



Гриневич Т.Н. ✉, Ляликов С.А., Дулевич А.С.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Анализ распределения частот и иммуногистохимические особенности экспрессии матриксных металлопротеиназ второго типа (ММР-2) в препаратах плацентарной ткани у женщин с привычным невынашиванием беременности

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – Т.Н. Гриневич, С.А. Ляликов; иммуногистохимическое, морфологическое исследования – А.С. Дулевич.

Подана: 04.04.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: tgrinevich@yandex.by

Резюме

Формирование плаценты является инвазивным процессом и неотъемлемо связано с преобразованием базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса, в котором принимает участие целый ряд ферментов, в том числе система матриксных металлопротеиназ.

Цель. Изучить распределение частот генотипов генов матриксной металлопротеиназы второго типа и иммуногистохимические особенности их экспрессии в плацентарной ткани у женщин с ранними репродуктивными потерями и привычным невынашиванием беременности в анамнезе.

Материалы и методы. В исследуемую группу включены 26 пациенток с привычным невынашиванием беременности и ранними репродуктивными потерями в анамнезе и 23 женщины с 3 и более физиологическими родами. В работе использованы современные молекулярно-биологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования.

Результаты. Данные анализа распределения частот металлопротеиназ второго типа и иммуногистохимические особенности экспрессии их в плацентарной ткани выявили различия между группами женщин с привычным невынашиванием беременности и физиологически протекающей беременностью.

Выводы. Анализ генотипов системы матриксных металлопротеиназ может использоваться в клинической практике для оценки имплантационного процесса во время беременности, нарушение которого зачастую является основной причиной невынашивания на ранних сроках гестации.

Ключевые слова: привычное невынашивание, матриксные металлопротеиназы, полиморфизм, экспрессия генов

Grinevich T. ✉, Lyalikov S., Dulevich A.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Analysis of the Frequency Distribution and Immunohistochemical Features of the Expression of Matrix Metalloproteinases of the Second Type (MMP-2) in Preparations of Placental Tissue in Women with Recurrent Miscarriage

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design, material collection, processing, writing text – Grinevich T., Lyalikov S.; immunohistochemical, morphological studies – Dulevich A.

Submitted: 04.04.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: tgrinevich@yandex.by

Abstract

The formation of the placenta is an invasive process and is inherently associated with the transformation of the basement membrane and the extracellular matrix. A number of enzymes take part in this process including the system of matrix metalloproteinases.

The objective of this study was to study the frequency of genotypes of matrix metalloproteinase type 2 genes and immunohistochemical features of their expression in placental tissue in women with early reproductive losses and a history of recurrent miscarriage.

Materials and methods. The study group included 26 patients with recurrent miscarriage with a history of early reproductive losses and 23 women with three or more physiological deliveries. The work uses modern molecular biological, immunohistochemical and morphometric research methods.

Results. Data from the analysis of the frequency distribution of metalloproteinases of the second type and the immunohistochemical features of their expression in the placental tissue revealed differences between groups of women with recurrent miscarriage and physiological pregnancy.

Conclusions. Analysis of the genotypes of the matrix metalloproteinase system can be used in clinical practice to assess the implantation process during pregnancy the violation of which is often the main cause of miscarriage in the early stages of gestation.

Keywords: recurrent miscarriage, matrix metalloproteinases, polymorphism, gene expression

■ ВВЕДЕНИЕ

Матриксные металлопротеиназы (ММР) представляют собой семейство цинкзависимых эндопептидаз, обладающих каталитической активностью в отношении белковых молекул и способных в связи с этим инициировать деградацию основных компонентов внеклеточного пространства [1–3]. Все ММР содержат в активном центре

ионы Zn^{2+} , для стабилизации молекулы необходимы ионы Ca^{2+} , кроме того, практически все MMP имеют в составе своей молекулы несколько доменов и функция каждого из них строго определена [4].

Сейчас известно более 30 металлопротеиназ, которые разделены в зависимости от субстратной специфичности и функционально-структурных особенностей на 6 разных подсемейств: коллагеназы (MMP-1, -8, -13, -18), желатиназы (MMP-2 и -9), стромелизины (MMP-3, -10), матрилизины (MMP-7 и -26), MMP мембранного типа (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) и группа других MMP (MMP-11, -12, -19, -20), секреция которых возможна лишь единичными типами клеток и тканей и лишь в определенных случаях [5, 6].

Значимая часть MMP секретируется клетками в виде неактивных ферментов и обнаруживается в малом количестве в обычных условиях, активация ферментов вызывает протеолитическое разрушение пептидов, окружающих клетку [7, 8]. Активность MMP контролируется ингибиторами тканевых металлопротеиназ (TIMP), которые могут блокировать разрушение экстрацеллюлярного матрикса. В настоящее время известно 4 типа TIMP (TIMP-1, -2, -3, -4) [9, 10]. Для нормального функционирования внеклеточного матрикса должен поддерживаться баланс между активностью MMP и механизмами их подавления. Любой дисбаланс в этом регулирующем механизме может оказать существенное влияние на состояние матрикса.

