

УДК 618.145-02:612.015.13

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 14 И 17 КАК ФАКТОРЫ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ ПРИ АДЕНОМИОЗЕ

Е.В. Ткачева¹, М.З. Горелик², И.В. Дюйзен¹¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),²Приморское краевое патологоанатомическое бюро (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 4)**Ключевые слова:** внутренний эндометриоз, матка, протеолитические ферменты, шкала иммунореактивности.

MATRIX METALLOPROTEINASES 14 AND 17 AS FACTORS OF REVASCULARIZATION IN ADENOMYOSIS

E.V. Tkachyova¹, M.Z. Gorelik², I.V. Dyuzhen¹¹Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Primorsky Regional Patho-anatomical Department (4 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)**Background.** The localization of matrix metalloproteinases (MMPs) 14 and 17 was studied in eutopic endometrial tissue of women with internal endometriosis.**Methods.** The study included 20 women of childbearing age suffering from dysfunctional uterine bleeding and infertility. The control group consisted of patients with no signs of endometriosis, who had a history of pregnancy. The endometrial biopsy was detected the presence and location of MMP14 and MMP17 by immunohistochemistry.**Results.** All women with endometriosis diagnosed glandular endometrial hyperplasia and tissue changes observed selective localization and activity of MMP14 and MMP17. In the endometrial stroma adenomyosis was a growing activity of MMP14 in the wall of blood vessels and MMP14 expressed MMP17, and in the cells of uterine glands appearing not peculiar stage of the cycle MMP17.**Conclusions.** Eutopic endometrial tissue of women with adenomyosis are characterized by changing the profile of activity of some MMPs. Together, these changes may disrupt the support and signaling proper-ties of the fabric, creating favorable conditions for endometrioid heterotopia.**Keywords:** internal endometriosis, uterus, proteolytic enzymes, immunoreactive scale.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2, p. 69–73.

Основные морфологические и функциональные процессы в женской половой системе (циклические изменения яичников и матки, имплантация плодного яйца, развитие плодных оболочек) протекают при прямом участии протеолитических ферментов межклеточного матрикса – матриксных металлопротеиназ (Matrix Metalloproteinases – MMPs) [4]. Их набор имеет высокую тканевую специфичность, что определяется типом белкового субстрата, а также клеточным составом ткани, где происходит синтез, секреция и инактивация этих ферментов. Нарушение баланса между процессами образования и деградации MMPs, а также появление в ткани новых, несвойственных ей матриксных протеолитических белков часто ассоциируется с глубокой структурной патологией. С дисбалансом в тканевом наборе и биохимической активности MMPs связывают, в частности, развитие таких заболеваний, как эндометриоз, аденокарцинома эндометрия, миома матки и др. [2, 7, 8]. Выявление клеточной локализации,

распространенности, активности и набора MMP и их ингибиторов в тканях женских половых органов, по мнению ряда авторов, может являться дополнительным морфохимическим критерием уточнения глубины и стадии ряда патологических процессов и выбора адекватной лечебной тактики [1, 14].

В большинство современных работ, посвященных исследованию активности MMPs при аденомиозе, описывается их протеолитическая активность в тех участках ткани, где морфологические изменения максимально выражены, в частности – в гетеротопических узлах эндометриоидной ткани [2, 13]. Вместе с тем существует предположение, что риск эктопии эндометрия во многом определяется морфохимическими особенностями самой ткани и может зависеть от протеолитических свойств ферментов межклеточного матрикса и их способности разрушать окружающие структуры [2, 9]. В этой связи выявление дисбаланса в активности MMPs в участках миометрия с начальными признаками заболевания может не только помочь в ранней диагностике, но и приблизить к пониманию фундаментальных механизмов данной патологии. В настоящей работе изучена локализация некоторых типов MMPs (14 и 17) в тканях эутопического эндометрия женщин с внутренним эндометриозом.

