследований с использованием вестерн-блоттинга [5]. В то же время роль увеличения конъюгированного с белками убиквитина не установлена и может быть связана с активностью фермента убиквитинлигазы (RBX1 E3 ubiquitin ligase) [6].

Убиквитин (Ubq) представляет собой белок из 76 аминокислот и конъюгирован с остатками лизина разнообразных клеточных белков, является одним из наиболее распространенных посттрансляционных модификаторов, играющих заметную роль в регуляции множества важных клеточных функций. В Ubq-протеасомной системе (UPS) Ubq модифицирует белковые субстраты в основном в форме полиубиквитиновой цепи, связанной с Lys-48 или Lys-11, которая служит сигналом для протеасомальной деградации [7]. Модификация белка под действием Ubq, или убиквитинирование, катализируется тремя ферментами каскада, состоящего из фермента, активирующего убиквитин E1, фермента, конъюгирующего убиквитин E2, и E3Ubq-протеинлигазы [8]. Лигаза E3 являются критическими компонентами этого каскада из-за их строгого контроля эффективности и субстратной специфичности реакции убиквитинирования. Для использования функционального убиквитинирования белков эукариотические клетки развили сотни убиквитиновых лигаз, состоящих из небольшого числа основных каталитических ядер и большого разнообразия модулей рекрутирования субстрата и регуляторных элементов. Уникальные свойства этих убиквитинлигаз позволяют им работать в разных клеточных контекстах, реагировать на разные клеточные сигналы и обрабатывать разнообразные белковые субстраты. Лигаза Ubq представляют собой наиболее детерминированный компонент субстратной специфичности убиквитинирования белков. Любая неспособность своевременно перехватить конкретный белок для деградации может привести к нарушению работы основного клеточного пути. Рассмотрение разнообразных механизмов распознавания субстрата E3s позволило установить, как убиквитинирование белков помогает управлять различными клеточными функциями [9].

Функция лигаз E3 играет ключевую роль в прогрессировании онкологических заболеваний, поскольку лигазы E3 могут непосредственно связываться с субстратами и определяют специфичность системы убиквитина. По разнице конструкции и функции лигазы E3 могут быть разделены на четыре типа: тип NECT E3 ligases, тип U-box E3 ligases, тип RING-finger E3 ligases и тип RBR E3 ligases. Интересно, что разные типы E3 лигазы имеют низкую гомологию последовательностей и большие различия по составу. Многофункциональность лигаз E3 позволяет им участвовать в регуляции пролиферации, инвазии, апоптоза, репарации повреждений ДНК, иммунозависимых реакциях и метаболизме [10].

Исследований, связанных с одновременным изучением активации убиквитинлигазы и конъюгированного убиквитина (cUbq) у пациентов с эндометриозом, бесплодием и болью по данным метода вестерн-блоттинга, количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, иммуногистохимического анализа в эутопическом и эктопическом эндометрии, иммуноферментного анализа в крови и перитонеальной жидкости, в доступной научной литературе не установлено.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить взаимосвязь и сопоставить данные о наличии хронической тазовой боли и бесплодия у пациентов с перитонеальной формой эндометриоза и накоплением конъюгированного с белком убиквитина за счет активации убиквитинлигазы в эутопическом и эктопическом эндометрии для обоснования выбора нового направления таргетной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основную группу были рекрутированы 73 пациента в возрасте 27–37 лет с перитонеальной формой эндометриоза I–III стадии согласно классификации Американского общества репродуктивной медицины (rASRM), подтвержденного во время проведения лапароскопии, хронической тазовой болью и бесплодием, как это описано нами ранее [1, 5]. Тщательное клинико-лабораторное обследование пациентов позволило распределить их на две группы: без клинических проявлений хронической тазовой боли (36 пациентов) и с клиническими проявлениями хронической тазовой боли (37 пациентов) – методом подбора пар.

Контрольная группа – 27 пациенток без нарушения репродуктивной функции, которым произведена стерилизация с использованием лапароскопического доступа. Эндометриоз у пациенток этой группы исключали после тщательного исследования висцеральной и париетальной брюшины на наличие гетеротопических эндометриодных очагов, как это описано ранее [1].

Дизайн исследования: на основании решения регионального этического комитета проведено ретроспективное одномоментное исследование. Информированное согласие на использование крови, перитонеальной жидкости и ткани эндометрия получено у всех пациенток, как и на участие в исследовании. Клиническая характеристика пациентов и дизайн исследования были представлены нами ранее [11].

