

<https://doi.org/10.34883/PI.2022.12.6.004>
УДК 618.145-007.415-02:577.15



Павловская М.А.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Матриксные металлопротеиназы в генезе наружного генитального эндометриоза

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 10.11.2022

Принята: 05.12.2022

Контакты: akusherstvo.grsmu@gmail.com

Резюме

В Республике Беларусь эндометриоз встречается приблизительно у трети женщин репродуктивного возраста и является одной из основных причин бесплодия. Патогенез эндометриоза до сих пор является предметом дискуссий, что существенным образом затрудняет подходы к лечению. Согласно одному из предположений молекулами, которые вовлечены в развитие эндометриоза, являются матриксные металлопротеиназы (ММП). Цель исследования – установить роль ММП-2 и ММП-9 в генезе наружного генитального эндометриоза (НГЭ). Методом иммуногистохимии в железах эндометрия женщин с НГЭ выявлено увеличение экспрессии ММП-2 на 13–47% и ММП-9 – в 63–188 раз по сравнению с нормальным эндометрием. В строме эндометрия у пациенток с НГЭ экспрессия ММП-2 повышалась в среднем на 30%, а ММП-9 – в 67–114 раз. В эндометриоидных гетеротопиях женщин с НГЭ экспрессия ММП-2 возросла на 36–42%, а экспрессия ММП-9 – в 3,4–3,7 раза по сравнению с контролем. При прогрессировании НГЭ экспрессия ММП-2 и ММП-9 в железистом компоненте эндометрия достоверно повышалась в соответствии со стадией НГЭ. Таким образом, расщепление межклеточного матрикса и базальных мембран эндотелиоцитов с участием ММП-2 и ММП-9 лежит в основе имплантации эндометриальных гетеротопий и неоангиогенеза, которые являются ключевыми звеньями НГЭ.

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

Pavlouskaya M.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Matrix Metalloproteinases in the Genesis of External Genital Endometriosis

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 10.11.2022

Accepted: 05.12.2022

Contacts: akusherstvo.grsmu@gmail.com

Abstract

In the Republic of Belarus, endometriosis occurs in about a third of women of reproductive age and is one of the main causes of infertility. The pathogenesis of this pathology is still the subject of various discussions, which significantly complicates approaches to treatment. According to one of the assumptions, the molecules that are involved in the development of endometriosis are matrix metalloproteinases (MMPs). The purpose of the study is to establish the role of MMP-2 and MMP-9 in the genesis of external genital endometriosis (EGE). Immunohistochemistry in the endometrial glands of women with EGE revealed an increase in the expression of MMP-2 by 13–47% and MMP-9 – by 63–188 times, compared with normal endometrium. In the stroma of the endometrium in patients with EGE, the expression of MMP-2 increased by an average of 30%, and MMP-9 – by 67–114 times. In endometrioid heterotopias of women with EGE, MMP-2 expression increased by 36–42%, and MMP-9 expression increased by 3.4–3.7 times compared with the control. With the progression of EGE, the expression of MMP-2 and MMP-9 in the glandular component of the endometrium significantly increases in accordance with the stage of EGE. Thus, the cleavage of the intercellular matrix and basement membranes of endotheliocytes with the participation of MMP-2 and MMP-9 underlies the implantation of endometrial heterotopias and neoangiogenesis, which are the key links in EGE.

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

■ ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь эндометриоз встречается приблизительно у трети женщин репродуктивного возраста и является одной из основных причин бесплодия [1]. По данным литературы, эндометриоз-ассоциированное бесплодие возникает на 20–50% чаще, чем бесплодие у женщин без этой патологии. Известно, что гормональные и иммунные нарушения, негативно влияющие на формирование ооцитов, оплодотворение и эмбриогенез, являются причинами возникновения бесплодия при эндометриозе [1, 2]. В связи с этим эндометриоз можно считать социально значимым заболеванием. Тем не менее этиология и молекулярные механизмы возникновения этого заболевания в настоящее время до сих пор являются предметом дискуссий [3–5].

Известно, что ведущими звеньями патогенеза наружного генитального эндометриоза (НГЭ) являются ретроградный заброс эндометрия через маточные трубы в брюшную полость, имплантация эндометриальных очагов и их прогрессивный пролиферативный рост под действием как гормональных, так и иммунных факторов, а также запуск неоангиогенеза, который способствует в дальнейшем автономному персистенции эндометриальных гетеротопий [1, 3].

Рядом авторов показана важная роль цитокинов в перечисленных выше процессах, а именно: интерлейкинов (IL) – IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10; факторов роста – трансформирующего фактора роста (TGF), фактора некроза опухоли (TNF- α), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), которые регулируют ремоделирование межклеточного матрикса [1, 3, 6]. Кроме того, доказано, что IL-1 в эндотелиоцитах стимулирует выработку MMP-9, а индуктором синтеза MMP-9 в этих клетках является VEGF [6], экспрессия которого запускается с помощью IL-6 [3]. Вместе с этим IL-4 и IL-10 через подавление синтеза IL-1 в макрофагах индуцируют биосинтез MMP-9. Помимо этого, рядом исследователей обнаружена способность MMP-9 активировать IL-8 и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), который обладает способностью угнетать пролиферацию эндотелиальных клеток [6, 7].

Сведения литературы относительно MMP-2 в меньшей степени подтверждают регуляцию со стороны факторов роста и цитокинов, объясняя это малым количеством регуляторных элементов в промоторной зоне гена MMP-2 [8]. Тем не менее доказано, что в кератиноцитах, глиальных клетках, меланоме, аденокарциноме, фибросаркоме активатором синтеза MMP-2 является TGF- β , а в фибробластах и лейомиоцитах – IL-1, TNF- α [2].

