

Ocena wpływu *in vitro* niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę w endometrium kobiet z zaburzonym rozrodem

Assessment of *in vitro* impact of low molecular weight heparin on expression of heparanase and heparin binding growth factors in the endometrium of women with impaired reproduction

Przemysław Wirstlein, Mateusz Mikołajczyk, Jana Skrzypczak

Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Wstęp: Heparyna wykazuje korzystne działanie w leczeniu nawracających poronień, a także wpływa na wzrost odsetka implantacji w programach zapłodnień *in vitro* u kobiet z zaburzeniami rozrodu, nie związanym z trombofilią. Liczne badania wskazują, że heparyna poprzez blokowanie enzymu heparanazy może wywierać wpływ na strukturę i funkcję macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i związane z nią czynniki wzrostu. Zaburzenia w remodelingu (ECM) są uznawane za potencjalną przyczynę zaburzeń implantacji i nawracających poronień. Celem tego badania jest ocena na modelu *in vitro* wpływu niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy (HPSE) oraz istotnych dla procesu implantacji i inwazji trofoblastu czynników związanych z siarczanem heparanu (HS): wiążącego heparynę nabłonkowego czynnika wzrostu (HB-EGF), czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF-A), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF2) w endometrium, w oknie implantacyjnym niekonceptyjnego cyklu u kobiet z nawracającymi poronieniami.

Metoda: Biopsje endometrium pozyskane od 10 pacjentek z dwoma lub więcej niewyjaśnionymi utratami ciąży posłużyły do skonstruowania kokultury komórek nabłonka gruczołowego i podścieliska. Model endometrium *in vitro* suplementowano hormonami steroidowymi i enoxaparyną sodu o stężeniu 5 µg/ml. Przy użyciu metody qPCR oceniono względny poziom transkrypcji HPSE, HB-EGF, VEGF-A, FGF2 w nabłonku gruczołowym i podścielisku. Metodą ELISA oceniono stężenie w/w czynników medium hodowlanych.

Wyniki: Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji HPSE, HB-EGF, VEGF-A, FGF2 w komórkach nabłonka gruczołowego i podścieliska oraz ich stężenia w medium w hodowlach poddanych działaniu hormonów steroidowych. Nie znaleziono natomiast wpływu suplementacji LMWH na poziom badanych czynników.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że znaczenie aktywności hydrolitycznej heparanazy w endometrium, w oknie implantacyjnym cyklu niekonceptyjnego może mieć funkcję drugorzędą i że, korzystne działanie heparyny u kobiet z zaburzonym rozrodem nie ma istotnego, bezpośredniego związku z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, katalizowaną przez heparanazę i uwalnianiem czynników wzrostu wiążących heparynę.

Słowa kluczowe: **heparyna / heparanaza / wiążące heparynę czynniki wzrostu / endometrium / zaburzenia rozrodu /**

Adres do korespondencji:

Przemysław Wirstlein
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej, Klinika Rozrodczości,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33, Polska
tel.: (+4861) 8419302, fax: (+4861)8419625
e-mail: abys@wp.pl

Otrzymano: 22.02.2014
Zaakceptowano do druku: 17.06.2014

Przemysław Wirstlein et al. Ocena wpływu *in vitro* niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę...

Abstract

Heparin has a beneficial effect in the treatment of recurrent miscarriages and positively affects implantation rates in the IVF procedure in women with reproductive disorders not associated with thrombophilia. Several studies have indicated that heparin, by blocking the enzymatic activity of heparanase, may affect the structure and function of the extracellular matrix (ECM) and related growth factors. Disturbances in the remodeling (ECM) are believed to be the potential cause of implantation disorders and recurrent miscarriages. Objectives: The aim of the study was the evaluation, on an *in vitro* model, of the effect of low molecular weight heparin (LMWH) on the expression of heparanase (HPSE) and, important for successful implantation and invasion of trophoblast, heparan sulfate (HS) - binding growth factors, i.e. heparin-binding epidermal growth factor-like (HB-EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF-A), fibroblast growth factor (FGF2) in the endometrium, during the implantation window in women with recurrent miscarriage.

Method: Biopsy samples, obtained from 10 patients with two or more unexplained miscarriages, were used to construct a co-culture of glandular epithelial cells and stroma. Endometrium *in vitro* model was supplemented with steroid hormones and enoxaparin 5ug/ml. Using the qPCR, we assessed relative levels of the HPSE, HB-EGF, VEGF-A and FGF2 transcripts in glandular epithelium and stroma in cell culture. Using ELISA, we measured concentrations of the mentioned above factors in culture medium.

Results: A statistically significant increase in the relative level of HPSE, HB-EGF, VEGF-A, FGF2 transcripts in the cells of the glandular epithelium and stroma ($p < 0.001$), as well as their increased concentration in the medium of cultures treated with steroid hormones ($p < 0.001$) were observed. However, we found no effect of LMWH supplementation on the level of the investigated factors.

Conclusions: Our results show that the importance of the HPSE hydrolytic activity in the endometrium, during the implantation window, may have a secondary function, and/or that beneficial effects of LMWH in women with impaired reproduction have no significant, direct connection with the, catalyzed by HPSE, reconstruction of the ECM and with release of heparin-binding growth factors.

Key words: **heparin / heparanase / heparin binding growth factors / endometrium / impaired reproduction /**

Wstęp

Implantacja i inwazja trofoblastu możliwa jest dzięki wystąpieniu specyficznych warunków w endometrium w okresie okna implantacyjnego. Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić, że uwarunkowania te obejmują szczególną równowagę immunologiczną w endometrium, a także obecność i biologiczną dostępność na powierzchni nabłonka i blastocysty specyficznych ligandów i ich receptorów [1, 2]. Prawidłowa implantacja, angiogeneza i inwazja trofoblastu możliwa jest także dzięki przemianom zachodzącym w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) endometrium [3]. Macierz zewnątrzkomórkowa stanowi nie tylko fundament strukturalny tkanki, ale jest także miejscem, w którym są deponowane i uwalniane istotne dla rozwoju blastocysty czynniki wzrostu takie jak: wiążący heparynę nabłonkowy czynnik wzrostu (HB-EGF), czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF-A) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF2). Wykazano, że związanie tych czynników z ECM skutkuje nie tylko wzrostem ich stężenia w tkance, ale także poprzez wiązanie ze składnikiem ECM - siarczanem heparanu (HS), prowadzi do modulacji ich biologicznej aktywności [4].