Материал и методы. Работа выполнена на базе отделения гинекологии и эндоскопической хирургии Краевого клинического центра специализированных видов медицинской помощи (г. Владивосток). Объектом исследований послужили 20 женщин фертильного возраста (32,8±4,9 года), обратившихся по поводу дисфункциональных маточных кровотечений и бесплодия. Внутренний эндометриоз был диагностирован при проведении гистероскопии и ультразвукового исследования. Контрольную группу составили 18 пациенток сопоставимого возраста (34,0±5,3 года) без признаков эндометриоза, имевшие беременности в анамнезе.

Обследование проводилось в рамках комплексной подготовки к экстракорпоральному оплодотворению. Женщины обеих групп не получали противовоспалительного и гормонального лечения за 6 месяцев до хирургического вмешательства. Пациентки были осведомлены о проводимом исследовании, от каждой из них получено информированное согласие, все лабораторные данные зафиксированы в их историях болезни.

Лабораторные методы включали исследование гормонального профиля в первую фазу менструального

цикла (5–7-е сутки), биохимических маркеров печени, гемостазиограммы. Уровень гормонов в сыворотке крови и биохимические показатели были в пределах нормы за исключением 5 пациенток из контрольной группы с избыточной массой тела: у них диагностирована относительная гиперэстрогения. В гемостазиограммах патологии не выявлено.

Забор материала для гистологического и иммуногистохимического исследования (биопсия или выскабливание слизистой оболочки матки) был осуществлен в фазу ранней пролиферации (5–10-й день менструального цикла). Биопсия выполнялась стерильной пайпель-кюреткой (Unimar Inc., Prodimed, Neuilly-en-Thelle, France). Цуг эндометрия у женщин с эндометриозом забирался кюреткой № 2 в условиях операционной под внутривенным обезболиванием и контролем гистероскопии. Для последующего анализа прицельно отбирались образцы ткани, расположенные в зоне максимально выраженных патологических изменений. Материал был зафиксирован в растворе 4% забуференного параформальдегида при температуре 4°C и после 5–6-кратной промывки в 50мМ фосфатном буфере (рН 7,2) заливался в парафин по общепринятой методике.

Для иммунопероксидазной реакции использованы первичные антитела против MMP14 (rabbit polyclonal, ab53712, Abcam, 1:100) и MMP17 (rabbit monoclonal, ab51075, Abcam, 1:100). Иммуногистохимическая реакция проводилась на парафиновых срезах толщиной 10 мкм согласно стандартной методике. Использовались видо-специфические биотинилированные вторичные антитела, стрептавидин-пероксидаза (Thermo Scientific) и хромоген (Peroxidase Substrate Kit, Vector NovaRED, SK-4800). Количественная оценка оптической плотности преципитата реакции осуществлялась на срезах без последующего докрасивания. Для анализа морфологических изменений тканей и подсчета числа иммунопозитивных элементов некоторые «параллельные» препараты после обработки хромогеном докрасивались гематоксилином и эозином.

Для оценки тканевого распределения и активности иммунопероксидазной реакции использовали методы количественного и полуколичественного анализа. Об уровне активности ферментов в образцах эндометрия судили по абсолютному и относительному количеству MMP-позитивных клеток в тканевых структурах и оптической плотности продукта иммуногистохимической реакции. Подсчет клеток выполнялся на каждом срезе в 10 неперекрывающихся полях зрения при 400-кратном увеличении. Плотность преципитата определяли с использованием программы ImageJ 4.0 после получения изображения с помощью камеры AxioCam ICc3 Rev.3 (Carl Zeiss) на срезах, не докрашенных гематоксилином и эозином.