Характеристика образцов ткани, сыворотки крови и перитонеальной жидкости. Образцы эутопического и эктопического эндометрия, перитонеальной жидкости получены во время лапароскопии, как это описано нами ранее [1]. Верификацию гистологических диагнозов в эутопическом и эктопическом эндометрии осуществляли в Академической больнице г. Уппсала, Швеция. Все экспериментальные исследования проведены совместно с Department of Women's and Children's Health, Uppsala University, Uppsala, Sweden, на территории Rudbeck laboratory, Uppsala, Sweden, и в тесном контакте с The Human Protein Atlas и Atlas Antibody Uppsala, Sweden.

Обозначения обследованных групп для исследования тканей: ЭУК/Б– – эутопический эндометрий, контрольная группа, без боли; ЭУЭ/Б– – эутопический эндометрий, эндометриоз, без боли; ЭУЭ/Б+ – эутопический эндометрий, эндометриоз, с болью; ЭКЭ/Б– – эктопический эндометрий, эндометриоз, без боли; ЭКЭ/Б+ – эктопический эндометрий, эндометриоз, с болью, а для исследования крови и перитонеальной жидкости: К/Б– – контрольная группа, без боли, Э/Б– – эндометриоз, без боли, Э/Б+ – эндометриоз, с болью.

Вестерн-блоттинг анализ (Western blotting, WB) для RBX1 и конъюгированного убиквитина (cUbq). Проведение вестерн-блоттинг анализа осуществляли, как это описано нами ранее, в рамках стандартного протокола и с учетом молекулярной характеристики RBX1 и cUbq [1]. Для убиквитинлигазы антитела к RBX1 кроличьи поликлональные, аффинно очищенные, anti-RBX1 HPA003038, Sigma. Антитела

рекомендованы в качестве первичных антител Human Protein Atlas и Atlas Antibody. Учитывали белок RBX1 с молекулярной массой 15 kDa. Для actin β (C4) – мышинные моноклональные антитела (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). Для контроля лизат A549 whole cell lysate ab 7910 AbCam. Для идентификации Ubq использовали антитела к человеческому Ubq, антиген аффинно очищенный, поликлональный кроличий IgG, A-100 (R&D, Boston Biochem), для actin β (C4) мышинные моноклональные антитела (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). В качестве контроля использовали лизат клеточной линии A549 эпителиальной аденокарциномы легких человека (Cell line: A549, human lung adenocarcinoma epithelial, lysate A549 whole cell lysate ab 7910, Ab Cam) или Ubiquitin (h) 293T lysate sc-111402, представляющий собой лизат трансфицированного Ubq человека из 293T клеток (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Учитывали cUbq с молекулярной массой более 21 kDa.

Извлечение матричной РНК и проведение количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (Real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) для RBX1 и Ubq. Проведение количественной ПЦР в реальном времени осуществляли, как это описано нами ранее [1]. Использовались праймеры Thermo Fisher Scientific для: rbx1, Hs00360274_m1; Ubq Hs00704312_s1; человеческого β -актина, ACTB, 4326315E. Относительные изменения экспрессии генов анализированы методом 2- $\Delta\Delta T$.

Иммуногистохимический анализ (Immunohistochemistry, ИHC) экспрессии RBX1 и Ubq в эутопическом и эктопическом эндометрии. Проведение иммуногистохимического анализа осуществлялось, как это было описано нами ранее [1]. Для визуализации, клеточной идентификации и локализации RBX1 в рамках стандартного протокола использовали кроличьи поликлональные, аффинно очищенные антитела, anti-RBX1 HPA003038, Sigma. Антитела рекомендованы в качестве первичных антител Human Protein Atlas и Atlas Antibody. Визуализацию RBX1 осуществляли системой EnVision G/2 System/AP, Permanent Red (Dako, Agilent Technologies). Для убиквитина применяли первичные моноклональные мышинные антитела (anti Human Ubiquitin/Ubiquitin+1 Antibody, MAB701, R&D) с системой DAB (Dako, Agilent Technologies). В работе использовался микроскоп высокого разрешения Carl Zeiss microscopy, ZEISS Axio Observer z1 с программным обеспечением ZEN 3.0 (blue edition).