Za degradację siarczanu heparanu (HS) i uwalnianie związanych z nim czynników odpowiada heparanaza (HPSE) [5]. niewiele wiadomo na temat molekularnych podstaw oddziaływania heparanazy w procesie implantacji i inwazji trofoblastu u człowieka. Ekspresję HPSE wykazano w endometrium i łożysku u ssaków, w tym także u człowieka.

Wiele eksperymentów przeprowadzonych na modelu mysim pozwoliło wykazać istotną rolę HPSE w procesie implantacji

[6-8]. Heparanaza jest nie tylko białkiem enzymatycznym. Wykazano, że HPSE oddziałuje zarówno na drodze enzymatycznej jak i poprzez swoją domenę sygnałową na angiogenezę i wzrost guzów nowotworowych [9-11].

W badaniach nad fizjopatologią nowotworów wykazano, że poprzez strukturalne podobieństwo do siarczanu heparanu, heparyna i jej pochodne działają jako inhibitory heparanazy wywołując efekt biologiczny w postaci zahamowania wzrostu i angiogenezy w obrębie guzów nowotworowych, także poprzez zahamowanie *in vitro* ekspresji VEGF i HPSE [12].

Heparyna niefrakcjonowana (UFH) oraz jej niskocząsteczkowe frakcje (LMWH), jako antykoagulant jest powszechnie stosowana w leczeniu i profilaktyce przeciwzakrzepowej u ciężarnych z trombofilią. Dostępne wyniki badań wskazują też, że heparyna wykazuje korzystne działanie w leczeniu nawracających poronień, a także wpływa na wzrost odsetka implantacji w programach zapłodnień *in vitro* u kobiet z zaburzeniami rozrodu, nie związanymi z trombofilią [13, 14]. Przypuszczalnie za ten efekt odpowiadają przeciwważalne i immunomodulacyjne właściwości heparyny [15-17]. Z drugiej strony należy brać pod uwagę, że wyżej wspomniane, hamujący wpływ heparyn na ekspresję HPSE i VEGF oraz angiogenezę może upośledzać funkcję endometrium. Obecny stan wiedzy nie daje odpowiedzi na pytanie czy heparyny w endometrium blokują aktywność enzymatyczną heparanazy, i czy oddziaływanie heparyny z heparanazą w endometrium wyraża się obniżeniem stężenia uwolnionych z macierzy zewnątrzkomórkowej czynników wzrostu wiążących siarczan heparanu.

Przemysław Wirstlein et al. Ocena wpływu *in vitro* niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę...

Cel pracy

Celem tego badania jest ocena na modelu *in vitro* wpływu niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i istotnych dla procesu implantacji i inwazji trofoblastu czynników związanych z sianczaniem heparanu: wiążącego heparynę nabłonkowego czynnika wzrostu, czynnika wzrostu śródbłonka, czynnika wzrostu fibroblastów w endometrium, w oknie implantacyjnym niekonceptyjnego cyklu u kobiet z nawracającymi poronieniami. W celu oceny wpływu heparyny na enzymatyczną aktywność heparanazy zbadane zostanie stężenie w/w czynników w medium z kokultury gruczołowych struktur nabłonka endometrium i komórek podścieliska.

Materiał i Metoda

Pozyskanie materiału i założenie hodowli

Na przeprowadzenie badań według poniżej opisanej procedury uzyskano zgodę komisji bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Endometrium w okresie okna implantacyjnego niekonceptyjnego cyklu pozyskano pipellą od kobiet w wieku 23-37 lat, które wcześniej doświadczyły co najmniej dwóch poronień w pierwszym trymestrze ciąży. Część pozyskanego materiału została przekazana do badania histopatologicznego, z pozostałej części wyizolowano komórki nabłonka i podścieliska w celu założenia hodowli *in vitro*. Do eksperymentu zakwalifikowano materiał od dziesięciu kobiet u których potwierdzono dojrzałość histologiczną endometrium odpowiadającą w pełni wykształconej fazie wydzielniczej.

Izolację komórek nabłonkowych oraz komórek podścieliska przeprowadzono według założeń metody opisanej przez Laird i wsp., zmodyfikowanej przez Blauer i wsp. [18, 19]. Natychmiast po pobraniu fragmenty endometrium przeznaczone do założenia hodowli zostały wstępnie przepłukane w roztworze PBS i 0,1% albuminy (SigmaAldrich, USA) w celu usunięcia, ewentualnych skrzepów krwi i śluzu z tkanki, a następnie rozdrobione sterylnym ostrzem. Tak przygotowana zawiesina została oddzielona od roztworu płuczącego, poprzez wirowanie przez 1min, przy 50 x g. Następnie przeprowadzono trawienie enzymatyczne przy użyciu 10 ml medium do trawienia, składającego się z przygotowanego według wskazówek producenta roztworu kolagenazy I (1:10 v/v), w medium DMEM/F12, zawierającym 2% płodowej surowicy bydlęcej, oczyszczonej węglem aktywnym (FBS) oraz 1:100 Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma Aldrich, USA). Trawienie prowadzono na wytrząsarce orbitalnej 90 rpm/min przez 120 min (Biosan, Łotwa). Po tym czasie zawiesina komórek została przefiltrowana przez filtr 80 mm (Millipore, USA). Osad z filtra został odrzucony, a przesącz zawierający komórki nabłonka i podścieliska odwirowano przez 1min, przy 250 x g. Po odwirowaniu osad przepłukano trzykrotnie w medium bez kolagenazy. Przepłukany osad został sedymentacyjnie rozdzielony na frakcje komórek nabłonkowych i komórek podścieliska. Komórki nabłonkowe i małe struktury gruczołowe były zbierane z osadu na dnie 10 ml próbówki typu Falcon (Becton Dickinson, USA), po 5 min swobodnego opadania w medium, z kolei frakcja komórek podścieliska była zbierana z osadu po 30 min. Dla 5 ml zawiesiny frakcji komórek nabłonkowych procedurę sedymentacji powtórzono jeszcze dwukrotnie, natomiast we frakcji komórek podścieliska zhemolizowano pozostałe erytrocyty poprzez zawieszenie osadu w 1ml destylowanej wody przez 30 s, a następnie

stępnie dodanie 9 ml medium. Żywotność komórek podścieliska oceniona została na 78–85%, przy użyciu błękitu trypanu (Sigma Aldrich, USA).

