

УДК 618.14-002-07

## РОЛЬ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА МАТРИКСНЫХ КОЛЛАГЕНАЗ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ТАКТИКЕ ВЕДЕНИЯ БОЛЬНЫХ С АДЕНОМИОЗОМ

<sup>1</sup>Гайдуков С.Н., <sup>1</sup>Арутюнян А.Ф., <sup>2</sup>Кустаров В.Н.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: spb@gpma.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Проводилось изучение распространенности генных вариантов металлопротеиназы-1 (MMP-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) (4G/5G) у больных с аденомиозом с целью прогноза развития заболевания. В настоящее исследование включены 150 больных с внутренним эндометриозом тела матки. Критериями включения в исследование пациенток явились: наличие диффузного аденомиоза у женщин репродуктивного и перименопаузального возраста на основании тщательного анализа клинико-анамнестических и инструментально-диагностических (эхографическое, доплерометрическое, гистероскопическое обследование с пункционной биопсией миометрия, что подтвердилось послеоперационным морфологическим исследованием) данных. Проведена оценка распространенности генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) (4G/5G) у 150 больных с аденомиозом. Группу популяционного контроля составили 200 жителей Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Результаты исследования показали, что наличие у пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 и сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5G PAI-1 характерно пролиферирующей формы аденомиоза и прогресса заболевания. Определение взаимосвязи между полиморфными генными вариантами MMP-1 и PAI-1 и морфологической формой аденомиоза может быть использовано в целях прогноза течения заболевания.

**Ключевые слова:** аденомиоз, матриксная металлопротеиназа-1 (MMP-1) и ингибитор активатора плазминогена типа 1 (PAI-1)

## THE ROLE OF MATRIX COLLAGENASE GENE POLYMORPHISM IN THE PREVENTION AND MANAGEMENT OF PATIENTS WITH ADENOMYOSIS

<sup>1</sup>Gaydukov S.N., <sup>1</sup>Arutyunyan A.F., <sup>2</sup>Kustarov V.N.

<sup>1</sup>State budget institution of higher professional education «Saint-Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, e-mail: spb@gpma.ru;

<sup>2</sup>Federal state budget institution «Federal Medical Research Centre after V.A. Almazov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg

The gene variants prevalence metalloproteinase-1 (MMP-1) (1G/2G) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (4G/5G) in patients with adenomyosis were studied for the purpose of diagnosis the progress of the disease. The present study included 150 patients with internal endometriosis of the uterine body. The criteria for the inclusion in the study patients were: the presence of diffuse adenomyosis in women of reproductive age, and perimenopausal based on a thorough analysis of clinical and anamnestic and instrumental diagnostic (echographic, Doppler, hysteroscopic examination needle biopsy of the myometrium, which confirmed postoperative morphological research) data. Assessment of gene variants incidence matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) (1G/2G) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (4G/5G) were conducted in 150 patients with adenomyosis. Population control group included 200 residents of Saint Petersburg and Leningrad region. The study showed that patients homozygous (2G/2G) or heterozygous (1G/2G) state MMP-1 gene and allele combination 2G MMP-1 and 5G PAI-1 characteristic of proliferative forms of adenomyosis and disease progression Definition of the interconnection between polymorphic gene variants MMP-1 and PAI-1 and morphological form of adenomyosis can be used to forecast the disease.

**Keywords:** adenomyosis, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)

Эндометриоз является одной из актуальных проблем современной медицины, оставаясь в ряду самых загадочных и труднообъяснимых заболеваний. Частота аденомиоза среди всех поражений эндометриозом половых органов достигает 70–90% [1, 2, 6, 7]. Концепция клиники, тактики ведения, патологии и морфогенеза аденомиоза подробно обсуждаются в литературе не одно десятилетие

[3, 8], однако многие аспекты данной проблемы остаются малоизученными. Практически отсутствуют сведения о молекулярно-биологических особенностях процессов неоангиогенеза и экспрессии факторов роста, отражающих ремоделирование стромы в аденомиозе [3, 4]. В данном этапе развития медицины, учитывая важную роль матриксных металлопротеиназ (MMP) в ремо-

