

УДК 61.618.145;577.29

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ КАК ОДНО ИЗ ЗВЕНЬЕВ ПАТОГЕНЕЗА НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

© 2019 г. А. Р. Ильина^{a, b}, Е. С. Миронова^a, Н. С. Линькова^{a, c, *},
В. О. Полякова^{a, d, e, f}, И. М. Кветной^{a, d, e}, Н. Н. Белушкина^g

^aОтдел биogerонтологии АНО НИЦ “Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии”,
197110 Санкт-Петербург, Россия

^bКафедра “Медицинская физика”, Институт биомедицинских систем и технологий,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 194223 Санкт-Петербург, Россия

^cКафедра терапии, гериатрии и антивозрастной медицины академии постдипломного образования ФГБУ
“Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА”, 115687 Москва, Россия

^dОтдел патоморфологии ФГБНУ “Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта”, 199034 Санкт-Петербург, Россия

^eКафедра нормальной физиологии и патологии Санкт-Петербургского государственного университета,
199034 Санкт-Петербург, Россия

^fЧОУ ВО “Санкт-Петербургский медико-социальный институт”, 195271 Санкт-Петербург, Россия

^gЦентр иммунологии и молекулярной биомедицины Биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

*e-mail: miayu@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.02.2019 г.

После доработки 15.03.2019 г.

Принята к публикации 06.04.2019 г.

В России эндометриоз встречается у 50% женщин репродуктивного возраста и часто становится причиной бесплодия. Патогенез этого заболевания в настоящее время до конца не изучен, что затрудняет его лечение. По одной из гипотез молекулами, вовлеченными в развитие эндометриоза, являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Цель исследования – оценить роль ММП-2 и ММП-9 в патогенезе наружного генитального эндометриоза (НГЭ¹). Методом иммуногистохимии в железах эндометрия женщин с НГЭ выявлено увеличение экспрессии ММП-2 на 34–72% и ММП9 – более, чем в 100 раз, по сравнению с нормальным эндометрием. В строме эндометрия у пациенток с НГЭ экспрессия ММП-9 повышалась более, чем в 100 раз. В эндометриальных гетеротопиях женщин с НГЭ экспрессия ММП-2 возрастала на 26–50%, а экспрессия ММП-9 – в 2.5–3.9 раза по сравнению с контролем. При прогрессировании НГЭ экспрессия ММП-2 в железистом компоненте эндометрия повышается. Таким образом, расщепление межклеточного матрикса и базальных мембран эндотелиоцитов с участием ММП-2 и ММП-9 лежит в основе имплантации эндометриальных гетеротопий и неангиогенеза, которые являются ключевыми звеньями НГЭ.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, эндометрий, эндометриальные гетеротопии, матриксные металлопротеиназы

DOI: 10.1134/S0301179819040040

Согласно данным РОССТАТ женское население России составляет 54% от общего числа жителей страны. В репродуктивном возрасте находятся 45% женщин и у 50% из них диагностируется эндометриоз [9]. Известно, что эндометриоз-ас-

социированное бесплодие возникает на 20–50% чаще, чем у женщин без патологии эндометрия. Причиной возникновения бесплодия при эндометриозе являются гормональные и иммунные нарушения, негативно влияющие на формирование ооцитов, оплодотворение и эмбриогенез [1, 9]. Таким образом, эндометриоз является социально значимым заболеванием, а его этиология и молекулярные механизмы возникновения в настоящее время до конца не изучены.

Основными звеньями патогенеза наружного генитального эндометриоза (НГЭ) считают ретроградный заброс эндометрия в брюшную по-

¹ **Сокращения:** IL – интерлейкин (interleukin), PG – простагландин (prostaglandin), ММП – семейство матриксных металлопротеиназ, TGF – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor), TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor), VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor), мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, НГЭ – наружный генитальный эндометриоз.