Анализ сыворотки крови и перитонеальной жидкости методом иммуноферментного анализа (ИФА). Анализ содержания RBX1 и Ubq в сыворотке крови и перитонеальной жидкости проводился с помощью ИФА и применения стандартных наборов: для RBX1 ELISA Kit CSB-EL019496HU (Wuhan USCN Business Co., Ltd., China); для Ubq ELISA Kit Ubiquitin, Human, ELISA Kit E01U0007 (Shanghai Blue Gene Biotech CO., LTD). Проведение реакции и расчет результатов осуществляли в стандартных условиях согласно рекомендациям производителя.

Статистический анализ. Для анализа и построения графиков применяли статистические компьютерные программы IBM SPSS Statistics 20 и GraphPad Prism 10. Для определения нормальности распределения использовали одновыборочный тест Колмогорова – Смирнова. Сравнение параметрических количественных данных в двух независимых группах по одному признаку осуществляли с применением t-критерия Стьюдента. Параметрические количественные данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$). В зависимости от конкретных

условий применялись: ANOVA, критерий Вилкоксона, U-критерий Манна – Уитни, критерий Краскела – Уоллиса. Значение $p < 0,05$ считалось показателем статистической значимости между группами [1].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание пациентов основной группы. Бесплодие, хронические тазовые боли, метроррагии, диспареуния установлены у всех обследованных. Эта информация была получена на основании анализа анамнестических и клинических данных, которые показали наличие характерных признаков эндометриоза и были подтверждены при лапароскопии. На брюшине наблюдались гетеротопии различной локализации. Хроническая тазовая боль статистически значимо установлена у пациентов с болью (0,0 vs 5,2 по шкале ВАШ). Клиническая характеристика пациентов соответствовала ранее представленным данным [1, 5].

Экспрессия RBX1 и cUbq по данным вестерн-блоттинг анализа. Как следует из приведенных данных рис. 1, экспрессия RBX1 была наименьшей в группе ЭУК/Б– и наибольшей в группе ЭКЭ/Б+, увеличившись в 301,6 раза. Этот колоссальный прирост RBX1 имел градиентное нарастание и характеризовался увеличением в группе ЭУЭ/Б– в 8 раз, в группе ЭУЭ/Б+ в 39,3 раза, в группе ЭКЭ/Б– в 75,3 раза.

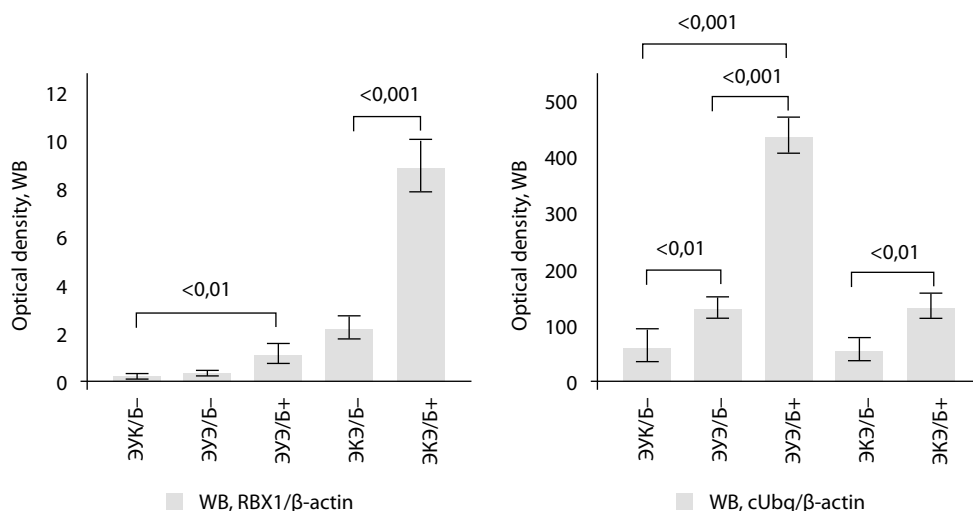


Рис. 1. Экспрессия белка убиквитинлигазы (RBX1) и конъюгированного убиквитина (cUbq) по данным вестерн-блоттинг анализа (WB) у женщин контрольной группы и у пациентов с эндометриозом в эутопическом и эктопическом эндометрии

Fig. 1. Protein expression of ubiquitin ligase (RBX1) and conjugated ubiquitin (cUbq) by Western blotting analysis (WB) in female controls and endometriosis patients in eutopic and ectopic endometrium

Примечания: данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, $M \pm SD$; различия определяли с помощью критерия Манна – Уитни. RBX1 – белок убиквитинлигазы с молекулярной массой 15 kDa, Ubq – конъюгированный с белком убиквитин с молекулярной массой более 21 kDa, ЭУК/Б– – эутопический эндометрий, контрольная группа, без боли; ЭУЭ/Б– – эутопический эндометрий, эндометриоз, без боли; ЭУЭ/Б+ – эутопический эндометрий, эндометриоз, с болью; ЭКЭ/Б– – эктопический эндометрий, эндометриоз, без боли; ЭКЭ/Б+ – эктопический эндометрий, эндометриоз, с болью; вестерн-блоттинг анализ (WB) – экспрессия белков, optical density – оптическая плотность.