Hodowla komórek nabłonkowych odbywała się na sztucznej błonie podstawnej, w insertach z porowatym dnem (Greiner, Niemcy), zapewniającym wymianę substancji pomiędzy frakcją nabłonkową i podścieliskiem. Błonę podstawną stanowił komercyjny żel ECM Gel - basement membrane matrix (Sigma Aldrich, USA), przygotowany zgodnie ze wskazówkami producenta. W skrócie, 50 ml schłodzonego uprzednio żelu podano do insertów z dnem o porach 8 mm, i pozostawiono do stężenia na 30 min w 37°C. Następnie na inserty podano 150 ml zawiesiny struktur nabłonkowych w nowej porcji schłodzonego żelu ECM. Po stężeniu na powierzchnię żelu podano 200 ml pożywki. Insety umieszczono w dołku 24 dołkowej płytki hodowlanej (Greiner, Niemcy). Komórki podścieliska hodowane były równolegle, w tym samym dołku naczynia w postaci monolayer'u na krążkach Thermanox (NUNC). Obie frakcje komórek w kokulturze pochodziły zawsze od tej samej pacjentki.

Hodowla była prowadzona w inkubatorze BB16 (Haereus, Niemcy), w 37°C, przy wilgotności 95%. Pożywka do hodowli składała się z pożywki DMEM/F12 Ham, 5% płodowej surowicy bydlęcej, oczyszczonej węglem aktywnym, suplementowaną insuliny i transferyną ITS (Sigma Aldrich, USA) oraz mieszaną antybiotykową Antibiotic Antimycotic Solution. Po 24 godzinach do hodowli dodawano hormony, tj. progesteron 50 nmol/l i 17- β -estradiol 50 nmol/l lub hormony i niskocząsteczkową heparynę (LMWH) – enoksyparynę sodu w stężeniu 5 mg/ml (Clextane, Sanofi Aventis) lub niskocząsteczkową heparynę bez dodatku hormonów. Jako kontrolę prowadzono równolegle hodowlę bez dodatku hormonów i heparyny. Hodowle suplementowano co 24 godziny, przez 3 dni. Po każdym dniu hodowli żywotność komórek weryfikowano za pomocą testu MTS/PMS (Promega, USA) opartego na metabolicznej bio redukcji przez dehydrogenazę mitochondrialną substratu – MTS, produktem jest barwny związek – formazan, którego stężenie mierzone na podstawie absorbancji ($\lambda = 490$ nm) było miarą żywotności komórek.

Po zakończeniu hodowli masę żelową z frakcją nabłonka i strukturami gruczołowymi oraz krążki thermanox z komórkami podścieliska umieszczono w płynie RNA Later (Qiagen, Niemcy) i zamrożono w -20°C do czasu izolacji mRNA. Media hodowlane do oznaczenia stężenia HPSE i HB-EGF, VEGF-A, FGF2 zostały również zabezpieczone w -20°C.

Izolacja mRNA i oznaczanie poziomu transkryptów HPSE i HB-EGF, VEGF-A-A, FGF2

Izolacja RNA została przeprowadzona przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta. Aby wyeliminować ryzyko zanieczyszczenia materiału pozostałościami DNA, w trakcie izolacji przeprowadzono dodatkowe trawienie DNA przy użyciu zestawu odczynników RNase-Free DNase Set (Qiagen, Niemcy). Po izolacji, za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific, USA), na podstawie pomiarów absorbancji określono ilość wyizolowanego RNA ($\lambda = 260$ nm), oraz jego czystość ($\lambda = 260/280$ nm).

Odwrotna transkrypcja i reakcja qPCR

Przy użyciu zestawu odczynników Quanti-Tect Reverse Transcription (Qiagen, Niemcy), z 1 μ g RNA zsyntetyzowano

Tabela 1. Sekwencje par starterów zastosowanych do oceny poziomu względnego poziomu transkrypcji, w reakcji qPCR.

Gen	FF	REV
HPSG	5'-ATCAATGGGTCGCAGTTAGG-3'	5'-AGGCTGACCATCAGGAC-3'
HB-EGF	5'-TGAGGTGGGTGGGATTATACA-3'	5'TTGGAGCTGACTGTTCTTGGT3'
VEGF-A	5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCA-3'	5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'
FGF2	5'-AGAAGAGCGACCCTCACATC-3'	5'-TTCTTCATAGCCAGGTAACG-3'
RPLP0	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'	5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3'

komplementarny DNA (cDNA). Jako matrycę w reakcji qPCR użyto do 30 ng wytworzonego cDNA. Poziom analizowanych transkryptów określono względem poziomu transkryptu genu o konstytutywnej ekspresji (house keeping gene) RPLP0, kodującego białko wchodzące w skład dużej podjednostki rybosomu.

Sekwencje swoistych par starterów dla badanych transkryptów HPSE, HB-EGF, VEGF-A, FGF2 zostały wyznaczone przy użyciu programu Primer3 [20], w oparciu o sekwencje RNA uzyskane z bazy danych NCBI Gene [21]. Sekwencję pary starterów komplementarnych do transkryptu RPLP0 uzyskano z bazy RT-PrimerDB [22]. Specyficzność wybranych par starterów została potwierdzona w bazie BLAST [23]. Specyficzność produktu reakcji qPCR, uzyskanego przy użyciu wybranych par starterów potwierdzono ostatecznie na 2% żelu agarozowym. Sekwencje par starterów użytych w reakcji qPCR przedstawiono w tabeli 1.