Для сравнительной оценки изменений активности ферментов при железистой гиперплазии использовали метод полуколичественного анализа на основе так называемой шкалы иммунореактивности (ШИ) [1, 13]. Для этого первоначально ранжировали образцы по

процентному содержанию иммунопозитивных клеток на 5 групп (от 0 до 4). В группу 4 включали образцы, в которых количество таких клеток было более 80% от общей клеточной популяции, в группу 3 – от 51 до 80%, в группу 2 – от 10 до 50%, в группу 1 – меньше 10% и в группу 0 – образцы, не содержавшие продукта иммуногистохимической реакции. Сходным образом ранжировались показатели оптической плотности преципитата с выделением 3 групп: группа 1 – слабо окрашенные (меньше 20 ЕОП), группа 2 – умеренно окрашенные (21–50 ЕОП) и группа 3 – интенсивно окрашенные (более 50 ЕОП). В дальнейшем для каждого образца показатели количества окрашиваемых клеток умножали на показатели плотности продукта реакции, получая показатели иммунореактивности по ШИ.

Результаты исследования. У 6 пациенток с признаками аденомиоза выявлена простая, у 14 – сложная железистая гиперплазия эндометрия. У всех женщин группы контроля диагностирован хронический эндометрит в стадии ремиссии.

У женщин без признаков аденомиоза наблюдалось очаговое распределение MMP14 (с минимальной активностью) в стромальных клетках. Наряду с участками, полностью лишенными иммуноцитохимического окрашивания, в одном и том же образце ткани встречаются группы более интенсивно окрашенных клеток. В последнем случае фермент демонстрировал мелкозернистое расположение в цитоплазме или локализовался в субмембранной зоне. Во всех случаях эпителиоциты маточных желез и сосуды метку не содержали (рис., а).

При эндометриоидном повреждении матки признаки активации фермента проявлялись его экспрессией, в первую очередь – в эндотелии артерий (рис., б). Такое распределение фермента было характерно для эндометрия с признаками простой гиперплазии. В случае развития сложной железистой гиперплазии при аденомиозе продукт иммуногистохимической реакции регистрировался не только в интимах сосудов, но и в эпителиоцитах желез и единичных клетках стромы.

В соответствии с данными ШИ (табл.), экспрессия MMP14 была наиболее выражена в элементах микроциркуляторного русла и прямо коррелировала с выраженностью патоморфологического процесса в аутопическом эндометрии.

Таблица
Динамика активности MMP14 и MMP17 в клеточных элементах эндометрия женщин при развитии аденомиоза

Состояние эндометрия	Баллы по ШИ					
	MMP14			MMP17		
	железы	строма	сосуды	железы	строма	сосуды
Простая гиперплазия	0	0,5	1,25	1,25	2,00	2,75
Сложная гиперплазия	0,40	1,20	0,80	1,20	1,80	2,00
Контроль	0	2,00	0	0	0	0