Наиболее высокие значения RBX1 всегда наблюдались в группах пациентов с наличием боли. Если сравнивать только значения экспрессии RBX1 в эутопическом и эктопическом эндометрии, то она колебалась соответственно от 0,03–1,18 до 2,26–9,05 и была статистически значимо выше в эктопическом эндометрии. Конечно, эутопический и эктопический эндометрий не являются равнозначными, но удельная экспрессия белка RBX1 была всегда статистически значимо выше при эндометриозе с болью.

Конъюгированный Ubq с белками более 21 kDa был наименее значимо представлен в группе ЭУК/Б– и в группе ЭКЭ/Б–, соответственно $63,2 \pm 28,4$ и $56,9 \pm 22,4$. Наиболее высокие цифры получены для группы ЭУЭ/Б+ ($439,3 \pm 35,9$). Следовательно, значения cUbq более 21 kDa в эутопическом эндометрии колебались от $63,2 \pm 28,4$ до $439,3 \pm 35,9$, а в эктопическом эндометрии – от $56,9 \pm 22,4$ до $133,1 \pm 22,8$. Указанные данные свидетельствуют о более активном накоплении конъюгированного с белками убиквитина в эутопическом эндометрии при наличии боли, а также о снижении этого показателя в эктопическом эндометрии.

Экспрессия гена *rbx1* и *ubq* по данным количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Как следует из приведенных данных рис. 2, наименьшая экспрессия гена *rbx1* и гена *ubq* наблюдается в контрольной группе (ЭУК/Б–), а наибольшая активность – в эктопическом эндометрии и наличии боли (ЭКЭ/Б+). Если экспрессия гена *rbx1* в группе ЭУК/Б– составила 0,00015, то в группе ЭКЭ/Б+ 0,00043, что выше в 2,8 раза.

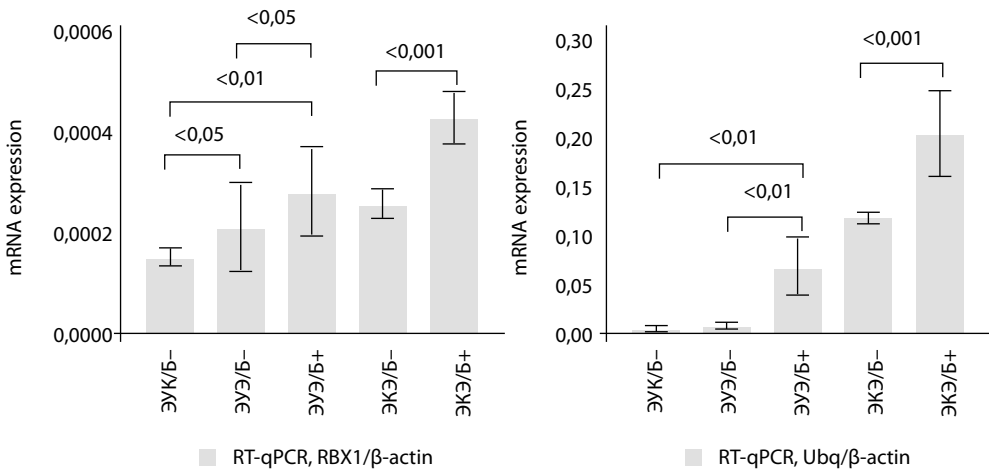


Рис. 2. Экспрессия гена убиквитинлигазы (*rbx1*) и гена убиквитина (*ubq*) по данным количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени у женщин контрольной группы и у пациентов с эндометриозом в эутопическом и эктопическом эндометрии
Fig. 2. Expression of the ubiquitin ligase (*rbx1*) gene and the ubiquitin (*ubq*) gene according to real-time quantitative polymerase chain reaction in women of the control group and in patients with endometriosis in eutopic and ectopic endometrium