Reakcje qPCR przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu odczynników DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Thermoscientific, USA) i termocyklera Rotor - Gene 3000 thermocycler (Corbett Research, Australia). Profil termiczny reakcji opracowano według zaleceń producenta odczynników z uwzględnieniem temperatury przyłączania starterów specyficznej dla każdej pary. Do wyznaczenia poziomu transkryptów, dla każdego z produktów pochodzących od specyficznych par starterów, na podstawie sześciu kolejnych, 10-krotnych rozcieńczeń produktu qPCR, każdego z badanych czynników, opracowano krzywą stantardową, do której odnoszono wynik uzyskany w każdej z badanych prób. Dla każdej z badanych prób prowadzono zduplikowaną reakcję qPCR, w obecności kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej – bez matrycy cDNA. Względny poziom ekspresji wyrażono stosunkiem poziomu cDNA badanych transkryptów HPSE, HB-EGF, VEGF-A oraz FGF-2 do poziomu cDNA referencyjnego transkryptu RPLP0.

Ocena stężenia heparanazy i czynników wzrostu w medium hodowlanym

Ocenę stężenia badanych czynników przeprowadzono w połączonym medium z hodowli nabłonka i struktur gruczołowych oraz podścieliska. Wyznaczenie stężenia wszystkich badanych czynników przeprowadzono metodą immunoenzymatyczną, przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników ELISA. Stężenie HPSE wyznaczono zestawem USCN (Wuhan, Chiny). Do oceny stężenia HB-EGF użyto zestaw Sigma Aldrich (USA). Stężenie VEGF-A i FGF2 oznaczono przy użyciu odczynników R&D Systems (USA). Wszystkie oznaczenia zostały przeprowadzone w duplikacji, zgodnie z instrukcjami producentów, przy użyciu czytnika MRX, (Dy nex Technologies, USA).

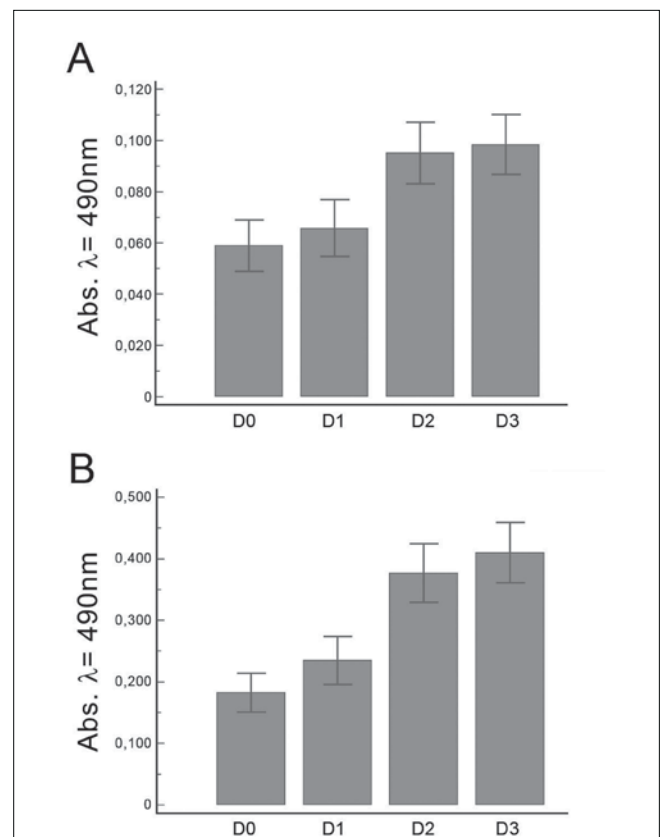
Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników użyto programu SigmaStat 3.5. Analizowano normalność rozkładu badanych zmiennych oraz porównano ich rozkład przy użyciu rangowego testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) Kruskala-Wallisa. Za statystycznie zmienną przyjęto wartość $p < 0,05$.

Wyniki

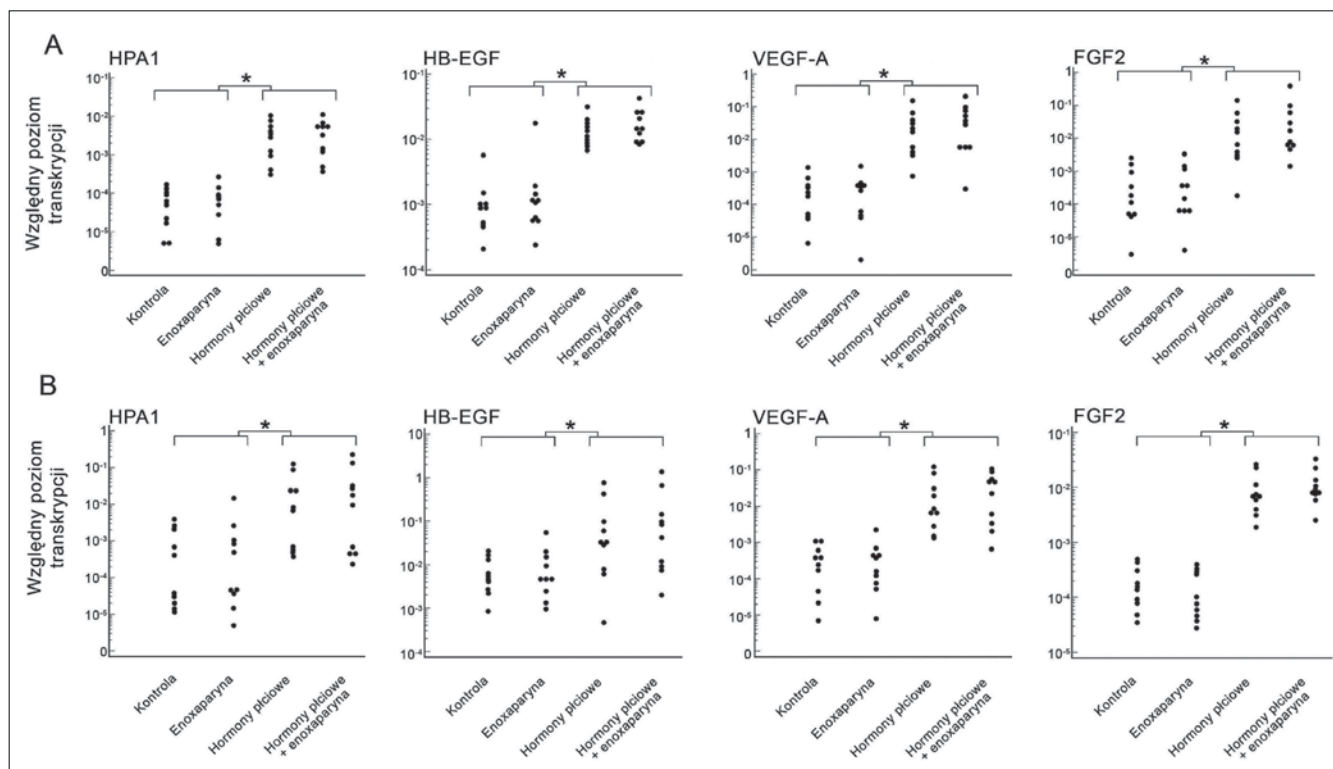
Wzrost komórek w kokulturze

Na podstawie testu MTS potwierdzono aktywność metaboliczną, świadczącą o proliferacji komórek zarówno frakcji nabłonkowej, jak i w podścielisku. Zaobserwowano wzrost stężenia barwnego produktu, świadczącego o aktywności biologicznej komórek przedstawiono na rycinie 1.