Продолжительное время основной и исключительной функцией металлопротеиназ считалось разрушение экстрацеллюлярного матрикса, но впоследствии стало известно, что MMP принадлежит и ряд других, не менее важных биологических значений, таких как участие в процессах иммунного ответа и регенерации тканей, эмбрио- и ангиогенезе, участие в развитии воспаления, а также роль в тканевом морфогенезе при развитии опухолей [11, 12].

В настоящее время доказано, что молекулы MMP и их ингибиторы TIMP играют критическую роль в обеспечении нормального функционирования плаценты. Основной их функцией является ремоделирование внеклеточного вещества структур последа во время беременности и родов, прежде всего при созревании шейки матки, разрыве плодных оболочек и отслойке плаценты [13]. Есть как минимум 3 клеточные линии в маточно-плацентарном интерфейсе, которые экспрессируют все MMP за исключением MMP-20: клетки трофобласта, стромальные клетки эндометрия и естественные клетки-киллеры.

MMP-2 и MMP-9 относятся к подсемейству желатиназ и являются наиболее изученными ферментами данного семейства, поскольку имеют ведущее значение в расщеплении коллагена IV, V типов, эластина, входящего в состав базальных мембран, денатурированного коллагена (желатина) и некоторых белков соединительнотканного матрикса [14–16]. Регуляция экспрессии желатиназ происходит, прежде всего, на транскрипционном уровне, в промоторном регионе гена, и зависит от влияния эндотелиальных факторов роста и цитокинов.

На ранних стадиях беременности MMP подготавливают среду для последующего вторжения в плацентарное ложе. Экспрессия MMP-2 в первые 6–8 недель доминирует над экспрессией MMP-9 с последующим снижением концентрации, тогда как экспрессия MMP-9 увеличивается с 8-й по 11-ю неделю и остается преобладающей желатиназой до конца беременности [17, 18]. Таким образом, MMP-2 играет главную роль в период имплантации трофобласта, а MMP-9 – во время инвазии. В свою

очередь, успешная инвазия трофобласта обеспечивает нормальное развитие тканей плаценты и эмбриона. При мутациях гена MMP-2 в терминальных ворсинах происходит снижение содержания коллагена IV типа в базальных мембранах, что, вероятно, может приводить к нарушению формирования фетоплацентарного барьера.

Экспрессия металлопротеиназ как диагностического маркера может быть оценена в биоптатах, сыворотке и других биологических жидкостях. Многие из представителей семейства MMP являются индуцибельными ферментами, следовательно, их уровни изменяются во время повреждения органа, что может потенциально коррелировать с различными воспалительно-деструктивными процессами. Поэтому изучение иммуногистохимических особенностей экспрессии матриксных металлопротеиназ непосредственно в плацентарной ткани может иметь ценность для оценки имплантационного процесса во время беременности, нарушение которого зачастую является основной причиной невынашивания на ранних сроках гестации.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение распределения частот генотипов генов матриксной металлопротеиназы второго типа и иммуногистохимических особенностей их экспрессии в плацентарной ткани у женщин с ранними репродуктивными потерями и привычным невынашиванием беременности в анамнезе.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи города Гродно». Всего было обследовано 49 женщин репродуктивного возраста. Из них 26 пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и ранними репродуктивными потерями (до 12 недель беременности) в анамнезе, составивших основную группу. Возраст обследуемых опытной группы – от 25 до 39 лет, медиана (Me) – 31 год, нижний квартиль (Q25) – 28 лет, верхний квартиль (Q75) – 35 лет. Критериями включения были привычное невынашивание беременности, т. е. присутствие в анамнезе женщины подряд 3 и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель и наличие информированного согласия на проведение исследования. Морфологическое исследование в этой группе проводилось на архивном материале (парафиновых блоках) последов и плацентарных площадок, полученных после спонтанно прервавшихся или ранее замерших беременностей.

Контрольную группу составили 23 женщины с 3 и более физиологическими родами в анамнезе. У женщин этой группы был благоприятный акушерский анамнез, отсутствовали самопроизвольные выкидыши и другие акушерские осложнения. Возраст женщин контрольной группы составил от 22 до 39 лет, медиана (Me) – 35 лет, нижний квартиль (Q25) – 31 год, верхний квартиль (Q75) – 39 лет. Контролем служили образцы хориальной ткани, взятые при искусственном аборте.

ДНК плаценты выделялась из срезов архивных тканей плаценты, фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки с использованием фирменного набора QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Выявление полиморфных вариантов генов (MMP-2 735 T/C, TIMP-2 418 G/C) в тканях плаценты выполнялось методом полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP).

Для морфометрического исследования использовали компьютерную систему анализа изображений. Телеметрическая установка включала цифровую видеокамеру, совместимый с ней световой микроскоп, персональный компьютер с установленной на его жесткий диск программой Photom131. Определяли площадь поверхности объектов в пикселях и в процентах, результаты измерений автоматически вносили в предварительно созданную таблицу для последующей статистической обработки.