Примечания: данные представлены в соответствии с рис. 1. RT-qPCR (mRNA expression) – экспрессия мРНК по данным количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Следует отметить, что увеличение экспрессии гена *rbx1* в 2,8 раза вызывало повышение экспрессии белка RBX1 в 143,3 раза по данным вестерн-блоттинга. Несоответствие в цифровых значениях объясняется значимостью генетической регуляции в необходимом балансе между убиквитинлигазой и убиквитинированием белков. Эта особенность подтверждается экспрессией гена убиквитина в группе ЭУК/Б– по отношению к группе ЭКЭ/Б+. В группе ЭКЭ/Б+ активность гена *ubq* была повышена в 30,3 раза, а синтез белка Ubq по данным вестерн-блоттинга увеличен в 2,1 раза. Следовательно, в группе ЭКЭ/Б+ по отношению к группе ЭУК/Б– наблюдается увеличение экспрессии гена *rbx1* в 2,8 раза, а белка RBX1 – в 143,3 раза, в то время как увеличение активности гена *ubq* в 30,3 раза приводит к повышению экспрессии белка Ubq только в 2,1 раза. Этот удивительный механизм регуляции между активностью гена и экспрессией белка в обратной зависимости позволяет не только регулировать и обеспечивать протеосомальную деградацию белков, но и стабилизировать эффективность убиквитинирования.

Экспрессия RBX1 и Ubq по данным иммуногистохимического анализа в эпителии желез эутопического и эктопического эндометрия. Наибольшая экспрессия RBX1 и Ubq установлена в эпителии желез с локализацией активного окрашивания в ядрах клеток и умеренного окрашивания в цитоплазме, прилегающей к ядрам. Из приведенных результатов рис. 3 следует, что наименьшая экспрессия RBX1 отмечалась в группе ЭУК/Б–, а наибольшая – в группе ЭУЭ/Б+ эутопического эндометрия.

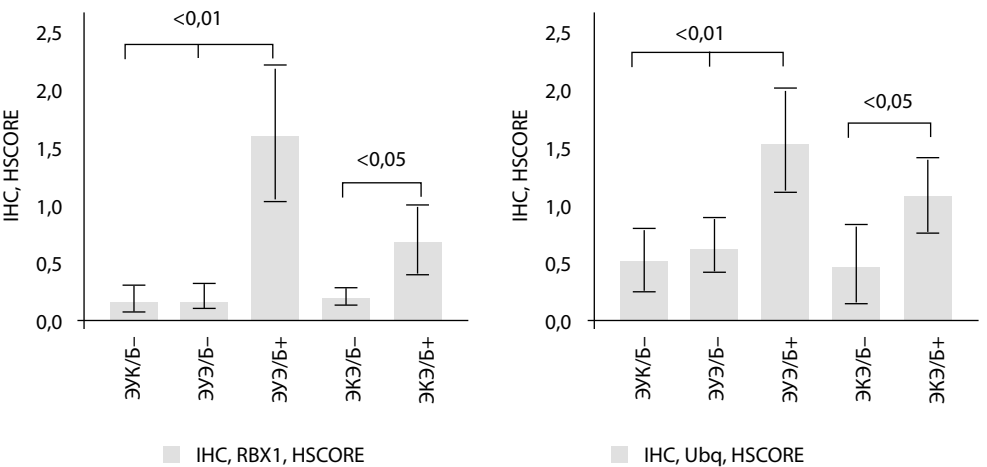


Рис. 3. Экспрессия убиквитинлигазы (RBX1) и убиквитина (Ubq) у женщин контрольной группы и у пациентов с эндометриозом в эутопическом и эктопическом эндометрии по данным иммуногистохимического анализа (IHC)
Fig. 3. Expression of ubiquitin ligase (RBX1) and ubiquitin (Ubq) in women of the control group and in patients with endometriosis in eutopic and ectopic endometrium according to immunohistochemical analysis (IHC)

Примечания: данные представлены в соответствии с рис. 1. IHC – экспрессия белков по шкале HSCORE по данным иммуногистохимического анализа.

В эктопическом эндометрии эти значения соответственно $0,2 \pm 0,02$ и $0,7 \pm 0,3$ в группах ЭКЭ/Б– и ЭКЭ/Б+. Следовательно, наблюдалось увеличение экспрессии RBX1 в зависимости от наличия боли.