делировании тканей и органов, представляет интерес их регулирование в репродуктивных органах женщин. Этому вопросу посвящен ряд обзоров [13], в которых авторы описывают, как на протяжении менструального цикла происходит постоянное ремоделирование тканей и ЭЦМ матки с изменениями продукции и активности различных MMP в эндометрии и миометрии. Активность коллагеназ при этом модулируется эндогенными тканевыми специфическими белками-ингибиторами (TIMP), которые подавляют активность коллагеназ, образуя с ними неактивные комплексы. Их равновесие является ключевым фактором нормальной перестройки тканей матки. Естественно, экспрессия MMP и TIMP находится под контролем стероидных гормонов яичника, а также локально вырабатываемых цитокинов и факторов роста. Известно более 20 видов MMP, которые осуществляют различные этапы деградации коллагена, эластина и других белков экстрацеллюлярного матрикса. Среди них особую роль играет интерстициальная коллагеназа (матриксная металлопротеиназа-1, MMP-1), которая осуществляет первичную деградацию молекул коллагена, после чего происходит их дальнейший распад под действием остальных MMP, в частности стромелизина-1 (MMP-3) [12]. Значительную роль в ремоделировании тканей матки играют также факторы системы гемостаза, которые, как правило, являются специализированными протеазами, осуществляющими активацию факторов каскада свертывания крови и фибринолиза. Таким образом, исследование распространенности генных вариантов MMP-1, PAI-1 у больных с аденомиозом с различной морфологической формой заболевания представляет интерес с клинических позиций.

**Цель исследования** – найти взаимосвязь между промоторными генотипами MMP-1 и PAI-1 с клиническим течением и морфологической формой аденомиоза с целью прогноза развития заболевания.

#### **Материалы и методы исследования**

В настоящее исследование включены 150 больных с внутренним эндометриозом тела матки. Критериями включения в исследование пациенток явились: наличие диффузного аденомиоза у женщин репродуктивного и перименопаузального возраста на основании тщательного анализа клинико-анамнестических и инструментально-диагностических (эхографическое, доплерометрическое, гистероскопическое обследование с пункционной биопсией миометрия, что подтвердилось послеоперационным морфологическим исследованием) данных. Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили с помощью ультразвукового диагностического прибора Sonoline G40, фирмы Siemens с использованием трансвагинального датчика (частота 6,7 МГц). При ультразвуковом исследовании определяли раз-

меры матки, толщину и структуру миометрия, эндометрия, размеры яичников. После проведения биометрии матки и яичников осуществляли цветное доплеровское картирование с последующей оценкой кривых скоростей кровотока в маточных артериях. Для устранения низкочастотных сигналов, производимых движениями стенок сосудов, применяли фильтр 100 Гц. Общая мощность доплеровского излучения не превышала 100 мВт/см<sup>2</sup>. Ультразвуковое исследование органов малого таза и доплерографию проводили до операции на 20–23 дни менструального цикла. Для качественного анализа спектральных кривых скоростей кровотока оценивали ИР – индекс резистентности. Операционную гистерорезектоскопию (фирмы Olympus) с биопсией миометрия выполняли пациенткам с монополярной петлей резектоскопа. Захватывали участки миометрия в области визуализируемых железистых ходов (при их отсутствии – в нескольких произвольных точках на разных стенках полости матки). Возраст больных составлял от 32 до 48 лет (41 ± 2,5 года). Длительность клинических проявлений заболевания была от нескольких месяцев до 10 лет. Основными симптомами заболевания были обильные и длительные менструации у 53 (35,3%) пациенток, скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации у 97 (64,7%) женщин, болезненные менструации у 67 (44,7%) обследованных. У 83 (55,3%) больных отмечались хронические тазовые боли различной интенсивности и у 35 (23,3%) женщин – диспареуния. Первичное бесплодие имело место у 14 (9,3%) женщин, а вторичное – у 19 (12,7%). Известно, что аденомиоз часто сопровождается маточными кровотечениями, приводящими к анемизации больных. Показатель уровня гемоглобина в пределах 125–110 г/л наблюдался у 116 (77,3%) пациенток с внутренним эндометриозом тела матки. Показатель уровня гемоглобина 109–100 г/л был у 34 (22,7%) больных с аденомиозом. При определении размеров матки получили следующие результаты: у 67 (44,7%) пациенток матка соответствовала размерам 5 н.б., у 53 (35,3%) больных – 6–8 н.б., у 30 (20%) женщин – 9–12 н.б. Средняя величина матки составила 6,8 ± 1,2 н.б. 49 пациенткам производилась экстирпация матки, вопрос об удалении придатков решался индивидуально. Основными показаниями для проведения гистерэктомии у обследованных больных с аденомиозом были: маточные кровотечения у 27 больных (55,1%); сильные тазовые боли у 25 пациенток (51%); постгеморрагическая анемия у 15 пациенток (30,6%); отсутствие эффекта от проведенной терапии агНРГ у 37 (75,5%). Необходимо отметить, что у 35 (71,4%) прооперированных пациенток было сочетание нескольких из приведенных показаний для операции. Морфологические исследования были выполнены у всех 49 оперированных больных. Срезы операционного материала окрашивались гематоксилином-эозином, пикрофуксином для выявления соединительной ткани. Просмотр микропрепаратов осуществлялся на микроскопе МИКМЕД-2, видеogramмы получены с помощью автоматического анализатора изображения ВИДИО-ТЕСТ-2,0. При определении функционально активных и неактивных типов эндометриодных гетеротопий использовали морфологическую классификацию, предложенную И.И. Куценко [5], который позволяет выделять следующие формы заболевания: пролиферирующую, стабильную (фиброзную), регрессирующую (дистрофическую). Оценка