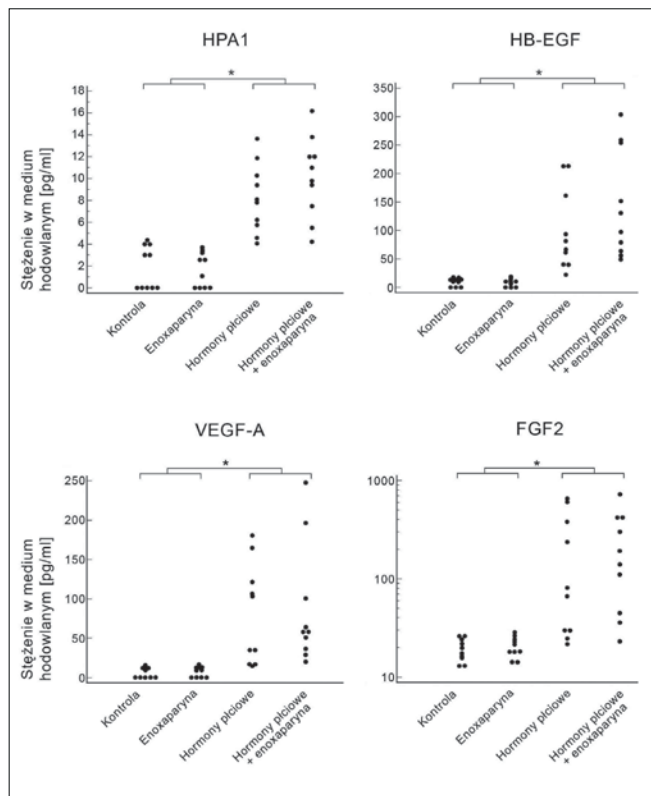
Rycina 1. Ocena żywności komórek nabłonka i gruczołów (A) i komórek podścieliska (B) w teście metabolicznej redukcji MTS. Zaobserwowano wzrost absorbancji ($\lambda = 490\text{nm}$) w hodowlach z kolejnych dni eksperymentu (D0-D3) świadczący o proliferacji komórek.

Przemysław Wirstlein et al. Ocena wpływu *in vitro* niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę...



Rycina 2. Względny poziom transkryptów HPSE, HB – EGF, VEGF-A oraz FGF2 w kokulturze komórek nabłonka i gruczołów (A) i komórek podścieliska (B), pozyskanych od kobiet z dwoma lub więcej kolejnymi utratami ciąży. Ilość cDNA odpowiadająca poziomowi ekspresji poszczególnych transkryptów została znormalizowana w stosunku do transkryptu genu o konstytutywnej ekspresji RPLP0.

*Wartość $p < 0,001$ wyznaczono przy użyciu rangowego testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) Kruskala-Wallis z testem wielokrotnych porównań.



Rycina 3. Stężenie HPSE, HB-EGF, VEGF-A oraz FGF2 w medium hodowlanym komórek endometrium z dodatkiem hormonów i niskocząsteczkowej heparyny. Jako kontrolę prowadzono hodowlę bez hormonów.

*Wartość $p < 0,001$ wyznaczony przy użyciu rangowego testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) Kruskala-Wallis z testem wielokrotnych porównań.

Poziom transkryptów HPSE i HB-EGF, VEGF-A, FGF2

Znaleziono obecność transkryptów badanych czynników w strukturach gruczołowych i podścielisku. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost względnego poziomu transkrypcji HPSE, HB-EGF, VEGF oraz FGF2 w hodowlach suplementowanych hormonami w stosunku do względnego poziomu transkrypcji tych czynników w hodowlach bez hormonów, tj. hodowli kontrolnej oraz hodowli z dodatkiem jedynie heparyny ($p < 0,001$).

Nie zaobserwowano natomiast istotnej statystycznie zmiany ekspresji HPSE, ani czynników wzrostu wiążących heparynę w hodowlach suplementowanych jedynie heparyną w stosunku do hodowli kontrolnej. Suplementacja heparyną nie miała także wpływu na poziom transkrypcji badanych czynników w hodowlach z dodatkiem hormonów. Uzyskane wyniki wskazują, że hormony płciowe stymulują *in vitro* ekspresję badanych czynników. Rozkład uzyskanych wyników oceny względnego poziomu transkryptów przedstawiono na rycinie 2.

Stężenie HPSE, HB-EGF, VEGF-A, FGF2 w medium hodowlanym

Aby stwierdzić czy heparyna może mieć wpływ na katalizowane przez heparanazę uwalnianie czynników wzrostu wiążących heparynę zmierzono stężenie tych czynników w medium hodowlanym. Wyniki przedstawiono na rycinie 3.

W medium pochodzącym z hodowli suplementowanych hormonami steroidowymi, po 3 dniach hodowli zaobserwowano wzrost stężenia badanych czynników ($p < 0,001$). Jednakże podobnie, jak w przypadku oceny poziomu transkryptów, suplementacja heparyną nie wykazała statystycznie istotnego wpływu na stężenie badanych czynników.

Dyskusja

Heparyny zarówno niefrakcjonowane jak i drobnocząsteczkowe znalazły zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń związanych z zaburzoną krzepiwością krwi. Profilaktyczne dawki heparyny drobnocząsteczkowej stosuje się także u ciężarnych z trombofilią. Wielokrotnie wykazano jednak, że heparyny mogą być skuteczne w terapii niezwiązanych z trombofilią nawracających poronień i niepłodności uwarunkowanej nieprawidłową implantacją zarodka [13, 14].