лость, имплантацию эндометриальных очагов и их пролиферативный рост под действием гормональных и иммунных факторов, а также неоангиогенез, способствующий автономному существованию эндометриальных гетеротопий [5, 9]. В перечисленных процессах важную роль играют цитокины (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , PG-E2) и факторы роста (VEGF, TGF- β), регулирующие ремоделирование межклеточного матрикса [2, 3, 5, 9]. Так, в эндотелиоцитах IL-1 стимулирует выработку MMP-9, а индуктором синтеза MMP-9 в них является VEGF [3], экспрессия которого индуцируется IL-6 [5]. Кроме того, IL-4 и IL-10 через супрессию синтеза IL-1 в макрофагах индуцируют синтез MMP-9. Кроме того, выявлена способность MMP-9 осуществлять активацию IL-8 и трансформирующего фактора роста типа бета (TGF- β), который способен угнетать пролиферацию эндотелиоцитов [3, 4]. MMP-2 менее подвержена регуляции со стороны факторов роста и цитокинов в связи с малым количеством регуляторных элементов в промоторной зоне гена MMP-2 [10], однако в кератиноцитах, глиальных клетках, меланоме, аденокарциноме, фибросаркоме индуктором синтеза MMP-2 является TGF- β , в фибробластах и лейомиоцитах – IL-1, TNF- α [1, 2].

Учитывая данные о взаимной регуляции синтеза MMP, цитокинов и факторов роста в норме и при патологии можно предположить, что MMP-2 и MMP-9 играют важную роль в развитии НГЭ [4, 6, 10]. Однако ввиду неоднозначности имеющихся данных, важно провести расширенное исследование роли MMP-2 и MMP-9 в патогенезе различных стадий НГЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы эндометрия и эндометриальных гетеротопий были взяты путем пайпель-биопсии у женщин репродуктивного возраста (22–35 лет, средний возраст 29.7 ± 4.0 лет) с НГЭ. Весь материал был разделен на 4 группы по стадиям заболевания согласно клинической классификации НГЭ [11]: I группа – 1-ая стадия НГЭ, II группа – 2-ая стадия НГЭ, III группа – 3-я стадия НГЭ, IV группа – 4-ая стадия НГЭ. В каждой группе выделяли по 2 подгруппы, одна из которых содержала материал эндометрия ($n = 10$), другая – материал эндометриальных гетеротопий ($n = 10$). Контролем служили биоптаты нормального эндометрия ($n = 5$), полученного при обследовании по планированию беременности, и аутопсийный материал брюшины ($n = 5$) женщин без НГЭ. Весь материал был получен в архиве отдела патоморфологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта.

Материал заключали в парафиновые блоки, фиксировали в 10% формалине в течение 2–5 ч в

проводочной станции Microm STP120 (ThermoScientific, США) в течение 17 ч, после чего в термостате при 60°C заливали в парафин. Затем на микротоме (Sakura, Япония) изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, помещали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном (ThermoScientific, США) и в течение 1–2 дней просушивали срезы в термостате при 40°C. Детекцию MMP-2 и MMP-9 в материале эндометрия, эндометриальных гетеротопий и брюшины осуществляли иммуногистохимическим методом с применением первичных кроличьих поликлональных антител ab37150 (1 : 500, Abcam) к MMP-2, первичных мышечных моноклональных антител ab58803 (1 : 100, Abcam) к MMP-9 и вторичных антител Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Plus + Streptavidin Peroxidase Plus (Abcam). Инкубирование с первичными антителами к MMP-2 осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре, к MMP-9 – 12 ч при 4°C, со вторичными антителами – 10 мин при комнатной температуре согласно требованиям производителя. Результаты, полученные методом стрептавидин-биотиновой гистохимии сравнивали с данными, полученными методом иммунофлуоресцентной гистохимии. Для выявления MMP-2 и MMP-9 иммунофлуоресцентным методом образцы эндометрия, эндометриальных гетеротопий и брюшины после обработки первичными антителами инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре со вторичными козыми анти-кроличьими антителами Alexa Fluor 488 ab150077 (1 : 1000, Abcam) и козыми анти-мышечными Alexa Fluor 647 ab150115 (1 : 1000, Abcam), соответственно.

Визуализацию результатов экспрессии MMP-2 и MMP-9 в материале эндометрия, эндометриальных гетеротопий и брюшины, полученных методом стрептавидин-биотиновой гистохимии, осуществляли с использованием светового микроскопа Olympus BX46 (Olympus, Япония). Визуализацию результатов, полученных иммунофлуоресцентным методом, проводили на конфокальном микроскопе FluoView 1000 (Olympus, Япония).