Экспрессия Ubq была наименьшей в группах ЭУК/Б– и ЭУЭ/Б– эутопического эндометрия и наибольшей в группе ЭУЭ/Б+. В эктопическом эндометрии увеличение экспрессии установлено в группе ЭКЭ/Б+. Следовательно, в случае наличия боли в эутопическом и эктопическом эндометрии отмечается статистически значимое увеличение экспрессии убиквитина при наличии боли.

Учитывая иммуногистохимическую локализацию RBX1 и убиквитина, необходимо отметить сочетанное участие этих активностей на территории ядра и цитоплазмы. Такая активность позволяет устанавливать высокую эффективность убиквитинирования как в ядре, так и в цитоплазме в контрольной группе и низкую при эндометриозе и наличии боли. Низкий уровень убиквитинирования в ядрах эпителия желез эктопического эндометрия может оказывать воздействие на стабильность экспрессии генов, репарацию ДНК и в целом на стабильность генома.

Содержание RBX1 и Ubq в крови и в перитонеальной жидкости по данным иммуноферментного анализа (ИФА). Как следует из приведенных данных рис. 4, наименьшее содержание RBX1 наблюдалось в группе К/Б– как в крови, так и в перитонеальной жидкости.

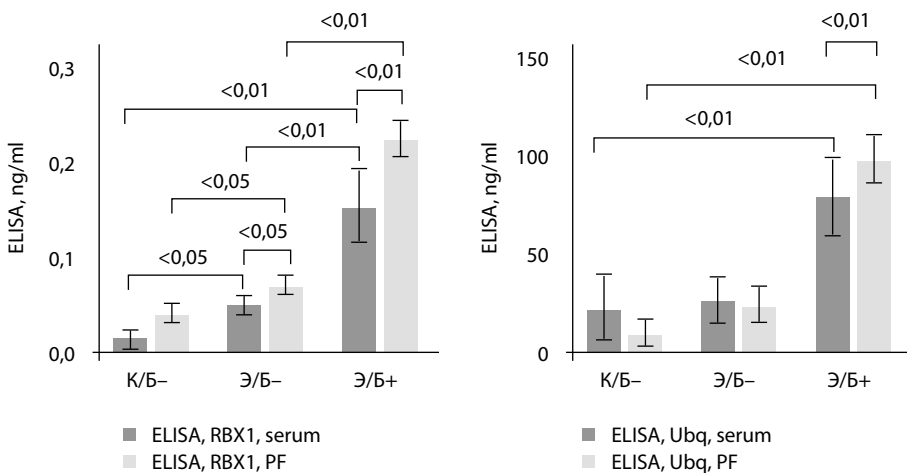


Рис. 4. Содержание убиквитинлигазы (RBX1) и убиквитина (Ubq) у женщин контрольной группы и у пациентов с эндометриозом в крови (serum) и в перитонеальной жидкости (PF) по данным иммуноферментного анализа (ELISA)

Fig. 4. The content of ubiquitin ligase (RBX1) and ubiquitin (Ubq) in women in the control group and in patients with endometriosis in the blood (serum) and peritoneal fluid (PF) according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) data

Примечания: данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения, $M \pm SD$; различия определяли с помощью критерия Манна – Уитни. RBX1 – белок убиквитинлигазы, Ubq – белок убиквитина, К/Б– – контрольная группа, без боли, Э/Б– – эндометриоз, без боли, Э/Б+ – эндометриоз, с болью; serum – сыворотка крови, PF – перитонеальная жидкость, ELISA – иммуноферментный анализ, нг/мл.

Установленные уровни RBX1 в крови и в перитонеальной жидкости носят абсолютно низкие значения – соответственно $0,015 \pm 0,08$ и $0,042 \pm 0,03$ нг/мл. Определение таких низких концентраций белка RBX1 потребовало использования микроварианта иммуоферментного анализа. Содержание RBX1 в группе Э/Б– в крови и в перитонеальной жидкости не выявило статистических различий. Наиболее высокие значения содержания RBX1 установлены в группе Э/Б+ в перитонеальной жидкости и статистически значимо выше, чем в крови.

Распределение концентрации Ubq в крови и перитонеальной жидкости показало статистически значимые максимальные значения в перитонеальной жидкости в группе ЭБ/+ по отношению к крови. Минимальные значения установлены для группы КБ/–. Следовательно, для группы ЭБ/+ характерно увеличение содержания RBX1 и Ubq в крови и перитонеальной жидкости. Накопление RBX1 и Ubq на системном уровне (кровь и перитонеальная жидкость) при эндометриозе и болевом синдроме свидетельствует о повреждениях, связанных с изменением убиквитинирования белков и их деградации в протеосомах не только в тканях (эутопический и эктопический эндометрий), но и в системе крови.