Морфометрическая оценка включала измерение площади следующих структур плацентарной ткани: ворсин, стромы, сосудов, трофобластического эпителия ворсин и интервиллезного пространства. На основании полученных данных рассчитывали: 1) соотношение площади стромы к общей площади ($S_{\text{стр}}/S_{\text{общ}}$); 2) сосуристо-ворсинчатое соотношение ($S_{\text{с}}/S_{\text{в}}$); 3) сосуристо-стромальное соотношение ($S_{\text{с}}/S_{\text{стр}}$); 4) стромально-ворсинчатое соотношение ($S_{\text{стр}}/S_{\text{в}}$); 5) стромально-межворсинчатое соотношение ($S_{\text{стр}}/S_{\text{ив}}$); 6) сосуристо-межворсинчатое соотношение ($S_{\text{с}}/S_{\text{ив}}$); 7) соотношение площади межворсинчатого пространства к общей площади ($S_{\text{ив}}/S_{\text{общ}}$).

Патологические изменения плацентарной ткани, такие как острое полнокрое, тромбоз сосудов, отек, склероз, дистрофические изменения и наличие синцитиальных почек ворсин хориона, кровоизлияния в межворсинчатом пространстве, некрозы и кальцинаты, оценивали полуколичественно (в баллах от 0 до 3).

Иммуногистохимическое исследование проводилось по стандартной методике. Для оценки экспрессии матричных металлопротеиназ (MMP-2) в препаратах плацентарной ткани использовали первичные мышинные моноклональные антитела Anti-MMP2 antibody [6E3F8] (ab86607) Abcam (мышинные моноклональные 1:200). Уровень экспрессии MMP-2 оценивали полуколичественным способом в баллах: 0 – отрицательная реакция, 1 балл – слабо выражена, 2 балла – умеренно выражена, 3 балла – резко выражена интенсивность экспрессии.

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови для исследования полиморфизмов MTHFR 677 C/T, MTHFR 1298 A/C проводилось согласно инструкции производителя в асептических условиях с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-экспресс-кровь» (НПО «Литех»). Определение однонуклеотидных полиморфизмов исследуемых генов осуществлялось с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием реагентов фирмы «Литех» (Россия) согласно инструкции по применению. Детекцию продуктов амплификации проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q5 (QIAGEN, Германия).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Результаты статистической обработки представлены в виде величины верхнего (Q75) и нижнего (Q25) квартилей и медианы (Me) в формате Me (Q25–Q75), частоты встречаемости – в долях (%). Для относительных показателей определялся 95% доверительный интервал (ДИ). Для сравнения переменных использовались непараметрические критерии Манна – Уитни (для 2 независимых групп) и Краскела – Уоллиса (для 3 и более независимых групп).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных маркеров гена MMP-2 735 C/T и его ингибитора TIMP-2 418 G/C в обследованных группах представлено в табл. 1.



Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей генов MMP-2 735 C/T, TIMP-2 418 G/C в тканях плаценты у женщин с ПНБ и у женщин с физиологически протекающей беременностью

Table 1

Frequency distribution of genotypes and alleles of the MMP-2 735 C/T, TIMP-2 418 G/C genes in placental tissues in women with recurrent miscarriage and in women with a physiological pregnancy

Полиморфизм	Частоты генотипов исследованных полиморфизмов, % (ДИ)	
	Женщины с ПНБ	Контрольная группа
MMP-2 735 C/T		
C/C	32,0 (19,65–44,35)	86,4 (50,48–100,0)
C/T	56,0 (34,24–77,75)	13,6 (10,81–16,39)
T/T	12,0 (7,5–16,5)	0
аллель С	88,0 (53,7–100,0)	100,0
аллель Т	68,0 (41,54–94,46)	13,6 (10,84–16,44)
TIMP-2 418 G/C		
C/C	23,1 (15,11–23,10)	73,9 (43,9–100,0)
G/C	69,2 (55,73–82,67)	17,4 (13,88–20,92)
G/G	7,7 (4,94–10,46)	8,7 (5,4–12,1)
аллель С	92,3 (57,01–100,0)	8,7 (5,4–12,1)
аллель G	76,9 (47,53–100,0)	26,1 (20,76–31,44)

При анализе частот генотипов по полиморфному варианту 735 C/T гена MMP-2 частота генотипа T/T (гомозиготный по мутантному аллелю генотипа) у женщин с ПНБ составила 12%, тогда как в контрольной группе мутантный гомозиготный генотип T/T не встречался ($p < 0,05$). Генотип T/T является минорным, в общей популяции встречается редко. Частота гетерозиготного генотипа C/T у женщин с ПНБ составила 56%, генотипа C/C (гомозиготный вариант по «диному» аллелю) – 32%. В контрольной группе частота гетерозиготного генотипа C/T составила 13,6%, «диного» гомозиготного C/C – 86,4%.