Количественную оценку экспрессии MMP-2 и MMP-9 в исследуемом материале осуществляли по результатам стрептавидин-биотиновой гистохимии. При помощи программного обеспечения “CellSens Entry” и цифровой камеры Olympus-UC30 были получены микрофотографии 5 полей зрения с каждого препарата при $\times 400$. В программе “Видеотест Морфология 5.2” определяли относительную площадь экспрессии, которую рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к площади всех клеток в поле зрения, и выражали в процентах. Для статистического анализа данных использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Для выявления взаимосвязи между экспрес-

Таблица 1. Относительная площадь экспрессии MMP-2 (%) в эндометрии и эндометриальных гетеротопиях пациенток с НГЭ

Компонент эндометрия	Эндометрий				
	Контроль	I группа	II группа	III группа	IV группа
ЖК	16.84 ± 0.70	18.67 ± 1.35	22.56 ± 1.50*	23.44 ± 2.07*	28.92 ± 0.61*
СК	6.34 ± 0.58	10.25 ± 0.86**	8.40 ± 0.44	6.19 ± 0.67	7.62 ± 0.69
Контроль (брюшина)	Эндометриальные гетеротопии				
		I группа	II группа	III группа	IV группа
	8.43 ± 0.41	12.56 ± 0.94#	12.65 ± 0.84#	10.59 ± 0.84#	12.24 ± 0.92#

ЖК – железистый компонент эндометрия, СК – стромальный компонент эндометрия. * $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим показателем в ЖК эндометрия женщин без НГЭ, ** $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим показателем в СК эндометрия женщин без НГЭ, # – по сравнению с соответствующим показателем в брюшине женщин без НГЭ.

Таблица 2. Относительная площадь экспрессии MMP-9 в эндометрии и эндометриальных гетеротопиях при НГЭ

Компонент эндометрия	Эндометрий				
	Контроль	I группа	II группа	III группа	IV группа
ЖК	0.05 ± 0.01	3.75 ± 0.31**	3.22 ± 0.40**	4.63 ± 0.43**	12.68 ± 1.22**
СК	0.40 ± 0.04	44.05 ± 1.77*	37.19 ± 2.06*	25.33 ± 1.09*	60.69 ± 2.97*
Контроль (брюшина)	Эндометриальные гетеротопии				
		I группа	II группа	III группа	IV группа
	2.79 ± 0.13	10.96 ± 0.43#	8.35 ± 0.69#	7.59 ± 0.77#	6.93 ± 0.58#

Обозначения и достоверности как в табл. 1.

сией маркеров и степенью тяжести НГЭ применяли *S*-критерий Джонкира.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия MMP-2 в железистом компоненте эндометрия у женщин с НГЭ 2–4 стадий была выше, чем в контроле, соответственно на 34, 39 и 72% (табл. 1). В стромальном компоненте эндометрия пациенток с НГЭ 1 стадии экспрессия MMP-2 была на 62% выше, чем в контроле. В эндометриальных гетеротопиях при 1–4 стадиях заболевания экспрессия MMP-2 была соответственно на 49, 50, 26 и 45% выше, чем в контрольном материале брюшины. При переходе от 2 к 4 стадии НГЭ было выявлено достоверное увеличение экспрессии MMP-2 в железистом компоненте эндометрия.

Увеличение экспрессии MMP-2 в эндометрии при НГЭ по сравнению с контролем и в зависимости от стадии эндометриоза может свидетельствовать о повышении протеолитической активности MMP-2 при развитии патологии, и, как следствие, об увеличении вероятности ретроградного заброса материала эндометрия. В данном

случае, увеличение экспрессии MMP-2 может быть проявлением молекулярных каскадов позитивной индукции, развивающихся при прогрессировании патологии. Увеличение экспрессии MMP-2 в эндометриальных гетеротопиях при НГЭ по сравнению с контролем может быть проявлением предполагаемой супрессорной активности MMP-2 в отношении ангиогенеза – одного из звеньев патогенеза НГЭ. Данное предположение высказано на основе исследований, свидетельствующих об активности MMP-2 в подавлении адгезии эндотелиальных клеток [8].

