

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТКАНЕВОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПРИ ГЕТЕРОГЕННЫХ ФОРМАХ АДЕНОМИОЗА

С.А. Леваков<sup>1</sup>, А.П. Коробейников<sup>2</sup>, Т.А. Демур<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГУЗ Клиническая больница № 83 ФМБА России,

<sup>2</sup>Кафедра акушерства и гинекологии ФГОУ ДПО ИГК ФМБА, Москва

<sup>3</sup>ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Росмедтехнологий, Москва

Изучали ферментативную активность матричных металлопротеиназ (ММП) 2 и 9 в операционном материале (ампутированные матки) по поводу диффузной и узловой форм аденомиоза у женщин в позднем репродуктивном периоде. Исследование проводили с использованием иммуногистохимического метода на парафиновых срезах. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом в баллах по числу позитивно окрашенных клеток. Показано усиление активации и экспрессии желатиназ ММП-2 и ММП-9 при диффузной и узловой формах аденомиоза и различных степенях поражения миометрия. Также установлено, что при диффузной и узловой формах аденомиоза в строме и миометрии экспрессия желатиназы ММП-9 была интенсивнее.

*Ключевые слова:* матричные металлопротеиназы, желатиназы, аденомиоз, миома матки, эндометрий

### RESEARCH OF TISSUE ACTIVITY OF METALLOPROTEINASES AT VARIOUS FORMS OF AN ADENOMYOSIS

S.A. Levakov, A.P. Korobeinikov, T.A. Demura

Enzymatic activity matrix metalloproteinase's 2 and 9 in an operational material (the amputated uterus) concerning diffusive and nodal forms of an adenomyosis at women in the late genesial period was studied. Research was spent with use of an immunohistochemical method on paraffinic sections. Results of immunohistochemical reaction were estimated by a semiquantitative method in points by quantity of positively painted cells. Activation and expression intensifying gelatinase MMP-2 and MMP-9 has been shown at diffusive and nodal forms of an adenomyosis and their various degrees of a lesion of a myometrium. Also it has been shown, that in a stroma and myometriums at diffusive and nodal forms of an adenomyosis the expression gelatinases MMP-9 was more intensively.

*Key words:* matrix metalloproteinase's, gelatinize, adenomyosis, hysteromyoma, endometrial

Среди значительных достижений нашего времени особое место занимает открытие универсальной роли процессов протеолиза в регуляции различных сторон жизнедеятельности организма. Протеолитические ферменты являются одним из механизмов контроля функций органов и тканей. Эти ферменты имеют регуляторное значение для молекулярных механизмов тонких биологических процессов, таких как деление клеток, дифференцировка и морфогенез.

Семейство матричных металлопротеиназ – это группа родственных по структуре цинк-содержащих эндопептидаз, разрушающих базальные мембраны и внеклеточ-

ный матрикс при физиологических и патологических условиях [1].

В гинекологической практике одним из наиболее часто встречающихся заболеваний, связанных с перестройкой соединительной ткани, является эндометриоз [2]. Эктопический рост эндометрия при эндометриозе представляет собой инвазивное событие, при котором происходит дегградация базальных мембран и экстрацеллюлярного матрикса. Роль желатиназ в патофизиологии эндометриоза еще недостаточно изучена. Некоторыми исследованиями установлено их участие в прогрессировании этого заболевания [3, 4].

Раннее показано, что экспрессия ММП-2 в эктопических тканях эндометрия значительно повышается по сравнению с нормальными тканями.

Форма генитального эндометриоза, когда гетеротопии эндометриоидной ткани обнаруживаются в миометрии, называется аденомиозом [5].

Аденомиоз представляет одну из наиболее острых проблем современной гинекологии, занимая третье место после воспалительных процессов и миомы матки. Отмечается рост этого заболевания в структуре гинекологической патологии [6].

Макроскопически аденомиоз проявляется увеличением тела матки и гиперплазией эндометрия. В зоне эндометриоза возможно также образование кистозных полостей с геморрагическим содержимым или формирование узловых элементов с преобладанием стромальной эндометриоидной ткани. Наиболее распространенными видами аденомиоза на данный момент являются диффузный и узловой.

На основании имеющихся сведений можно полагать, что в развитии и прогрессировании аденомиоза определенную роль играет измененная в силу различных обстоятельств протеолитическая активность тканей. Все изложенные факты позволили нам предположить, что при аденомиозе также возможно изменение тканевой активности матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) [7].

**Целью исследования** явилось изучение тканевой активности матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) при различных формах аденомиоза.

#### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на операционном материале (ампутированные матки), полученном от 45 пациенток позднего репродуктивного возраста с верифицированным диагнозом диффузной и узловой форм аденомиоза. Средний возраст пациенток –  $45,5 \pm 3,3$  года.