Szereg opublikowanych wyników badań wskazuje, że heparyna może być efektywnym immunomodulatorem. Jak wykazali Spratte i wsp. w badaniach *in vitro*, niefrakcjonowana heparyna może wpływać na stosunek cytokin Th1/Th2 w podścielisku, poprzez hamowanie ekspresji całego wachlarza cytokin stymulowanych przez TNF α , w tym prozapalnych IL6 i IL8 [24].

Fluhr i wsp. wykazali, że heparyny modulują zmiany doczesnowe w podścielisku, przez stymulację ekspresji prolaktyny (PRL), białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGFBP-1) i 3',5'-cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP), oraz hamowanie ekspresji insulinozależnego czynnika wzrostu (IGF-1) [25]. Należy jednak zauważyć, że kierunek obserwowanych zmian, wywołanych przez heparynę w podścielisku, wydaje się być dyskusyjny, ponieważ Eyal i wsp. wykazali, że wzrost ekspresji PRL i towarzyszący mu spadek ekspresji IGFBP-1 autokrynnie hamują decydualizację endometrium [26]. Niewątpliwie jednak, badania Fluhr i wsp., jak i wcześniejsze badania innych zespołów dowiodły że, heparyna wpływa na indukcję sygnału w różnych typach komórek [27, 28].

W badaniach nad terapeutycznymi właściwościami heparyn wykazano, że ich skuteczność jest niezależna od właściwości antykoagulacyjnych. Znalezione, że zarówno niefrakcjonowana heparyna jak i różne postacie drobnocząsteczkowej heparyny stymulują proces decydualizacji fibroblastów podścieliska *in vitro*, a wielkość uzyskanego efektu jest zależna jedynie od masy cząsteczkowej zastosowanej postaci heparyny oraz wielkości ujemnego ładunku cząsteczki [29].

Wiele czynników wzrostu i cytokin posiada w swojej strukturze domeny wiążące składnik ECM - siarczan heparanu oraz zbliżone do niego strukturalnie heparyny. Związanie z cząsteczką HS nie tylko zwiększa powinowactwo tych czynników, ale także ma na celu zwiększenie ich koncentracji w pobliżu specyficznych receptorów [10, 30].

Fluhr i wsp. w kolejnej pracy *in vitro* wykazali, że heparyny w podścielisku mogą pełnić funkcję immunomodulatorów poprzez blokadę prozapalnej reakcji, której mediatorem jest INF γ . Zaproponowany tym razem mechanizm wyjaśniający uzyskane wyniki zakładał blokowanie przez heparyny domen wiążących HS w cząsteczce INF γ , co prowadziło do spadku dostępności mediatora dla receptorów na powierzchni fibroblastów [32]. Podobne zjawisko konkurencyjnego w stosunku do HS wiązania się heparyny jako inhibitora HPSE, zaproponowano już w badaniach nad wzrostem i waskularyzacją guzów nowotworowych [9, 31, 32].

W przeprowadzonym przez nas eksperymencie badaliśmy wpływ drobnocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy oraz potencjalny wpływ heparyny na uwalnianie do medium hodowlanego wiążących heparynę czynników wzrostu. W skonstruowanym modelu *in vitro* nie znaleźliśmy jednakże istotnego wpływu heparyny na profil ekspresji heparanazy.

Suplementacja heparyną nie miała także istotnego wpływu na stężenie uwolnionych do medium, wiążących heparynę czynników wzrostu. Obserwowany przez nas wpływ hormonów płciowych na ekspresję badanych czynników jest zgodny z innymi publikacjami, m.in. Yoo i wsp. [33].

Wyniki naszych wcześniejszych badań wykazały niższy poziom ekspresji HPSE w endometrium u kobiet z dwoma i więcej poronieniami [34]. W aktualnych badaniach *in vitro* potwierdziliśmy obecność transkrypty HPSE w nabłonku i podścielisku w endometrium. Wykazaliśmy także zdolność komórek podścieliska do sekrecji HPSE do medium hodowlanego.

Mechanizm oddziaływania heparyn na heparanazę zakłada działanie heparyny jako inhibitora heparanazy i tym samym jako czynnika hamującego wzrost i waskularyzację [12]. Obserwacje te stoją w sprzeczności z kierunkiem przemian obserwowanym w obrębie endometrium w momencie implantacji i w okresie wczesnej ciąży [35]. Nie pomijając działania heparyny jako immunomodulatora, należałoby się spodziewać jej negatywnego wpływu na remodeling endometrium jako inhibitora HPSE. Z kolei inne publikacje wskazują, że w endometrium heparanaza nie musi być istotnym enzymem, odpowiedzialnym za przebudowę ECM. Wykazano bowiem, że w endometrium heparanaza, niezależnie od katalizowania przemian w obrębie ECM może spełniać rolę cząsteczki adhezyjnej i/lub czynnika transkrypcyjnego [36]. Znany jest, że aktywność katalityczna heparanazy osiąga optymalny poziom przy pH 5,0, podczas gdy w jamie macicy pH jest znacznie wyższe i wynosi 6,6 do 7,6. W takim przedziale pH heparanaza ma znacznie niższą aktywność katalityczną, natomiast funkcjonuje jako białko adhezyjne [37]. Co więcej, Revel i wsp. wykazali, że w tych warunkach heparanaza korzystnie wpływa na odsetek implantacji mysich blastocyst [38].

Wcześniejsze badania wykazały, że czynniki wzrostu posiadające domenę wiążącą siarczan heparanu mogą odgrywać istotną rolę w procesach związanych z implantacją. Jednym z najważniejszych czynników zaliczanych do tej grupy jest wiążący heparynę nabłonkowy czynnik wzrostu. Wykazano, że w mysim endometrium synteza HB-EGF w komórkach nabłonka jest ściśle związana z miejscem implantacji blastocysty. W mysim endometrium HB-EGF jest deponowany w formie związanej z HS i stymuluje rozwój mysiej blastocysty poprzez zlokalizowane na jej powierzchni receptory dla nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR's) [39]. Także w nabłonku endometrium u ludzi obserwuje się ekspresję HB-EGF, której największe natężenie, według Yoo i wsp., przypada w czasie implantacji [33].