Экспрессия MMP-9 (рис. 1, 2, табл. 2) в железистом компоненте эндометрия у женщин с НГЭ 1–4 стадий была выше, чем в контроле, соответственно в 110, 93, 63 и 152 раза. В стромальном компоненте эндометрия у пациенток с НГЭ 1–4 стадии экспрессия MMP-9 была соответственно в 80, 69, 99 и 273 раза выше, чем в контроле. В эндометриальных гетеротопиях при 1–4 стадиях заболевания экспрессия MMP-9 была соответственно в 3.9, 3.0, 2.7 и 2.5 раза выше, чем в контрольном материале брюшины.

Как известно, основной функцией MMP является расщепление компонентов межклеточного матрикса [4, 10, 11]. В первичной структуре MMP-

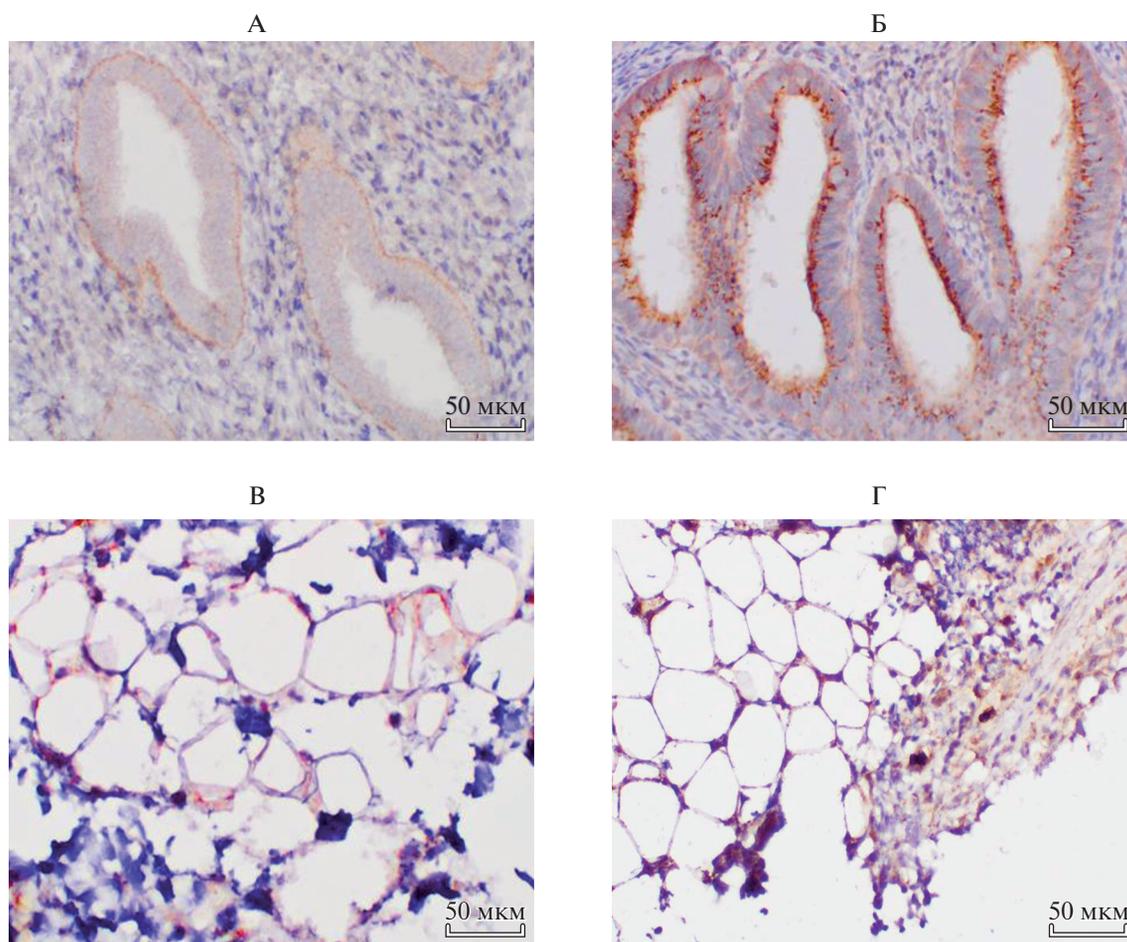


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание на MMP9, $\times 400$. Линия масштаба соответствует 50 мкм. А – эндометрий женщин без патологии (контроль), Б – эндометрий женщин с наружным генитальным эндометриозом второй степени тяжести, В – брюшина женщин без патологии (контроль), Г – эндометриальная гетеротопия, полученная от пациенток с наружным генитальным эндометриозом первой степени тяжести.