Первоначальные повреждения клеток эндометрия при эндометриозе представлены за счет оксидативного стресса, нитрозативного стресса, воспаления микроокружения, нейрогенного воспаления, эстрогенного воспаления, redox signaling, инверсии ядерных рецепторов к эстрогенам и прогестерону, нарушений протеостаза [2]. Указанные факторы влияют на повышение экспрессии RBX1 и cUbq в эпителии желез эутопического и эктопического эндометрия при эндометриозе и боли и увеличивают содержание продуктов деградированных белков. Это приводит к накоплению внутриклеточных агрегатов белков, активизирует нейродегенерацию и индуцирует боль.

Рассматривая новые данные об ингибиторах каскада убиквитинирующих ферментов в качестве потенциальных терапевтических целей (E1, E2 и E3), следует указать на наличие ингибиторов или модуляторов E3, а также применение их для лечения рака. Разработка эффективных фармакологических ингибиторов мультидоменных каркасных белков, особенно факторов транскрипции, является особенно сложной задачей. Отчасти это связано с тем, что многие низкомолекулярные антагонисты нарушают активность только одного домена в целевом белке [12]. Представленные данные имеют наибольшее значение не только для доказательства установленных нарушений, но и прежде всего для обоснования нового направления таргетного лечения эндометриоза на основе ингибиторов убиквитинлигаз. Потеря эффективности убиквитин-протеосомальной системы деградации белков при эндометриозе позволяет активировать боль (но не допускать малигнизации ткани) и обеспечить успешную защиту от проявления канцерогенеза. Являясь многофакторным патологическим состоянием, эндометриоз нуждается в дополнительных исследованиях, чтобы установить наиболее важный фактор, вовлеченный в прогрессирование заболевания [13].

Так, например, в отличие от традиционных ингибиторов, комбинированная молекула выборочного протеолиза белка (PROTAC, proteolysis targeting chimera) имеет каталитический механизм и рециркулируется после деградации его целевого белка. Эффективность деградации PROTAC достигается за счет «захвата» клеточной убиквитин-протеасомной системы и объединения целевого белка и лигазы E3. Вначале

лигаза E1 активирует и конъюгирует убиквитин с лигазой E2. Затем лигаза E2 образует комплекс с лигазой E3. Лигаза E3 ковалентно связывает убиквитин с интересующим белком. После образования цепи убиквитина белок распознается и расщепляется протеасомами 26S. PROTAC используют для преимущества этой клеточной системы, помещая интересующий белок в непосредственной близости от лигазы E3 для катализа деградации. Сейчас представляется возможным удалить из клетки мутантные белки, приводящие к опухолевому росту, нейродегенерации, метаболическим искажениям [14].

Присоединение конкурентного антагониста bromодоменов BET к фталимидному фрагменту позволило захватить комплекс убиквитинлигазы цереблona E3. Полученное соединение dBET1 индуцировало высокоселективную церебрoneзависимую деградацию белка BET *in vitro* и *in vivo*, что замедляло прогрессирование лейкемии у мышей. Эта химическая стратегия контроля стабильности белка-мишени позволила авторам предложить ее для терапевтического воздействия на белки, ранее трудно поддающиеся воздействию [15].

Еще один полезный подход к нацеливанию на каскадные ферменты в процессе убиквитинирования – лекарственные перепрофилированные препараты [16]. Перепрофилирование, достигнутое с помощью высокопроизводительной системы оценки, могло потенциально создавать соединение с желаемым биологическим или клиническим эффектом. Это может достигаться за счет создания новых целей в качестве модуляторов E3. Соединения-кандидаты могли иметь значительно меньшую непредсказуемую токсичность для здоровых клеток и меньшие затраты на разработку. По сути, база данных одобренных лекарств может предоставить проверенную библиотеку привилегированных строительных компaундов на основе имеющихся фармакокинетической и токсикологической оценок.