Анализ распределения частот аллелей по полиморфизму 735 C/T гена MMP-2 показал, что протективный аллель С чаще встречался в группе женщин с физиологически протекающей беременностью ($p = 0,096$), что характеризуется нормальным уровнем ферментативной активности металлопротеиназы. Так, частота аллеля С в контрольной группе составила 100%, в группе женщин с ПНБ – 88%.

В опытной группе достоверно чаще наблюдалось носительство мутантного аллеля Т гена MMP-2 ($p = 0,0002$). Частота аллеля Т в группе женщин с ПНБ составила 68%, что значительно выше, чем в группе контроля, – 13,6%. Это связано с более активной экспрессией гена металлопротеиназы, что ведет к увеличению образования белкового продукта и, следовательно, к повышенной активности данного фермента. Активация металлопротеиназ сопряжена с повышенным протеолизом элементов внеклеточного матрикса, что, в свою очередь, может способствовать нарушениям структуры и функции последа.

Распределение частот генотипов гена TIMP-2 418 G/C у женщин с ПНБ и представительниц контрольной группы было следующим: генотип G/G (мутантный гомозиготный) обнаружен у 7,7 и 8,7% соответственно, генотипы C/C (гомозиготный вариант по «диному» аллелю) – у 23,1 и 73,9 % соответственно ($p = 0,004$), G/C (гетерозиготный генотип) – у 69,2 и 17,4% соответственно ($p = 0,008$). Мутантный аллель G гена TIMP-2

достоверно чаще встречался в группе женщин с ПНБ ($p=0,002$), в то время как мажорный аллель С данного гена – в группе женщин с физиологически протекающей беременностью ($p=0,004$). Преобладание мутантного аллеля по сравнению с «диким» вариантом в опытной группе свидетельствует о повышенной активности тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ у женщин с ПНБ, основная роль которого заключается в регуляции синтеза MMP-2. На наш взгляд, активация MMP-2 зависит от активности TIMP-2, действующего как кофактор, обеспечивающего тем самым микросреду, которая усиливает патологическое действие этого фермента.

В ходе морфометрического исследования выявлены различия гистологического строения трофобласта и ворсин хориона у женщин с ПНБ в сравнении с контролем. Так, следует отметить преобладание площади трофобласта ($p<0,003$) и снижение площади ворсин хориона ($p<0,04$) в группе пациенток с ПНБ в сравнении с группой женщин без репродуктивных потерь в анамнезе (табл. 2).

Снижение площади ворсин хориона пациенток с ПНБ может быть связано с замещением нормальной плацентарной ткани соединительной в результате ишемического повреждения, а также с отложением большого количества разнокалиберных кальцинатов. В то время как увеличение площади трофобласта можно рассматривать как структурное проявление компенсации нарушений обменных процессов между матерью и плодом.

Результаты микроскопического исследования плацент показали, что у пациенток с ПНБ наиболее часто наблюдались острое полнокровие – 71,4% случаев; интервиллезные кровоизлияния – 57,1%; синцитиальные почки – 85,7%; склероз ворсин хориона – 20,0%, тромбоз сосудов ворсин хориона – 85,6% ($p=0,001$ по сравнению с контролем); отек и дистрофия ворсин – 93,3%; некроз – 93,3% ($p=0,001$ по сравнению

Таблица 2
Морфометрические показатели плацентарной ткани у женщин с ПНБ и женщин без репродуктивных потерь [Me (Q25–Q75)]

Table 2
Morphometric parameters of placental tissue in women with recurrent miscarriage and women without reproductive losses [Me (Q25–Q75)]

Показатель	Женщины с ПНБ	Контрольная группа	p
S ворсин, пк	515251,9 (431321,5–540834,5)	782152,6 (539505,0–1065996)	–
S ворсин, %	39,4 (31,5–47,4)	40,4 (27,4–53,0)	0,04
S сосудов, %	1,95 (1,18–4,51)	1,56 (0,89–2,91)	–
S трофобласта, пк	758382,7 (604627,5–910527,0)	154425,1 (130408,5–174700,0)	–
S трофобласта, %	26,7 (22,5–28,2)	6,8 (4,6–9,0)	0,003
$S_{\text{тр}}/S_{\text{общ}}$	0,32 (0,29–0,36)	0,30 (0,20–0,40)	–
$S_{\text{с}}/S_{\text{в}}$	0,06 (0,04–0,10)	0,04 (0,03–0,08)	–
$S_{\text{с}}/S_{\text{тр}}$	0,08 (0,05–0,14)	0,06 (0,04–0,10)	–
$S_{\text{в}}/S_{\text{общ}}$	0,35 (0,261–0,41)	0,59 (0,44–0,72)	–
$S_{\text{с}}/S_{\text{тр}}$	0,26 (0,11–0,45)	0,23 (0,10–0,36)	–
$S_{\text{тр}}/S_{\text{в}}$	0,23 (0,19–0,27)	0,20 (0,18–0,21)	–
$S_{\text{тр}}/S_{\text{ив}}$	0,31 (0,21–0,52)	0,14 (0,10–0,24)	–

Примечание: в этой и последующих таблицах «–» означает отсутствие достоверности ($p>0,05$).