2 в составе каталитического центра имеется фибронектиновый домен, ответственный за связывание с ламинином и фибронектином. Ламинин – компонент мембран эндотелиоцитов, а фибронектин входит в состав межклеточного вещества. В структуре MMP-9 имеется домен, обеспечивающий высокое сродство MMP-9 к коллагену IV типа, который, так же, как и ламинин, является компонентом клеточных мембран. Разрушение межклеточного матрикса и базальных мембран эндотелиоцитов лежит в основе имплантации эндометриальных гетеротопий и неангиогенеза, которые являются ключевыми звеньями НГЭ [4, 11].

Предположение о том, что MMP-2 и MMP-9 играют важную роль и в развитии НГЭ, было высказано и другими авторами [4, 6, 10]. В исследовании Szymanowski и соавторов (2016) не было выявлено достоверных различий в экспрессии мРНК MMP-2 и MMP-9 в эндометрии женщин первой и второй степени тяжести НГЭ по сравне-

нию с лицами без патологии репродуктивной системы. Авторы этого исследования полагают, что полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения роли MMP в патогенезе эндометриоза. В другой работе показано отсутствие различий в экспрессии мРНК MMP-9 в эндометрии женщин с НГЭ и без патологии [6]. Однако в этом исследовании отсутствовало разделение пациенток по степени тяжести эндометриоза и не проводилось изучение уровня MMP-9 в эктопическом эндометрии, как и в исследовании Szymanowski K. и соавторов (2016) [9].

В обзоре Ярмолинской и соавт. (2012) обобщены данные о роли матриксных металлопротеиназ в патогенезе эндометриоза [5]. Авторы подчеркивают связь MMP-1,-3,-9 с системой цитокинов и отмечают увеличение экспрессии MMP-2 и MMP-9 в эктопическом эндометрии при внутреннем генитальном эндометриозе. Кроме того, показано повышение экспрессии мРНК MMP-2 и MMP-9 в эндо-