распространенности генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) (4G/5G) проведена у 150 больных с аденомиозом. Группу популяционно-го контроля составили 200 жителей Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов крови больных и доноров с применением набора «ДНК-Сорб» («Литех», Москва). Тип промоторного полиморфизма генов MMP-1 (1G/2G), PAI-1 (4G/5G) определяли с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции ДНК (ПЦР ДНК). Продукты ПЦР после электрофореза оценивали в агарозном геле при окраске этидий-бромидом.

### Результаты исследования и их обсуждение

При макроскопическом исследовании матка была округлой или бугристой формы, увеличена в основном за счет утолщения задней (61,2%) и передней стенок, обусловленного наличием аденомиоза. Консистенция матки в большинстве случаев была неравномерно плотной. На разрезе в миометрии очаги аденомиоза имели вид участков уплотнения ячеистого строения, без капсулы и четких границ, представляющих собой инфильтраты, и кистозные образования. В ряде случаев в толще миометрия имелись мелкие (0,3–0,8 см) полости с геморрагическим содержимым. Очаги аденомиоза были представлены железистыми структурами различной величины и стромой окружающей железы, которая имела цитогенный характер и состояла из многочисленных фибробластоподобных клеток с различным содержанием коллагеновых волокон. Характерным было наличие множества тонкостенных сосудов. Как правило, стромальный компонент преобладал над железистым. Преобладание стромального компонента в основном отмечалось в группе 53 (35,3%) пациенток с более клинически активным проявлением аденомиоза. Вокруг очагов аденомиоза обнаруживались характерные изменения миометрия: гипертрофия миоцитов, формирование периваскулярных зон роста, сходных с наблюдаемыми в миомах. Функционально активные эндометриоидные гетеротопии часто располагались вблизи гетеротопий, в которых эпителий не имел признаков функциональной активности.

Анализ распределения изученных генных вариантов показал высокую частоту встречаемости альтернативных аллелей генов MMP-1, PAI-1 у обследованных больных с аденомиозом. Получены результаты, свидетельствующие о высокой частоте встречаемости генотипа 1G/1G MMP-1 в группе женщин 30 (20%), находившихся в перименопаузе и имевших по данным морфологии регрессирующий (дистрофический) тип опухоли. По данным анамнеза, пациентки из данной клинической группы имели неактивное течение заболевания (маленькие,