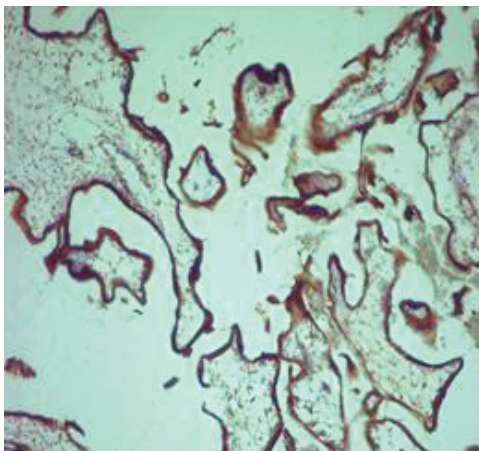
с контролем), кальцинаты – 42,9% ($p=0,049$ по сравнению с контролем) случаев.

Острое полнокровие и интервиллезные кровоизлияния свидетельствуют об острых нарушениях маточно-плацентарного кровообращения, что могло явиться причиной спонтанного аборта с острой отслойкой плацентарной ткани в раннем сроке гестации. Тромбоз сосудов ворсин хориона с последующим некрозом, дистрофические изменения и отек ворсин хориона приводят к инволютивно-дистрофическим и воспалительным изменениям, а наличие склеротических изменений может свидетельствовать о нарастающей гипоксии.

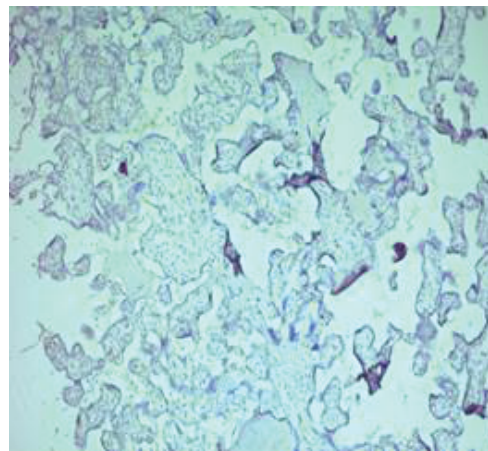
При анализе морфологических характеристик плацентарной ткани у женщин с ПНБ и женщин без репродуктивных потерь в зависимости от наличия генотипов и аллелей полиморфных вариантов исследуемых генов большинство ассоциаций выявлены с геном MMP-2. Так, у пациенток с ПНБ с мутантным гомозиготным генотипом Т/Т полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2 площадь трофобласта была достоверно ($p<0,05$) больше, чем в группе с «диким» гомозиготным генотипом С/С. Также у женщин с ПНБ с мутантным гомозиготным генотипом Т/Т достоверно чаще встречались острое полнокровие ($p=0,02$) и интравиллезные кровоизлияния ($p=0,02$), чем при наличии гомозиготного С/С и гетерозиготного С/Т полиморфизмов генотипов этого гена. Отек и дистрофия ворсин хориона, некрозы достоверно чаще ($p=0,02$) встречались у женщин с гетерозиготным С/Т генотипом полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2. Выявленные морфологические изменения в плацентарной ткани у лиц с мутантным и гетерозиготным генотипами полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2 подтверждают их возможный вклад в патологическое течение беременности.

По результатам проведенного иммуногистохимического анализа уровень экспрессии MMP-2 статистически значимо ($p=0,0008$) различался между исследуемыми группами (см. рисунок).

Так, в препаратах плацентарной ткани опытной группы в подавляющем большинстве наблюдений (69,23%) отмечалась резко выраженная экспрессия данного маркера (3 балла). Слабо выраженная (1 балл) и умеренно выраженная (2 балла) экспрессия



A



B

Экспрессия MMP-2 в плаценте опытной (A) и контрольной группы (B)
Expression of MMP-2 in the placenta of the experimental group (A) and the control group (B)

ММР-2 в плаценте женщин с ПНБ выявлена в 15,38 и 11,54% соответственно. Отсутствие окраски (0 баллов) наблюдалось только у 3,85% женщин с ПНБ.

Напротив, в контрольной группе в подавляющем большинстве наблюдений (60,87%) был получен отрицательный результат (отсутствие окраски), в то время как слабо выраженная экспрессия ММР-2 в плацентарной ткани выявлена у 34,78% женщин с физиологическими родами в анамнезе, умеренно выраженная окраска отмечена только в 1 случае (4,35%), резко выраженная экспрессия маркера в этой группе не наблюдалась.

При сравнительной оценке частоты встречаемости исследуемых генотипов и частот аллелей и результатов иммунохимического исследования статистически значимые связи выявлены для полиморфизмов генов МТНFR A1298C ($p=0,034$), ММР-2 ($p=0,0000001$), TIMP-2 ($p=0,014$), аллеля С гена ММР-2 ($p=0,038$) и аллеля Т гена ММР-2 ($p=0,0000001$).