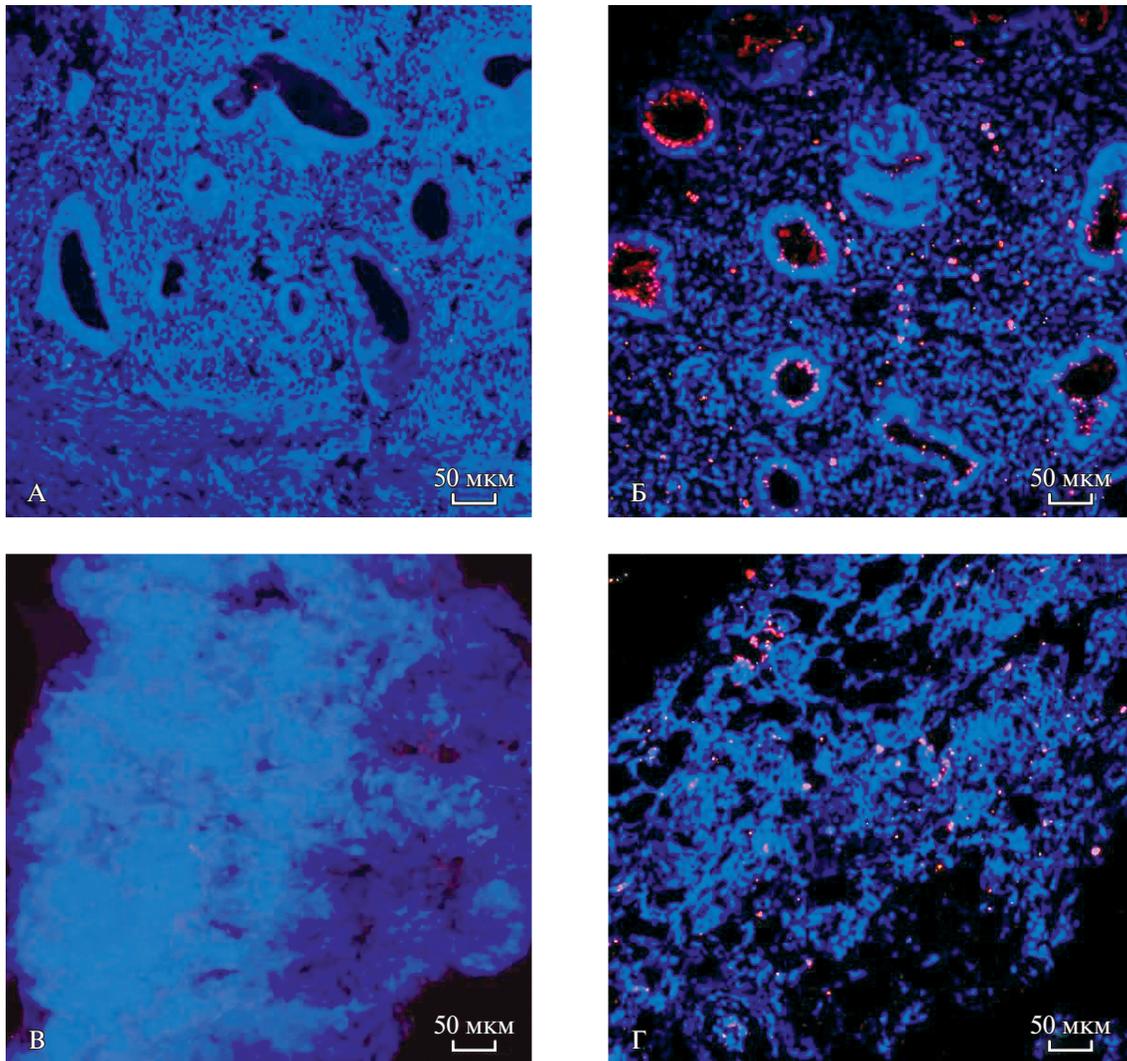


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание на MMP9, $\times 400$. Синяя флуоресценция – ядра клеток (краситель – DAPI), красная – экспрессия MMP-9 (вторичные антитела – Alexa Fluor 647). Линия масштаба соответствует 50 мкм. А – эндометрий женщин без патологии (контроль), Б – эндометрий женщин с наружным генитальным эндометриозом четвертой степени тяжести, В – брюшина женщин без патологии (контроль), Г – эндометриальная гетеротопия, полученная от пациентки с наружным генитальным эндометриозом четвертой степени тяжести.

метриальных гетеротопиях женщин с НГЭ по сравнению с экспрессией мРНК этих металлопротеиназ в нормальном эндометрии. Два последних результата недостаточно обоснованы ввиду неоднородности выборки по степеням эндометриоза и использования авторами в качестве эндометриальных гетеротопий материал очагов овариального эндометриоза, который часто может быть идентифицирован вместо кистозных новообразований.

Нами показано увеличение экспрессии MMP-2 и MMP-9 в эндометрии и в эндометриальных гетеротопиях пациенток с НГЭ всех степеней тяжести по сравнению с контролем, что свидетельствует о непосредственном участии MMP-2 и MMP-9 в патогенезе НГЭ, экспериментально

подтверждая предположение, ранее высказанное другими авторами. Учитывая приведенную выше информацию и полученные нами данные, можно заключить, что экспрессия MMP-2 и MMP-9 активируется цитокинами и VEGF и играет ключевую роль в патогенезе НГЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матриксные металлопротеиназы и их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2016. № 2. С. 11–22.
2. Тарламазан А.В., Столярова У.В. Вопросы этиологии, патогенеза, классификации, диагностики и лечения ретроцервикального эндометриоза (об-