Контрольную группу составили 18 наблюдений – женщин позднего репродуктивного возраста (средний возраст –  $43,5 \pm 3,3$

года) с миомой матки. Исследован операционный материал – удаленные матки. Во всех наблюдениях оценивали ферментативную активность ММП-2 и ММП-9, активность равнялась 0,35 и 1,05 соответственно.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) выполнено на операционном материале от пациенток с аденомиозом, отобранном по результатам изучения морфологии. В исследование включены 20 пациенток преимущественно с узловой формой аденомиоза высокой степени активности и 25 больных – с диффузной формой аденомиоза.

В настоящей работе из всего многообразия ММП объектом для исследования выбраны ММП-9 и ММП-2. Это связано с тем, что желатиназа ММП-9 имеет наибольшую протеолитическую активность в отношении разных типов коллагена (включая коллаген IV типа, ламинин и эластин), а также компонентов базальных мембран [8].

Послеоперационный материал окрашивался для иммуногистохимического метода.

Демаскировку антигенов для ИГХ проводили в микроволновой печи. Стекла погружали в цитратный буфер (рН 6,0) и нагревали в микроволновой печи в течение 15 мин при мощности 600 Вт.

После этого стекла остывали 20 мин при комнатной температуре. Остывшие стекла перемещали во влажные камеры (для предотвращения высыхания срезов) и инкубировали 15 мин с 3% раствором  $H_2O_2$ . После обработки перекисью стекла ополаскивали в фосфатном буфере (рН 7,0-7,6). Далее стекла инкубировали с 1% раствором альбумина во влажных камерах в течение 30 мин. По окончании инкубации излишки альбумина аккуратно стряхивали со стекол и раскапывали первичные антитела. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к ММП-2 и ММП-9 (Lab Vision, Ready-to-use 7 ml). Срезы инкубировали с первичными антителами 30 мин. Затем стекла отмывали в фосфатном буфере (рН 7,0-7,6) от первичных антител, не связавшихся с эпитопами, и обрабатывали вторичными антителами

(Ultra V HRP polymer KIT Lab Vision). Для визуализации места связывания антигена с антителом использовали метку – пероксидазу хрена в присутствии субстрата пероксида водорода и колориметрического реактива с 3,3-диаминобензидином (DAB substrate+chromogen Lab Vision). В результате образовывался нерастворимый в органических растворителях конечный продукт реакции, который обнаруживался в виде коричневого окрашивания. Для облегчения определения локализации антигенов в тканях проводили доокраску ядер гематоксилином. Ставили положительные контрольные реакции на срезах от фирмы-производителя антитела с известным распределением маркера и отрицательные контрольные реакции – на срезах исследуемых тканей без специфических первичных антител.

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом в баллах по количеству позитивно окрашенных клеток. Оценку интенсивности реакции для ММП-2 и ММП-9 проводили по 6-балльной системе: 2 балла – до 20% окрашенных клеток; 4 балла – от 20 до 40% окрашенных клеток; 6 баллов – более 40% окрашенных клеток.

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты иммуногистохимических реакций показали, что активность экспрессии ММП-2 в биоптатах миометрия в наблюдениях с диффузной формой аденомиоза достоверно отличалась ( $p < 0,03$ ) от активности в эпителии (3,5 балла) и строме (2,4 балла). Активность ММП-2 при узловой форме была оценена в 3,1 балла в эпителии и 2,3 балла в строме. Аналогичная активность ММП-2 наблюдалась в эндотелии (4,1 балла) и в миометрии 1,1 балл, против 4,4 баллов в эндотелии и 1,3 баллов в миометрии (рис.1).

Активность экспрессии ММП-9 в эндотелии, в эпителии, в миометрии была выражена как при диффузной (в разной степени), так и при узловой формах во всех наблюдениях; средний балл составил 5,2, достовер-

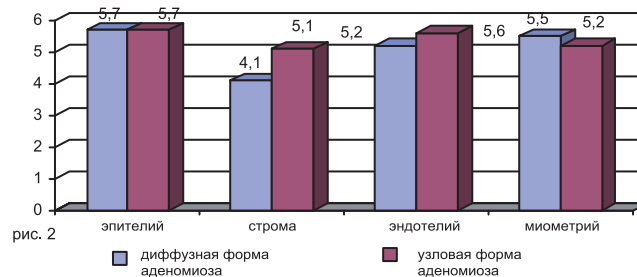
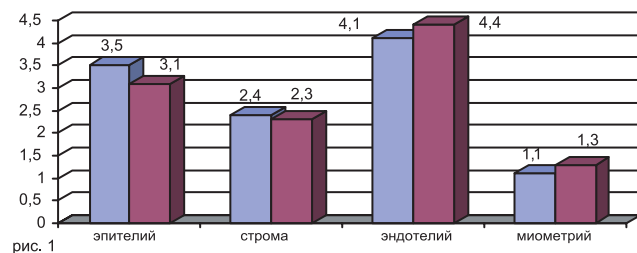


Рис. 1. Активность экспрессии ММП-2 в тканях матки при аденомиозе

Рис. 2. Активность экспрессии ММП-9 в тканях матки при аденомиозе

ных различий не отмечено ( $p > 0,05$ ). Уровень экспрессии ММП-9 был выше в строме биоптатов с узловым аденомиозом ( $5,1 \pm 0,5$  баллов), чем при диффузной форме ( $4,1 \pm 0,7$  баллов) и достоверно различались между собой ( $p < 0,02$ ) (рис. 2).