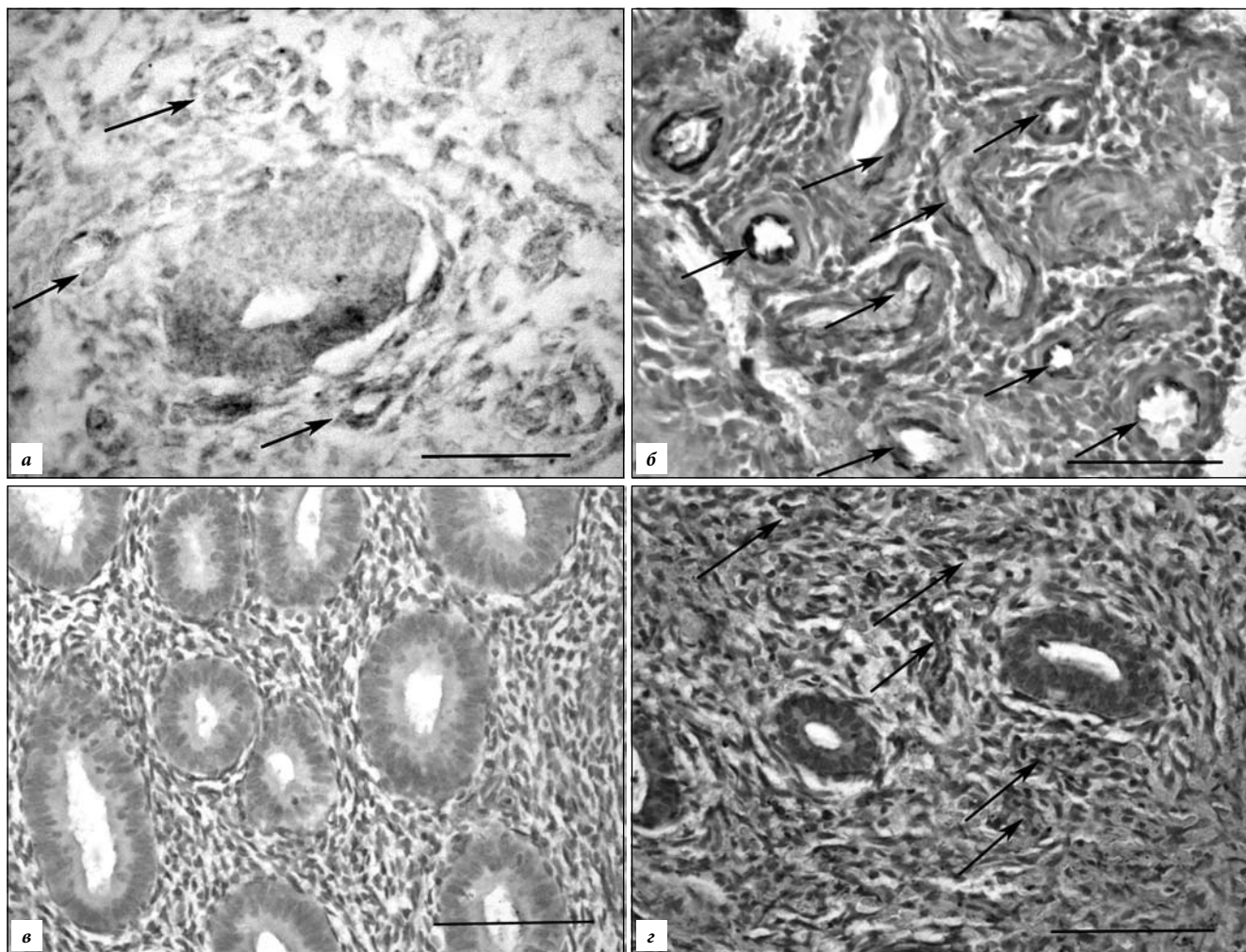


Рис. Локализация MMPs в эутопическом эндометрии:

а – MMP14, контроль; *б* – MMP14, эндометриоз; *в* – MMP17, контроль; *г* – MMP17, эндометриоз. Масштаб: *а*, *б* – 50 мкм, *в*, *г* – 100 мкм. Иммунопозитивные клетки отмечены стрелками (пояснения в тексте).

В эндометрии здоровых женщин окраска на MMP17 полностью отсутствовала (рис., в). В образцах гиперпластичного эндометрия женщин с аденомиозом наибольшую активность этой иммуногистохимической реакции демонстрировали спиральные артерии базального слоя, где фермент локализовался в клетках интимы (рис., г). О высокой активности фермента в эндотелии свидетельствует тот факт, что 40,6% эндотелиоцитов содержали MMP17. Зачастую, в стромальной ткани встречались экстраклеточные скопления гранул иммунопозитивного материала. Такое распределение может быть характерно для дегранулировавших тучных клеток, в ряде случаев такие MMP17-позитивные гранулярные комплексы располагались вблизи от кровеносных сосудов.