Z kolei wyniki uzyskane przez Chobotova i wsp. i Birdsall i wsp. wskazują, że w ludzkim endometrium HB-EGF jest syntetyzowany z różnym natężeniem w nabłonku i podścielisku, zarówno w fazie proliferacyjnej jak i sekrecyjnej. Zlokalizowanie w podścielisku receptorów dla HB-EGF sugeruje, że u człowieka czynnik ten odpowiada także za wzrost i receptywność endometrium [40, 41].

Nasze wcześniejsze badania wskazują, że w oknie implantacyjnym cyklu niekonceptyjnego, poziom ekspresji HB-EGF w endometrium, u kobiet z dwoma lub więcej poronieniami jest niższy w stosunku do kobiet zdrowych [35].

Obecnie potwierdziliśmy, że komórki nabłonków i podścieliska syntetyzują HB-EGF w odpowiedzi na działanie hormonów płciowych, nie zaobserwowaliśmy natomiast istotnej statystycznej zmiany ekspresji HB-EGF w hodowlach po podaniu heparyny.

Przemysław Wirstlein et al. Ocena wpływu *in vitro* niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę...

ny. Także stężenie HB-EGF w medium hodowlanym nie zmieniło się w istotny sposób pod wpływem heparyny. Jak zostało wcześniej wspomniane, wiązanie HS, ale też heparyny, jako ko-faktora wzmacnia aktywność biologiczną badanych czynników wzrostu, w tym HB-EGF. Nie możemy jednak powiedzieć, że niskocząsteczkowa heparyna moduluje ekspresję badanych przez nas czynników. Bardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza, że heparyna nie wpływa na zmianę ekspresji HB-EGF w endometrium, ale pośrednio, poprzez przyłączenie do domeny wiążącej HS moduluje oddziaływanie ligand-receptor.

Kolejnymi czynnikami, które braliśmy pod uwagę badając wpływ heparyny na endometrium były dobrze znane: czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF-A) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF2). Takahashi i wsp. zaobserwowali, że heparyna są w stanie zablokować syntezę VEGF-A w komórkach nowotworowych, a w konsekwencji także wzrost guzów nowotworowych. Nieoczekiwanie jednak w eksperymentach przeprowadzonych na modelach komórek niezmiennych nowotworowo wykazano proangiogenne działanie heparyny drobnocząsteczkowej [12, 28]. W naszym badaniu, podobnie jak w przypadku HB-EGF nie zaobserwowaliśmy zmian w poziomie transkrypcji obu tych czynników pod wpływem drobnocząsteczkowej heparyny ani w komórkach nabłonka, ani w podścielisku. Podobnie wyniki uzyskane przez Xu i wsp. wskazują na przykładzie FGF2, że ani heparanaza, ani heparyna nie wpływają bezpośrednio na ekspresję czynników wzrostu *in vitro*. Natomiast poprzez wzajemne oddziaływanie enzym-inhibitor są one w stanie modulować wiązanie się czynników wzrostu do receptorów i w ten sposób wywierać biologiczny efekt [42].

Opublikowane wyniki badań wskazują, że o ile w heparanaza stymuluje angiogenezę poprzez enzymatyczny udział w przebudowie ECM, o tyle może wywierać działanie antyproliferacyjne poprzez usuwanie HS z powierzchni komórek na których obecne są także receptory dla czynników wzrostu. Heparyna w tym przypadku, jako inhibitor heparanazy ma wywierać dokładnie odwrotny efekt, tzn. blokować tworzenie się naczyń, oraz stymulować aktywność mitotyczną komórek poprzez zwiększenie podaży czynników wzrostu przyłączonych do HS w pobliżu receptorów [43]. W związku z tym korzystne oddziaływanie heparyny w endometrium mogłoby się przejawiać przywróceniem odpowiedniej równowagi pomiędzy oddziaływaniem angiogennym, a antyproliferacyjnym. Jednakże, w naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy statystycznie istotnego wpływu heparyny na stężenie VEGF-A i FGF-2 w medium hodowlanym. Skłania nas to do wniosku, że w endometrium u kobiet z zaburzonym rozrodem nie istnieje, lub jest słabo wyrażona zależność pomiędzy aktywnością enzymatyczną heparanazy, a jej ewentualnym blokowaniem przez heparynę. Sytuacja taka może wynikać ze wspomnianej już wcześniej nieenzymatycznej roli heparanazy w endometrium.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że drobnocząsteczkowa heparyna nie wpływa *in vitro* na profil ekspresji heparanazy oraz wiążących heparynę czynników wzrostu HB-EGF, VEGF-A, FGF-2 w komórkach endometrium w oknie implantacyjnym, cyklu niekoncepcyjnego u kobiet z dwoma i więcej poronieniami, tym samym przytaczane korzystne działanie heparyny u kobiet z zaburzonym rozrodem nie ma

bezpośredniego związku z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, katalizowaną przez heparanazę i uwalnianiem czynników wzrostu wiążących heparynę.

Oświadczenie autorów:

1. Przemysław Wirstlein – autor koncepcji i założeń pracy, analiza statystyczna wyników, wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Mateusz Mikołajczyk – zebranie materiału, współautor tekstu pracy, przygotowanie manuskryptu, korekta i aktualizacja literatury.
3. Jana Skrzypczak – autor założeń pracy, współautor protokołu, analizy i interpretacji wyników, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania:

Całość projektu zfinansowano z grantu Narodowego Centrum Nauki UMO-2011/01/B/NZ5/0788.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów i nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