стабильные размеры матки, невысокая частота меноррагий). Основными симптомами были скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации и менее выраженный болевой синдром. Размеры матки в данной группе больных соответствовали размерам 5–6 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР = 0,83 \pm 0,01$ . Кроме того, было обнаружено, что у больных со стабильным течением заболевания отмечалась повышенная встречаемость генотипа 1G/1G гена MMP-1, тогда прогресс аденомиоза ассоциировался с пониженной частотой данного аллеля ( $p = 0,02$ ). Обнаружена достоверная ассоциация между наличием аллеля 1G MMP-1 (генотипы 1G/1G и 1G/2G) и частотой встречаемости сопутствующей аденомиозу миомы матки ( $p = 0,008$ ): частота генотипа 1G/1G существенно ниже у больных с аденомиозом при сочетании с миомой матки. Молекулярно-генетическое исследование установило роль гиперактивных генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 в развитии пролиферирующей формы аденомиоза. Наличие у 53 (35,3%) пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 ассоциировано с пролиферирующей формой аденомиоза и прогрессированием заболевания. Основными симптомами у пациенток из данной клинической группы были обильные и длительные менструации и болевой синдром. Размеры матки у 30 пациенток в данной группе больных соответствовали размерам 10–12 н.б., у 23 больных – 7–9 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР = 0,70 \pm 0,02$ . При носительстве аллеля 2G у больных наблюдается более активная продукция проэнзима MMP-1, это приводит к активации коллагенолиза и увеличивает вероятность инвазии клеток эндометрия в прилежащие области с их последующим эктопическим ростом. Кроме того, процессы неоангиогенеза, играющие важную роль в патогенезе аденомиоза и миомы матки, прогрессируют при усилении активности матриксных металлопротеиназ [9]. Участвуя в процессах деградации матрикса при росте тканей, они тем самым формируют пространство для прорастания в межклеточном матриксе новых капилляров, обеспечивающих питание новообразований.

При исследовании частоты встречаемости различных генотипов гена PAI-1 у пациенток с различной морфологической формой аденомиоза была обнаружена достоверная ассоциация между наличием аллеля 5G гена PAI-1 и пролиферирующей формой заболевания ( $p = 0,04$ ). При анализе гаплотипов MMP-1/PAI-1 у обследованных



больных с аденомиозом было обнаружено, что сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5G PAI-1 коррелировало с наличием аденомиоза и прогрессированием заболевания и достоверно чаще встречалось у больных с пролиферирующей формой аденомиоза ( $p = 0,005$ ) по сравнению с 67 (44,7%) больными, имевшими стабильную или фиброзную форму опухоли. У пациенток, имевших стабильную или фиброзную форму опухоли, основными симптомами были скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации, альгодисменорея и диспареуния. Размеры матки у 37 пациенток в данной группе больных соответствовали размерам 5–6 н.б., у 30 больных – 7–9 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР = 0,79 \pm 0,02$ .

Наличие аллеля 5G гена PAI-1 характеризуется низкой экспрессией белка, и, таким образом, при этом в меньшей степени ингибируется выработка плазмина, что приводит к усилению образования активной матриксной металлопротеиназы-1 из ее предшественника [10].

Молекулярно-генетическое исследование изменений генной активности у больных с аденомиозом обнаружило значимую роль определенных генных полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ (MMP-1и MMP-3), а также гена ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1) в развитии различных клинических форм течения заболевания, что показало значимость в патогенезе аденомиоза механизмов регуляции процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса. Экстрацеллюлярный матрикс, являющийся супрамолекулярным комплексом, образующим внеклеточное окружение, влияет на дифференцировку, пролиферацию, организацию и прикрепление клеток. Он включает в себя интерстициальный коллаген, протеогликаны, фибронектин, ламинин и другие крупномолекулярные соединения. При опухолевом росте в миометрии происходят изменения экспрессии ряда генов внеклеточного матрикса, что ведет к усиленному накоплению коллагена, мукополисахаридов [11].

#### Заключение

Таким образом, наличие у пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 и сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5G PAI-1 характерно для пролиферирующей формы аденомиоза и прогресса заболевания. Определение взаимосвязи между полиморфными генными вариантами MMP-1 и PAI-1 и морфологической формой аденомиоза может быть использовано в целях прогноза течения заболевания.

#### Список литературы

1. Адамьян Л.А., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. – М.: Медицина, 2006. – С. 410.
2. Баскаков В. П., Цвелев Ю. В., Кира Е. В.. Эндометриодная болезнь – СПб., 2002. – С. 136–141.