Эпителиальный компонент эндометрия характеризовался весьма неоднородным распределением фермента: профили рядом расположенных желез могли значительно отличаться по его наличию и активности. Ряд желез не содержал фермента вообще, в то же время встречались железы, содержавшие большое число MMP17-позитивных эпителиоцитов (здесь до 36,7%).

В glanduloцитах фермент имел исключительно субмембранное расположение в клетках призматической формы. Отчетливых различий в активности MMP17 у женщин с простой и сложной гиперплазией эутопического эндометрия не обнаружено. При этом, несмотря на неоднородную активность фермента в пределах одного среза, общая иммунореактивность органа при развитии гиперплазии значительно повышалась, причем во всех клеточных элементах – железах, строме и сосудах (табл.).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, иммуногистохимическая активность ферментов межклеточного матрикса в эутопическом эндометрии женщин с аденомиозом имела значительные количественные и качественные отличия от эндометрия женщин контрольной группы. Это свидетельствует о том, что развитию заболевания может способствовать повышенная протеолитическая активность эутопического эндометрия.

До настоящего времени вопрос о ранней диагностике аденомиоза остается открытым и является предметом активного исследования многих отечественных

и зарубежных авторов. Причина формирования эндометриальных гетеротопий не в полной мере может быть объяснена существующими трактовками патогенеза заболевания – теории ретроградного заброса менструальной крови, теории дисэмбрионального развития, теории гормонального и иммунологического дисбаланса и др. [9]. К настоящему времени накоплено большое число клинических и экспериментальных наблюдений, свидетельствующих о том, что возможность инвазивного роста эндометрия обусловлена свойствами самой эутопической ткани и в первую очередь – активностью протеолитических ферментов ее межклеточного матрикса.

Данные проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что эта теория не лишена основания. Показано, что эутопический эндометрий женщин с диагностированным аденомиозом характеризуется рядом признаков, отличающих его от эндометрия здоровых женщин в сходной стадии овариально-менструального цикла (фаза ранней пролиферации).

В настоящем исследовании изучалась локализация ферментов межклеточного матрикса (ММР14 и ММР17), имеющих, по данным литературы, большой ангиогенный потенциал в условиях физиологического или репаративного морфогенеза, а также при опухолевом росте [5, 7, 8, 12].

Мембранносвязанный фермент ММР14 в образцах эндометрия, полученных от пациенток с аденомиозом, демонстрировал отчетливую активацию в элементах сосудистого русла на фоне снижения активности в стромальных клетках. К настоящему времени данные о функциях этого вещества в женских половых органах достаточно немногочисленны [11]. Известно, что высокосоординированные во времени и пространстве взаимодействия ММР14 с другими типами матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов имеют принципиальное значение для успешного пре- и постнатального органогенеза, репарации и регенерации [3]. Деятельность этого протеина тесно связана с активностью другой матриксной металлопротеиназы – ММР2 – которая в свою очередь считается одним из важнейших факторов инвазии при любом пролиферативном процессе [10].

Известно, что посредником ММР14 в обеспечении роста сосудов является сосудистый эндотелиальный фактор роста, экспрессия которого повышается в присутствии этой протеиназы [15]. В настоящей работе показано, что локализация ММР14 в эндометрии соответствует месту расположения и образования элементов кровеносного русла в его функциональном слое. Можно предполагать, что активация данного фермента при развитии патологического процесса в эндометрии может отвечать за трофическое обеспечение растущей ткани за счет усиления ее кровоснабжения.

Высокую экспрессию в сосудах эндометрия при аденомиозе продемонстрировал в нашем исследовании и другой мембранно-связанный протеин – ММР17, – активность которого также связывают с усилением

ангиогенеза и оптимизацией кровотока при гиперплазиях и дисплазиях различных тканей [5]. В отличие от ММР14 его сигнальные эффекты не зависят от других типов матриксных металлопротеиназ, а опосредованы цитокинами [6]. Вместе с тем при внутреннем эндометриозе, как показано в нашем исследовании, локализация и активность данного фермента приурочена не только к элементам сосудистого русла, но также наблюдается в glanduloцитах и стромальных клетках. В этой связи нельзя исключать сигнальную роль ММР17 в регуляции пролиферации функционального слоя эндометрия.