References

1. Saito S, Nakashima A, Shima T, [et al.]. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010, 63 (6), 601-610.
2. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod*. 1999, 14 Suppl 2, 3-16.
3. Gaide Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, [et al.]. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2012, 1, 146-156.
4. Kirn-Safran C, D'Souza S, Carson D. Heparan Sulfate Proteoglycans and Their Binding Proteins in Embryo Implantation and Placentation. *Semin Cell Dev Biol*. 2008, 2, 187-193.
5. Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparin sulfate proteoglycans. *Glycobiology*. 2001, 6, 91R-98R.
6. Goshen R, Hochberg AA, Korner G, [et al.]. Purification and characterization of placental heparanase and its expression by cultured cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod*. 1996, 9, 679-684.
7. Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, [et al.]. Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology*. 2000, 5, 467-475.
8. Xu X, Ding J, Rao G, [et al.]. Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Hum Reprod*. 2007, 4, 927-937.
9. Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, [et al.]. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res*. 2007, 120 Suppl 2, S112-20. Review. Erratum in: *Thromb Res*. 2008, 123 (1), 187-190.
10. Elkin M, Ilan N, Ishaï-Michaeli R, [et al.]. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB J*. 2001, 9, 1661-1663.
11. Zetser A, Bashenko Y, Edovitsky E, [et al.]. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation. *Cancer Res*. 2006, 3, 1455-1463.
12. Takahashi H, Ebihara S, Okazaki T, [et al.]. A comparison of the effects of unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid on vascular endothelial growth factor-induced tumour angiogenesis and heparanase activity. *Br J Pharmacol*. 2005, 146 (3), 333-343.
13. Badawy AM, Khiary M, Sherif LS, [et al.]. Low-molecular weight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology. *J Obstet Gynaecol*. 2008, 28, 280-284.
14. Urman B, Ata B, Yakin K, [et al.]. Luteal phase empirical low molecular weight heparin administration in patients with failed ICSI embryo transfer cycles: a randomized open-labeled pilot trial 1. *Hum Reprod*. 2009, 24, 1640-1647.
15. Johann S, Zoller C, Haas S, [et al.]. Sulfated polysaccharide anticoagulants suppress natural killer cell activity *in vitro*. *Thromb Haemost*. 1995, 74, 998-1002.
16. Christopherson KW, Campbell JJ, Travers JB, [et al.]. Low-molecular-weight heparins inhibit CCL21-induced T cell adhesion and migration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002, 302, 290-295.

Przemysław Wirstlein et al. *Ocena wpływu in vitro niskocząsteczkowej heparyny na ekspresję heparanazy i czynników wzrostu wiążących heparynę...*

17. Manduteanu I, Voinea M, Capraru M, [et al.]. A novel attribute of enoxaparin: inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells by a mechanism involving cell adhesion molecules. *Pharmacology*. 2002, 65, 32-37.
18. Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, [et al.]. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*. 1997, 12, 569-574.
19. Bläuer M, Heinonen PK, Martikainen PM, [et al.]. A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod*. 2005, 20 (4), 864-871.
20. <http://primer3.wi.mit.edu/>, ostatni dostęp 21 październik 2014
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, ostatni dostęp 21 październik 2014
22. <http://medgen.ugent.be/rtpriimerdb/>, ostatni dostęp 21 październik 2014
23. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, ostatni dostęp 21 październik 2014
24. Spratte J, Meyer zu Schwabedissen H, [et al.]. Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B. *Mol Hum Reprod*. 2013, 19 (4), 227-236.
25. Fluhr H, Spratte J, Ehrhardt J, [et al.]. Heparin and low-molecular-weight heparins modulate the decidualization of human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*. 2010, 93 (8), 2581-2587.
26. Eyal O, Jomain JB, Kessler C, [et al.]. Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: a novel role for prolactin. *Biol Reprod*. 2007, 76 (5), 777-783.
27. Hills FA, Abrahams VM, Gonzalez-Timon B, [et al.]. Heparin prevents programmed cell death in human trophoblast. *Mol Hum Reprod*. 2006, 12, 237-243.
28. Milne CD, Corte SA, Paige CJ. Heparan sulfate and heparin enhance ERK phosphorylation and mediate preBCR-dependent events during B lymphopoiesis. *J Immunol*. 2008, 180, 2839-2847.
29. Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, [et al.]. The molecular charge and size of heparins determine their impact on the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2011, 17 (6), 354-359.
30. Vodavsky I, Miao HQ, Medalion B, [et al.]. Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev*. 1996, 15 (2), 177-186.
31. Lazo-Langner A, Goss GD, Spaans JN, [et al.]. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost*. 2007, 5 (4), 729-737.
32. Fluhr H, Spratte J, Heidrich S, [et al.]. Heparin inhibits interferon- γ signaling in human endometrial stromal cells by interference with the cellular binding of interferon- γ . *Fertil Steril*. 2011, 95 (4), 1272-1277.
33. Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Dev Genet*. 1997, 21, 102-108.
34. Wirstlein PK, Mikołajczyk M, Skrzypczak J. Correlation of the expression of heparanase and heparin-binding EGF-like growth factor in the implantation window of nonconceptual cycle endometrium. *Folia Histochem Cytobiol*. 2013, 51 (2), 127-134.
35. Mikołajczyk M, Skrzypczak J. Endometrial receptivity - can it be diagnosed and controlled? And why does it matter? *Ginekol Pol*. 2014, 85 (2), 149-153.
36. Harris LK, Baker PN, Brenchley PE, [et al.]. Trophoblast-derived heparanase is not required for invasion. *Placenta*. 2008, 4, 332-337.
37. Gilat D, Hershkoviz R, Goldkorn I, [et al.]. Molecular behavior adapts to context: heparanase functions as an extracellular matrix-degrading enzyme or as a T cell adhesion molecule, depending on the local pH. *J Exp Med*. 1995, 181 (5), 1929-1934.
38. Revel A, Helman A, Koler M, [et al.]. Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil Steril*. 2005, 83 (3), 580-586.
39. Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, [et al.]. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*. 1999, 126 (9), 1997-2005.
40. Birdsall MA, Hopkisson JF, Grant KE, [et al.]. Expression of heparin-binding epidermal growth factor messenger RNA in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 1996, 2 (1), 31-34.
41. Chobotova K, Karpovich N, Carver J, [et al.]. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005, 90 (2), 913-919.
42. Xu X, Rao G, Quiros RM, [et al.]. In vivo and in vitro degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans by HPR1 in pancreatic adenocarcinomas. Loss of cell surface HS suppresses fibroblast growth factor 2-mediated cell signaling and proliferation. *J Biol Chem*. 2007, 282 (4), 2363-2373.
43. Joyce JA, Freeman C, Meyer-Morse N, [et al.]. A functional heparan sulfate mimetic implicates both heparanase and heparan sulfate in tumor angiogenesis and invasion in a mouse model of multistage cancer (2005). *Oncogene*. 2005, 24, 4037-4051.