В настоящее время нельзя исключить роль хирургического лечения эндометриоза, как это было показано для активности ангиогенеза [17]. Следовательно, без хирургического удаления эктопических очагов эндометриоза в них может продолжаться усиление активации убиквитинлигазы и, как следствие, накопление cUbq и RBX1 в организме. Поэтому хирургическое удаление эндометриальных гетеротопий можно рассматривать как альтернативный вариант профилактики доброкачественных опухолей и опухолевидных образований яичников и рака. В то же время рецидивирование и активизация эндометриоза после хирургического лечения могут способствовать дальнейшему накоплению RBX1 и cUbq, что создает порочный круг, и поэтому перспективной является разработка селективных ингибиторов убиквитинлигаз.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При перитонеальной форме эндометриоза, наличии хронической тазовой боли и бесплодия в эутопическом и эктопическом эндометрии наблюдается одновременное увеличение экспрессии RBX1 и cUbq. Аналогичные данные получены в крови и перитонеальной жидкости. Дальнейшее развитие перспективных направлений лечения эндометриоза и болевого синдрома может быть основано на терапии ингибиторами убиквитинлигаз в различных конструкциях. Необходимость реализации этих исследований связана с накоплением в научной литературе данных о положительном эффекте воздействия на примерах экспериментальных результатов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bourlev V., Moberg C., Ilyasova N., Davey E., Kunovac Kallak T., Olovsson M. Vasoactive intestinal peptide is upregulated in women with endometriosis and chronic pelvic pain. *Am J Reprod Immunol.* 2018;80(3):e12857. doi: 10.1111/aji.12857.
2. Burlev V., Ilyasova N. Accents of molecular markers expression profiling in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis. *Russian Journal of Human Reproduction.* 2018;24(5):82-94. (in Russian). Available at: <https://doi.org/10.17116/repro20182405182>
3. Wang X., Jia Y., Li D., Guo X., Zhou Z., Qi M., Wang G., Wang F. The Abundance and Function of Neutrophils in the Endometriosis Systemic and Pelvic Microenvironment. *Mediators Inflamm.* 2023;2023:1481489. doi: 10.1155/2023/1481489.
4. Chen L.H., Lo W.C., Huang H.Y., Wu H.M. A Lifelong Impact on Endometriosis: Pathophysiology and Pharmacological Treatment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7503. doi: 10.3390/ijms24087503.
5. Burlev V., Ilyasova N. Deubiquitinase and unconjugated ubiquitin activate microenvironment inflammation and pain in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis. *Russian Journal of Human Reproduction.* 2023;29(1):9-18. (in Russian) Available at: <https://doi.org/10.17116/repro2023290119>
6. Burlev V. Endometrial omix marker in patients with endometriosis and pelvic pain: conjugated ubiquitin. *Russian Journal of Human Reproduction.* 2022;28(3):25-35. (in Russian). Available at: <https://doi.org/10.17116/repro202228031253>
7. Herskho A., Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
8. Pickart C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.503.
9. Zheng N., Shabek N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:129-157. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014922.
10. Yang Q., Zhao J., Chen D., Wang Y. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed.* 2021;2(1):23. doi: 10.1186/s43556-021-00043-2.
11. Burlev V., Ilyasova N. Neuroangiogenesis in endometrium of women with endometriosis and chronic pelvic pain: high expression of vasoactive intestinal peptide. *Russian Journal of Human Reproduction.* 2017;23(4):87-97. Available at: <https://doi.org/10.17116/repro201723487-97>.
12. Li X., Elmira E., Rohondia S., Wang J., Liu J., Dou Q.P. A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018. *Expert Opin Ther Pat.* 2018;28(12):919-937. doi: 10.1080/13543776.2018.1549229.
13. Asghari S., Valizadeh A., Aghebati-Maleki L., Nouri M., Yousefi M. Endometriosis: Perspective, lights, and shadows of etiology. *Biomed Pharmacother.* 2018;106:163-174. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.109.
14. Békés M., Langley D.R., Crews C.M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(3):181-200. doi: 10.1038/s41573-021-00371-6.
15. Winter G.E., Buckley D.L., Paulk J., Roberts J.M., Souza A., Dhe-Paganon S., Bradner J.E. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science.* 2015;348(6241):1376-81. doi: 10.1126/science.aab1433.
16. Patel K., Ahmed Z.S., Huang X., Yang Q., Ekinci E., Neslund-Dudas C.M., Mitra B., Elnady F.A., Ahn Y.H., Yang H., Liu J., Dou Q.P. Discovering proteasomal deubiquitinating enzyme inhibitors for cancer therapy: lessons from rational design, nature and old drug reposition. *Future Med Chem.* 2018;10(17):2087-2108. doi: 10.4155/fmc-2018-0091.
17. Bourlev V., Ilyasova N., Adamyan L., Larsson A., Olovsson M. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril.* 2010;94(1):52-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.019.