- зор) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2016. Т. 12. № 2. С. 138–144.
3. Цицкарава Д.З., Ярмолинская М.И., Селютин А.В., Сельков С.А. Оценка содержания и патогенетической роли цитокинов перитонеальной жидкости у пациенток с глубоким инфильтративным эндометриозом // Журнал акушерства и женских болезней. 2017. Т. 66. № 1. С. 38–45.
 4. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Роль матриксных металлопротеиназ в патогенезе генитального эндометриоза // Журн. акушерства и женских болезней. 2012. Т. LXI. № 2. С. 92–100.
 5. Ярмолинская М.И., Русина Е.И., Хачатурян А.Р., Флорова М.С. Клиника и диагностика генитального эндометриоза // Журн. акушерства и женских болезней. 2016. Т. 65. № 5. С. 4–21.
 6. Ahn S.H., Monsanto S.P., Miller C. et al. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis // BioMed. Research International. 2015. P. 1–12.
 7. Collette T., Maheux R., Mailloux J., Akoum A. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis // Human Reproduction. 2006. V. 21. № 12. P. 3059–3067.
 8. Kianpour M., Nematbakhsh M., Ahmadi S.M. et al. Serum and Peritoneal Fluid Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Women with Endometriosis // J. Fertility and Sterility. 2013. V. 7. № 2. P. 96–99.
 9. Lee H., Chang K.W., Yang H.Y. et al. MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells // Biochem Biophys Res Commun. 2013. V. 437(2). P. 232–238.
 10. Philippe E., Van den Steen, Dubois B. et al. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2002. № 37. P. 375–536.
 11. Szymanowski K., Dera-Szymanowska A., Mikołajczyk M., Wirstlein P. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) and transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) expression in eutopic endometrium of women with peritoneal endometriosis // Ann. Agric. Environ. Med. 2016. V. 23. № 4. P. 649–653.

Matrix Metalloproteinases is One of the Chain of External Genital Endometriosis Pathogenesis

A. R. Ilina^{a, b}, E. S. Mironova^a, N. S. Linkova^{a, c, #},
V. O. Polyakova^{a, d, e, f}, I. M. Kvetnoy^{a, d, e}, and N. N. Belushkina^g

^aDepartment of biogerontology ANO SRC “St. Petersburg Bioregulation and Gerontology Institute”,
197110 St. Petersburg, Russia

^bDepartment of medical physics, Institute of biomedical systems and technologies,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 194223 St. Petersburg, Russia

^cDepartment of therapy, geriatrics, and anti-aging medicine, Academy of Postgraduate Education under the Federal State
Budgetary Unit “Federal Scientific and Clinical Center for Specialized types Medical Assistance
and Medical Technologies of the FMBA”, 115682 Moscow, Russia

^dDepartment of Pathomorphology FSBE D.O. Ott Scientific & Research Institute
of Obstetrics and Gynecology NWB RAMS, 199034 St. Petersburg, Russia

^eDepartments of Normal Physiology and pathology of St. Petersburg state University, 199034 St. Petersburg, Russia

^fSt. Petersburg Medico-Social Institute, 195271 St. Petersburg, Russia

^gMoscow State University, Center of Immunology and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology,
Lenin Hills, d 1, page 12, 119991 Moscow, Russia

[#]e-mail: miayy@yandex.ru

Received February 3, 2019; revised March 15, 2019; accepted April 6, 2019

In Russia, endometriosis occurs in 50% of reproductive age women and often causes infertility. The pathogenesis of this disease is not fully understood currently, which complicates its treatment. According to one hypothesis, the molecules involved in the development of endometriosis are matrix metalloproteinases (MMP). The aim of the study was to assess the role of MMP-2 and MMP-9 in the pathogenesis of external genital endometriosis (EGE). Increase of MMP-2 expression by 34–72% and MMP9 – more than 100 times, compared with normal endometrium was revealed in the glands of the EGE women endometrium by immunohistochemistry method. The MMP-9 expression increased more than 100 times in endometrium stroma in EGE patients. The MMP-2 expression increased by 26–50%, and MMP-9 expression – by 2.5–3.9 times in endometrial heterotopias of EGE women in compared to the control. The MMP-2 expression in the glandular component of the endometrium increases with an increase in the EGE stage. Thus, the cleavage of the intercellular matrix and basal membranes of endotheliocytes with the participation of MMP-2 and MMP-9 is the basis of implantation of endometrial heterotopias and neoangiogenesis, which are the key links of the EGE.

Keywords: external genital endometriosis, endometrium, endometrial heterotopias, matrix metalloproteinases.