Таким образом, ткани эутопического эндометрия у женщин с аденомиозом характеризуются измененным профилем активности некоторых MMPs. Ряд проведенных ранее исследований показал, что развитию данной патологии могут способствовать некоторые протеиназы, секретируемые клетками маточных желез, интерстициальными фибробластоподобными клетками, а также макрофагами и моноцитами крови – ММР2, ММР9 [2, 10, 12]. В настоящей работе было установлено, что MMPs, секретируемые элементами сосудистой стенки, могут иметь важное патогенетическое значение в развитии данной патологии. Наряду с гормон- и цитокин-опосредованными изменениями в пролиферативной активности клеточных элементов, ферменты межклеточного матрикса также могут изменять опорные и сигнальные свойства ткани, создавая благоприятные предпосылки для развития эндометриоидной гетеротопии.

References

1. Kogan E.A., Unanyan A.L., Demura T.A. [et al.] Clinical and morphological parallels and molecular aspects of adenomyosis // *Archives of Pathology*. 2008. No. 5. P. 8–12.
2. Collette T., Bellehumeur C., Kats R. [et al.] Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9 // *Human Reproduction*. 2004. Vol. 19, No. 6. P. 1257–1264.
3. Coyle R.C., Latimer A., Jessen J.R. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates cell migration during zebrafish gastrulation: Evidence for an interaction with non-canonical Wnt signaling // *Experimental cell research*. 2008. No. 314. P. 2150–2162.
4. Curry J.T.E., Osteen K.G. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus // *Biology of Reproduction*. 2001. No. 64. P. 1285–1296.
5. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat Rev Cancer*. 2002. No. 2. P. 161–174.
6. English William R., Xose S., Jose M.P. [et al.] Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor- α convertase activity but does not activate pro-MMP2 // *The Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, No. 19. P. 14046–14055.
7. Freitas S., Meduri G., Le Nestour E. Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium // *Biology of Reproduction*. 1999. No. 61. P. 1070–1082.
8. Gilibert-Estelle J., Estelle A., Gilibert J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis // *Human Reproduction*. 2003. Vol. 18, No. 7. P. 1516–1522.
9. Giudice L.C., Tazuke S.I., Swiersz L. Status of current research on endometriosis // *Journal Reprod Me*. 1998. No. 43. P. 252–262.

10. Holmbeck K., Bianco P., Yamada S. [et al.] MT1-MMP: a tethered collagenase // *Journal of Cellular Physiology*. 2004. No. 200. P. 11–19.
11. Laudanski P., Szamatowicz J., Ramel P. Matrix metalloproteinase-13 and membrane type-1 matrix metalloproteinase in peritoneal fluid of women with endometriosis // *Gynecological Endocrinology*. 2005. Vol. 21, No. 2. P. 106–110.
12. Machado D.E., Berardo P.T., Palmero C.Y. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2010. Vol. 29, No. 4. P. 1–9.
13. Marion W., Kramer J., Schem C. [et al.] Differential expression of MMP-2, MMP-9 and PCNA in endometriosis and endometrial carcinoma // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2012. No. 160. P. 74–78.
14. Roopali R., Yang J., Moses M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer // *Journal Oncology*. 2009. Vol. 27, No. 31. P. 5287–5297.
15. Sounni N.E., Devy L., Hajitou A. [et al.] MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression // *FASEB Journal*. 2002. No. 16. P. 555–564.

Поступила в редакцию 02.12.2014.