Проведенное иммуногистохимическое исследование активности экспрессии протеолитических ферментов в тканях матки при различных формах и степенях аденомиоза свидетельствует о том, что ММП-2 и ММП-9 активно участвуют в патогенезе как при диффузных, так и узловых формах аденомиоза. Однако активность экспрессии ММП-9 была выше ( $p < 0,02$ ) и в стромальном компоненте, и в миометрии при диффузной и узловой формах аденомиоза (табл. 1).

### Заключение

По результатам проведенного иммуногистохимического исследования тканей матки можно сделать выводы, что усиление активности металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в тканях коррелирует с усилением патологической трансформации стромального компонента и миометрия.

Активация экспрессии желатиназ (ММП-2 и ММП-9) при диффузной и узловой формах аденомиоза и их различных степенях поражения миометрия достоверно не различались ( $p < 0,05$ ). Следует

Таблица 1

**Тканевая активность матричных металлопротеиназ в матке  
при различных формах аденомиоза в баллах, M±m**

Группы	Эпителий		Строма		Эндотелий		Миометрий	
	ММР-2	ММР-9	ММР-2	ММР-9	ММР-2	ММР-9	ММР-2	ММР-9
Диффузная форма аденомиоза (n=25)	3,5	5,7	2,4	4,0	4,1	5,2	1,1	5,5
Узловая форма аденомиоза (n=20)	3,1	5,7	2,7	5,1	4,4	5,6	1,3	5,2
Контрольная группа (n=18)	0,35	1,05	0,35	1,05	0,35	1,05	—	—

отметить, что в строме и миометрии при диффузной и узловой формах аденомиоза экспрессия желатиназы ММР-9 была более выраженной и достоверно отличалась от экспрессии ММР-2: 5 и 2 балла соответственно ( $p < 0,02$ ).

### Литература

1. Newby AC. Studying mechanisms underlying shedding of endothelial membrane proteins could help patients at risk for myocardial infarction // *Cardiovasc Res.* 2005 Jul 1;67(1):4-5.

2. Баскаков В.П., Цвелев Ю.В. Кира Е.Ф. Эндометриодная болезнь. СПб: ООО "Издательство Н-Л", 2002. С 136-141.

3. Борзенкова И.П. Экспрессия матричных металлопротеиназ в эндометрии при генитальном эндометриозе // XXX Юбилейная итоговая конф. молодых ученых. 2008. С. 50-52.

4. Стрижов Н.В., Сухих Г.Т., Соболева Г.М. и соавт. Сравнение сывороточной активности матричной металлопротеиназы-2 у больных с железистой и железисто-кистозной гиперплазиями эндометрия в перименопаузе // *Проблемы ре-*

Таким образом, обработка кривой алгоритма активации экспрессии ММР-9 в биоптатах миометрия при различных формах аденомиоза может служить ранним маркером трансформации стромы и миометрия при аденомиозе.

продукции. Спец. выпуск. 2008. С. 312-313.

5. Адамян Л.В., Кулаков В.И. Эндометриозы. Руководство для врачей. М: Медицина, 1998. 380 с.

6. Бурлев В.А., Лец Н.И. Роль брюшины в патогенезе наружного генитального эндометриоза: обзор литературы // *Проблемы репродукции.* 2000. № 1. С. 25-29.

7. Волощук И.Н., Ромаданова Ю.А., Ищенко А.И., Бахвалова А.А. Молекулярно-биологические аспекты патогенеза аденомиоза // *Архив патологии.* 2007. № 3. С. 56-60.

8. Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates // *Cardiovasc Res.* 2006 Feb 15;69(3):614-24.

#### Контактная информация:

Леваков Сергей Александрович,  
Заведующий отделением гинекологии ФГУЗ КБ № 83 ФМБА России, д.м.н., профессор,  
Адрес: 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28 ФГУЗ КБ № 83 ФМБА России  
Кафедра Акушерства и гинекологии. Тел.: (495) 395 05 44, e-mail: levakoff@ya.ru

Коробейников Алексей Петрович  
к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ИПК ФМБА России  
Адрес: 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28 ФГУЗ КБ № 83 ФМБА России  
Кафедра Акушерства и гинекологии. Тел.: (495) 395 05 44, e-mail: alpkor@ya.ru