Результаты распределения частот встречаемости генотипов исследуемых полиморфизмов и их аллелей в зависимости от степени выраженности экспрессии ММР-2 в плацентарной ткани в группе женщин с ПНБ представлены в табл. 3.

Характеристика экспрессии уровня матриксных металлопротеиназ второго типа в зависимости от генотипов полиморфизма 1298 A/C гена МТНFR в лейкоцитах крови

Таблица 3
Распределение частот генотипов исследуемых полиморфизмов и их аллелей (%) в зависимости от выраженности экспрессии ММР-2 в плаценте у женщин с ПНБ
Table 3
Distribution of genotype frequencies of the studied polymorphisms and their alleles (%) depending on the severity of MMP-2 expression in the placenta in women with recurrent miscarriage

Полиморфизм/генотип/аллель	Уровень экспрессии ММР-2 в баллах			
	0	1	2	3
МТНFR C677T в сыворотке крови				
C/C	0	50,0	50,0	0
C/T	14,29	14,29	14,29	57,14
T/T	0	16,67	0	83,33
МТНFR A1298C в сыворотке крови				
A/A	12,5	25,5	25,5	37,5
A/C	0	0	0	100,0
C/C	0	0	0	100,0
ММР-2 C735T в плацентарной ткани				
C/C	48,15	37,04	11,11	3,7
C/T	11,76	5,88	5,88	76,46
T/T	0	0	0	100,0
аллель С есть	34,09	25,0	9,09	31,82
аллеля С нет	0	0	0	100,0
аллель Т есть	10,0	5,0	5,0	80,0
аллеля Т нет	48,15	37,04	11,11	3,70
TIMP-2 418 G/C в плацентарной ткани				
C/C	43,48	34,78	8,70	13,04
G/C	13,64	13,64	9,09	63,64
G/G	50,0	25,0	0	25,0

показала, что у всех пациенток с ПНБ с гетерозиготным генотипом (A/C) и гомозиготным вариантом по «диному» аллелю (A/A) отмечалась резко выраженная экспрессия MMP-2 в плацентарной ткани (3 балла) по сравнению с гомозиготным вариантом по мутантному аллелю (C/C) с генотипом ($p=0,0001$).

Иммуногистохимический анализ уровня экспрессии MMP-2 в зависимости от генотипов полиморфизма 677 C/T гена MTHFR в сыворотке крови показал выраженную экспрессию MMP-2 в плацентарной ткани у женщин с ПНБ с гомозиготным мутантным (T/T) и гетерозиготным генотипами ($p>0,05$).

Полиморфизмы 677 C/T и 1298 A/C гена MTHFR связаны со снижением ферментативной активности метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), что приводит к нарушению метилирования и может вызывать дефицит фолата и избыточное накопление гомоцистеина – промежуточного продукта синтеза метионина. Высокий уровень гомоцистеина повышает активность матриксных металлопротеиназ, что, в свою очередь, вызывает активацию и деградацию внеклеточного матрикса [19]. В то же время повышенная деградация внеклеточного матрикса приводит к нарушению инвазии трофобласта в стенку матки и неполноценной плацентации, что в итоге может служить источником различных патофизиологических процессов, включая невынашивание беременности. Многие авторы рассматривают полиморфные варианты гена MTHFR как независимый фактор риска невынашивания беременности [20]. Исходя из полученных нами результатов, можно предположить, что наряду с другими механизмами развития патологических процессов во время беременности при гипергомоцистеинемии определенную роль играет и активация матриксных металлопротеиназ.

Распределение экспрессии уровня матриксных металлопротеиназ второго типа в зависимости от генотипов полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 в плацентарной ткани было следующим: резко выраженная экспрессия MMP-2 в плацентарной ткани (3 балла) выявлена у всех женщин (100%) опытной группы с гомозиготным мутантным генотипом (T/T) и в 76,46% случаев – с гетерозиготным генотипом (C/T).

При изучении распределения окраски в зависимости от наличия аллелей полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 в плацентарной ткани выявлено, что максимальная величина экспрессии MMP-2 (3 балла) достоверно чаще встречалась у женщин с мутантным аллелем T ($p=0,0001$), в то время как с протективным аллелем C связи не выявлено ($p=0,13$). Тем самым можно заключить, что наличие мутантного аллеля T ассоциировано с высоким уровнем экспрессии матриксных металлопротеиназ второго типа в плацентарной ткани.

Примечательно, что с увеличением возраста исследуемых отмечалось снижение уровня экспрессии MMP-2 в тканях плаценты ($p=0,0096$). Высокий уровень экспрессии MMP-2 (3 балла) достоверно чаще ($p=0,007$) встречался у женщин более молодого возраста – Me (Q25–Q75) 29,5 (27–33) года, отрицательная реакция (0 баллов) выявлена у женщин в возрасте 37 (35–39) лет, слабо выраженная реакция (1 балл) – 32 (30–39) года и умеренно выраженная реакция (2 балла) – 34,5 (29,5–39).