Матриксные металлопротеиназы 14 и 17 как факторы ревазуляризации при аденомиозе

Е.В. Ткачева¹, М.З. Горелик², И.В. Дюйзен¹

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ² Приморское краевое патологоанатомическое бюро (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 4)

Резюме. С помощью иммуногистохимического метода изучали локализацию матриксных металлопротеиназ (ММП) в аутопическом эндометрии женщин с аденомиозом. Обнаружены селективные изменения тканевой локализации и активности ММП14 и ММП17 по сравнению с контрольными образцами эндометрия здоровых женщин в сходной стадии овариально-менструального цикла. В соединительной ткани эндометрия при аденомиозе нарастала активность ММП14, в стенке кровеносных сосудов экспрессировались ММП14 и ММП17, а в клетках маточных желез появилась несвойственная данной стадии цикла ММП17. В совокупности данные изменения могут нарушать опорные и сигнальные свойства ткани, создавая благоприятные предпосылки для эндометриозной гетеротопии.

Ключевые слова: внутренний эндометриоз, матка, протеолитические ферменты, шкала иммунореактивности.

УДК 616.36-002:615.9-085.244/.246.2:615.014.425

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ КОМПОЗИЦИИ ЭНТЕРОСОРБЕНТА И ПРИРОДНОГО АНТИОКСИДАНТА

Н.В. Плаксен, Л.В. Устинова, С.В. Степанов, А.А. Трофимова, Н.Я. Горовая

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: энтеросгель, *Vaccinium praestans*, красника, токсический гепатит.

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF THE COMPOSITION OF NATURAL ANTIOXIDANT AND ENTEROSORBENT

N.V. Plaksen, L.V. Ustinova, S.V. Stepanov, A.A. Trofimova, N.Y. Gorovaya

Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. To reduce the endogenous intoxication syndrome at toxic liver disease in medical practice chelators, including enterosjell, are used. To enhance the effect of enterosjell it is possible to use natural antioxidants.

Methods. In the experiment on mongrel male rats toxic hepatitis was simulated. The biochemical parameters of blood plasma and liver were studied in the background enteral injection of enterosjell, of syrup from the juice of Kamchatka bilberry and their composition: enterosjell and syrup from the juice of Kamchatka bilberry.

Results. The experimental results show a decrease in the intensity of free radical oxidation and biochemical indices normalization when intake of the antioxidant composition of enterosorbent operating more efficiently than its components separately.

Conclusions. The syrup from the juice of Kamchatka bilberry has such an effect due to the presence of the biologically active substances in the *Vaccinium praestans*. The results are an experimental justification of the use of enterosorbent with biologically active food supplements as a preventive or therapeutic agent for a subsidiary toxic hepatitis.

Keywords: enterosjell, *Vaccinium praestans*, Kamchatka bilberry, toxic hepatitis.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2, p. 73–75.

Плаксен Наталья Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры фармации ТГМУ; e-mail: natalya.plaksen@mail.ru

Организм человека сталкивается с огромным количеством чужеродных и токсических веществ, которые могут стать причиной заболеваний, в том числе токсического гепатита. Энтеросорбция в клинической гепатологии имеет значительные преимущества перед другими методами детоксикации [4]. Доказано, что регулярное употребление энтеросорбентов оказывает положительное влияние на общее состояние и качество жизни современного человека. Так, кремнийорганический энтеросорбент (энтеросгель), кроме избирательного связывания токсинов, обладает и мембраностабилизирующим действием.

Развитие токсических гепатитов неизменно сопровождается синдромом эндогенной интоксикации [4]. Под влиянием гепатотропных ядов инициируется перекисное окисление липидов, нарушается энергообеспечение клеток печени, возрастает активность лизосомальных гидролаз, что ведет к ухудшению функционального состояния органа, его способности обезвреживать яды и поступлению в системный кровоток большого количества токсических для организма соединений.

Ранее на базе кафедры фармации Тихоокеанского государственного медицинского университета проводилось исследование на выявление гепатопротекторного действия сиропа из плодов красники