3. Вихляева Е.М. Молекулярно-генетические детерминанты опухолевого роста и обоснование современной стратегии ведения больных лейомиомой матки//Вопр. онкологии. – 2001. – Т.47, № 2. – С. 200–204.
4. Киселев В.И., Лященко А.А. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов. – М., 2005. – 348 с.
5. Куценко И.И. Клинико-морфологическая диагностика и особенности лечения различных по активности форм генитального эндометриоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1995. – 52 с.
6. Сидорова И.С., Коган Е.А., Унанян А.Л. Новый взгляд на происхождение эндометриоза (в сочетании с миомой матки) // Миома матки (современные проблемы этиологии, патогенеза, диагностики и лечения); под ред. И.С. Сидоровой. – М.:МИА. 2002, Глава 8, – С. 168–184.
7. Стрижаков А.Н., Давыдов А.И. Эндометриоз: клинические и теоретические аспекты. – М.: Медицина, 1996. – 330 с.
8. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. – СПб.: СОТИС, 1999. – С. 272–274.
9. Angiogenesis and Endometriose / Becker C.M., Bartley J., Mechsner S., Ebert A.D. // Zentralbi Gynakol. – 2004. – Vol.126, № 4. – P. 252–258.
10. Curry T.E.Jr., Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle // Endocr Rev. – 2003. – Vol. 24. – P. 428–465.
11. Gene expression studies in leiomyomata: new directions for research / Catherino W., Salama A., Potlog-Nahari C., Leppert P., Tsibris J., Segars J. // Semin Reprod Med. – 2004. – Vol. 22, № 2. – P. 83–90.
12. Johansson N., Ahonen M., Kahari V.M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion // Cell.Mol.Life Sci. – 2000. – Vol. 57. – P. 5–15.
13. Zhang X., Nothnick W.B. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species.//Front. Biosci. – 2005. – Vol. 10. – P. 353–366.

#### References

1. Adamjan L.A., Kulakov V.I., Andreeva E.N. Jendometriozy. Moscow, Medicina, 2006, pp. 410.
2. Baskakov V. P., Cvelev Ju. V., Kira E. V. Jendometrioidnaja bolezn SPb., 2002, pp. 136–141.
3. Vihljaeva E.M. Molekuljarno-geneticheskie determinanty opuholevogo rosta i obosnovanie sovremennoj strategii vedenija bolnyh lejomiomoy matki, Vopr. onkologii, 2001, Vol. 47, no. 2, pp. 200–204.
4. Kiselev V.I., Ljashhenko A.A. Molekuljarnye mehanizmy reguljacii giperplasticheskikh processov. Moscow, 2005, 348 p.
5. Kucenko I.I. Kliniko-morfologicheskaja diagnostika i osobenosti lechenija razlichnyh po aktivnosti form genitalnogo jendometrioz: Avtoref. Dis. dokt. med. nauk. Moscow, 1995, 52 p.
6. Sidorova I.S., Kogan E.A., Unanjan A. L. Novyj vzgljad na proishozhdenie jendometrioz (v sochetanii s miomoy matki). V knige «Mioma matki (sovremennye problemy jetiologii, patogeneza, diagnostiki i lechenija)» pod redakciej Sidorovoj I.S. Moscow: MIA. 2002, chap. 8, pp. 168–184.
7. Strizhakov A.N., Davydov A.I. Jendometrioz: klinicheskie i teoreticheskie aspekty Moscow: Medicina, 1996, 330 p.
8. Hmelnickij O.K. Citologicheskaja i gistologicheskaja diagnostika zabolevanij shejki i tela matki. Spb: SOTIS, 1999, pp. 272–274.
9. Angiogenesis and Endometriose / Becker C.M., Bartley J., Mechsner S., Ebert A.D. // Zentralbi Gynakol. 2004. Vol. 126, no. 4. pp. 252–258.
10. Curry T.E.Jr., Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle // Endocr Rev. 2003. Vol. 24. pp. 428–465.
11. Gene expression studies in leiomyomata: new directions for research / Catherino W., Salama A., Potlog-Nahari C., Leppert P., Tsibris J., Segars J. // Semin Reprod Med. 2004. Vol. 22, no. 2. pp. 83–90.
12. Johansson N., Ahonen M., Kahari V.M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion // Cell.Mol.Life Sci. 2000. Vol. 57. pp. 5–15.
13. Zhang X., Nothnick W.B. The role and regulation of the uterine matrix metalloproteinase system in menstruating and non-menstruating species // Front. Biosci. 2005. Vol. 10 pp. 353–366.

#### Рецензенты:

Баласанян В.Г., д.м.н., профессор, кафедра детской гинекологии и женской репродуктологии, ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург;

Костюшов Е.В., д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ ЛО «Сертоловская городская больница», г. Сертолово.