При изучении ассоциаций полиморфизма 418 G/C гена ингибитора металлопротеиназы (TIMP-2) с уровнем экспрессии MMP-2 в плацентарной ткани самая высокая величина экспрессии (3 балла) встречалась в группе исследуемых с мутантным аллелем G ($p=0,0001$) и гомозиготным генотипом по мутантному аллелю G/G данного гена ($p=0,06$). На наш взгляд, наличие мутантного аллеля G гена TIMP-2 может приводить

к дисбалансу активности фермента MMP-2 и его ингибитора TIMP-2. Дисбаланс между активными MMP-2 и TIMP-2 в пользу повышенной активности MMP-2 может привести к неадекватной деградации внеклеточного матрикса, или, наоборот, дисбаланс в пользу TIMP-2 может снизить активность MMP-2, что приведет к избыточному отложению экстрацеллюлярного матрикса. Результатом дисбаланса между процессами синтеза и расщепления матрикса является нарушение процессов имплантации и плацентации, что клинически может проявляться спонтанными выкидышами.

Особенности гистологического строения трофобласта и ворсин хориона в зависимости от степени выраженности экспрессии матричных металлопротеиназ второго типа в плацентарной ткани у женщин с ПНБ представлены в табл. 4.

При анализе морфологических характеристик плацентарной ткани пациенток с ПНБ в зависимости от результатов иммуногистохимического анализа установлено, что большинство ассоциаций отмечается между уровнем экспрессии матричных металлопротеиназ второго типа и гистологическим строением трофобласта и площадью ворсин хориона. Так, следует отметить, что в плацентарной ткани с высокой экспрессией MMP-2 (3 балла) выше площадь трофобласта ($p=0,033$), ворсин хориона ($p=0,042$), сосудов ($p=0,033$) и величина сосудисто-межворсинчатого соотношения (S_c/S_{iv}) ($p=0,016$), чем при низкой ее экспрессии.

Таблица 4
Морфометрические показатели плацентарной ткани у женщин с ПНБ в зависимости от результатов иммуногистохимического анализа
Table 4
Morphometric parameters of placental tissue in women with recurrent miscarriage depending on the results of immunohistochemical analysis

Показатель	Уровень экспрессии MMP-2 в баллах			p
	1 балл	2 балла	3 балла	
S ворсин, пк	1062261 (538576–1541816)	1302773 (121321,5–1440834,5)	1491977 (1377028–1562918)	–
S ворсин, %	33,8 (17,12–49,01)	41,41 (21,44–40,14)	47,4 (43,77–49,68)	0,042
S сосудов, %	1 (1–2)	4 (2–3)	5 (2–5)	0,033
S трофобласта, пк	187336 (163851–371598)	252402 (204627–310527)	340186 (302772–375108)	0,033
S трофобласта, %	6 (5–12)	8 (7–11)	11 (10–12)	–
S интервиллезного пространства, пк	1745053 (1113925–2362280)	1206192 (1153950–5065996)	1102612 (822076–1284796)	–
S стромы, пк	813703 (355461–1133029)	912708 (130408–974700)	1009974 (951278–1105938)	–
$S_{str}/S_{общ}$	0,26 (0,11–0,36)	0,29 (0,29–0,36)	0,32 (0,30–0,35)	–
S_c/S_v	0,04 (0,02–0,06)	0,11 (0,9–0,16)	0,095 (0,037–0,099)	–
S_c/S_{str}	0,05 (0,03–0,07)	0,15 (0,10–0,24)	0,14 (0,053–0,14)	–
$S_{iv}/S_{общ}$	0,55 (0,35–0,75)	0,38 (0,26–0,41)	0,35 (0,26–0,41)	–
S_c/S_{tr}	0,12 (0,10–0,33)	0,55 (0,44–0,72)	0,42 (0,14–0,51)	–
S_{tr}/S_v	0,24 (0,18–0,30)	0,19 (0,18–0,21)	0,23 (0,19–0,27)	–
S_{tr}/S_{iv}	0,11 (0,07–0,33)	0,21 (0,19–0,27)	0,31 (0,29–0,37)	–
S_c/S_{iv}	0,03 (0,008–0,035)	0,11 (0,05–0,12)	0,13 (0,04–0,19)	0,016



При оценке морфологических изменений плацентарной ткани с высокой экспрессией MMP-2 отмечено увеличение частоты встречаемости острого полнокровия ($p=0,042$), интервиллезного кровоизлияния ($p=0,0049$), отека и дистрофии ворсин ($p=0,032$) и некрозов ($p=0,0015$).

■ ВЫВОДЫ

1. У пациенток с ПНБ выявлено преобладание мутантного аллеля Т и гетерозиготного генотипа С/Т полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2, в то время как у женщин с физиологической беременностью мутантный гомозиготный генотип Т/Т не встречается ($p<0,05$). С генотипом Т/Т гена MMP-2 ассоциируются острое полнокровие ($p=0,02$) и интравиллезные кровоизлияния ($p=0,02$). Отек и дистрофия ворсин хориона, некрозы достоверно чаще встречаются у женщин с гетерозиготным С/Т генотипом полиморфизма гена MMP-2 ($p=0,02$).
2. У пациенток с ПНБ площадь трофобласта больше ($p<0,003$), а площадь ворсин хориона ниже ($p<0,04$), чем у женщин без репродуктивных потерь в анамнезе. Наиболее высокая площадь трофобласта наблюдается у лиц с мутантным гомозиготным генотипом Т/Т полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2 ($p<0,04$).
3. Мутантный аллель G гена TIMP-2 достоверно чаще встречается у женщин с ПНБ ($p=0,002$), в то время как мажорный аллель C данного гена – у женщин с физиологически протекающей беременностью ($p=0,004$).
4. Присутствие аллеля Т в полиморфизме 735 С/Т гена MMP-2 и аллеля G в полиморфизме 418 G/C гена TIMP-2 ассоциировано с повышенной экспрессией гена MMP-2 в плаценте. Максимальная величина экспрессии MMP-2 чаще встречается у женщин с мутантным аллелем Т полиморфизма 735 С/Т гена MMP-2 ($p=0,0001$). При высокой экспрессии MMP-2 отмечается увеличение частоты встречаемости острого полнокровия ($p=0,042$), интервиллезного кровоизлияния ($p=0,0049$), отека, дистрофии ворсин ($p=0,032$) и некрозов ($p=0,0015$).
5. У всех пациенток с ПНБ с гетерозиготным генотипом (A/C) и гомозиготным вариантом по «диному» аллелю (A/A) полиморфизма 1298 A/C, а также у носителей мутантного аллеля Т полиморфизма 677 С/Т гена MTHFR (в лейкоцитах крови) отмечается резко выраженная экспрессия MMP-2 в плацентарной ткани (3 балла), существенно более высокая по сравнению с гомозиготным (C/C) по мутантному аллелю вариантом полиморфизма 1298 A/C ($p=0,0001$) и гомозиготным (C/C) по «диному» аллелю вариантом Т полиморфизма 677 С/Т.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chambers A.F., Matrisian L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1260–1270.
2. Nagase H., Woessner F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491–21494.
3. Parsons S.L., Watson S.A., Brown P.D., Collins H.M., Steele R.J. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg.* 1997;84:160–166. PMID:9052425.
4. Evrosimovska B., Velickovski B. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *Journal of Cell and Animal Biology.* 2011;5(7):113–120.
5. Bondar I.A., Klimontov V.V. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the development of kidney fibrosis in diabetes mellitus. *Problems of endocrinology.* 2012;1:39–44. (in Russian)
6. Tereshkina I.V. Matrix metalloproteinases in ovarian neoplasms *Oncogynecology.* 2012;4:13–24. (in Russian)
7. Linen G.R. Matrix metalloproteinases and fibrinolytic activity of cells. *Biochemistry.* 2002;67(1):107–115. (in Russian)
8. Yarovaya G.A. Bioregulatory functions and pathogenetic role of proteolysis. Distribution, classification and fundamentals of the mechanism of action of proteinases. *Laboratory medicine.* 2001;4:75–8. (in Russian)
9. Löffek S., Schilling O., Franzke C.-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal.* 2011;38:191–208. doi:10.1183/09031936.00146510.

10. Brew K., Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1803(1):55–71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
11. Deryugina E.I., Quigley J.P. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory function. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1803(1):103–120.
12. Mayor-Lynn K., Toloubeydokhti T., Cruz A.C., Chagini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod. Sci.* 2011;18:46–56.
13. Goldman S., Weiss A., Eyal V., Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod*. 2003;9:367–373.
14. Ganusevich I.I. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in malignant neoplasms. I. Characteristics of MMPs, regulation of their activity, prognostic value. *Oncology*. 2010;12(1):10–16. (in Russian)
15. Chung A.W. Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease. *Cardiovasc. Res*. 2009;84(3):494–504.
16. Kurzepa J. The significance of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *Int. J. Neurosci*. 2014;124(10):707–716.
17. Nishino E., Matsuzaki N., Masuhiro K., Kameda T., Taniguchi T., Takagi T., Saji F., Tanizawa O. Trophoblast-derived interleukin 6 (IL 6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL 6 receptor on human trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*. 1990;71(2): 436–441.
18. Fazleabas A. () Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*. 1997;56(2):348–356.
19. Charu Munjal, Neetu Tyagi, David Lominadze, Suresh C. Tyagi. Matrix metalloproteinase-9 in homocysteine-induced intestinal microvascular endothelial paracellular and transcellular permeability. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1159–69. doi: 10.1002/jcb.23451
20. Aimetova A.R. The role of polymorphism of folate metabolism genes in the genesis of non-developing pregnancy of the first trimester. *Mother and Child: Proceedings of the X Anniversary All-Russian Scientific Forum*. M. 2009:6–7. (in Russian)