Принимая во внимание данные о регуляторных взаимосвязях синтеза MMP, цитокинов и факторов роста в норме и при патологии, можно сделать предположение о том, что MMP-2 и MMP-9 играют важную роль в развитии НГЭ [4, 7, 8]. Вместе с тем, по причине неоднозначности имеющихся сведений, представляется целесообразным провести углубленное исследование роли MMP-2 и MMP-9 в патогенезе различных стадий НГЭ.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить роль MMP-2 и MMP-9 в генезе наружного генитального эндометриоза.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 80 женщин репродуктивного возраста (22–35 лет, средний возраст $29,7 \pm 4,0$ года) с НГЭ. У всех женщин были взяты образцы эндометрия и эндометриоидных гетеротопий с использованием пайпель-биопсии. Весь материал был разделен на 4 группы по стадиям заболевания согласно клинической классификации НГЭ: 1-я группа (I степень) – мелкие точечные очаги эндометриоза на поверхности яичников и на брюшине прямокишечно-маточного углубления ($n=20$); 2-я группа (II степень) – односторонняя эндометриоидная киста диаметром не более 5–6 см, мелкие очаги эндометриоза на брюшине малого таза, спаечный процесс в области придатков ($n=20$); 3-я группа (III степень) – эндометриоидные кисты обоих яичников диаметром более 5–6 см, очаги эндометриоза на серозном покрове матки, маточных труб, брюшине малого таза, выраженный спаечный процесс ($n=20$); 4-я группа (IV степень) – двусторонние кисты больших размеров с переходом на соседние органы

(n=20). В каждой группе выделяли по 2 подгруппы, одна из которых содержала материал эндометрия (n=10), другая – материал эндометриальных гетеротопий (n=10).

Контрольная группа А (для сравнения эндометриальных биоптатов) – женщины без НГЭ, обследовавшиеся по поводу планирования беременности, у которых забирали биоптаты нормального эндометрия (n=5); контрольная группа Б – женщины без НГЭ (n=5), у которых забирали аутопсийный материал брюшины (для сравнения эндометриоидных биоптатов). Женщины обследованы при наличии информированного согласия пациента на проведение данного исследования.

Иммуногистохимическое исследование проводили по общепринятой методике с демаскировкой антигенов в СВЧ-печи на серийных парафиновых срезах эндометрия, помещенных на стекла, покрытые поли-L-лизином. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела к MMP-9 и MMP-2 (LabVision, США).

Визуализацию результатов экспрессии MMP-2 и MMP-9 в материале эндометрия, эндометриальных гетеротопий и брюшины, полученных методом стрептавидин-биотинной гистохимии, осуществляли с использованием светового микроскопа. Визуализацию результатов, полученных иммунофлуоресцентным методом, проводили на конфокальном микроскопе.

Количественную оценку экспрессии MMP-2 и MMP-9 в исследуемом материале осуществляли по результатам стрептавидин-биотинной гистохимии. Были получены микрофотографии 5 полей зрения с каждого препарата при $\times 400$. Определяли относительную площадь экспрессии, которую рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к площади всех клеток в поле зрения, и выражали в процентах.

Для статистического анализа данных использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test) для независимых групп и критерий Wilcoxon для зависимых групп.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным нами данным, экспрессия MMP-2 в железистом компоненте эндометрия у женщин с НГЭ, начиная с первой и заканчивая четвертой стадией, была достоверно выше, чем в контрольной группе женщин без НГЭ, соответственно на 13%, 28%, 35% и 47% (табл. 1). Причем следует отметить, что с увеличением степени распространения эндометриоза соответственно от 1-й к 4-й группе достоверно увеличивалась экспрессия MMP-2 в вышеуказанном компоненте эндометрия ($p < 0,05$).

Мы выявили, что в стромальном компоненте эндометрия женщин с НГЭ всех обследованных групп экспрессия MMP-2 была достоверно выше, чем в контроле А ($p < 0,05$), однако между группами достоверных различий не было обнаружено ($p > 0,05$). По нашим данным, в эндометриоидных гетеротопиях при I–IV стадиях заболевания экспрессия MMP-2 была соответственно на 36%, 43%, 35% и 42% выше, чем в материале контрольной группы Б ($p < 0,05$). Тем не менее мы не выявили достоверных различий между группами, указывающих на прогрессирование экспрессии MMP-2 в соответствии со стадией распространения НГЭ ($p > 0,05$).

Наши данные согласуются с результатами исследования авторов, свидетельствующими о том, что увеличение экспрессии MMP-2 в эндометрии при НГЭ по сравнению



Таблица 1
Относительная площадь экспрессии MMP-2 (%) в исследованных образцах у пациенток с НГЭ и у женщин контрольных групп А и Б
Table 1
Relative expression area of MMP-2 (%) in the studied samples in patients with NGE and in women of control groups A and B

Компонент эндометрия	Эндометрий				
	Контроль А	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
Железистый	15,65±0,60	17,99±0,22*	21,79±1,30*	23,98±2,01*	29,54±0,21*
Стромальный	7,21±0,23	10,74±0,23**	9,40±0,12**	10,21±0,26**	10,38±0,14**
Контроль Б	Эндометриоидные гетеротопии				
		1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
	7,32±0,24	11,36±0,22***	12,82±0,23***	11,27±0,73***	12,67±0,73***

Примечания: * p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в железистом компоненте эндометрия женщин без НГЭ; ** p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в стромальном компоненте эндометрия женщин без НГЭ; *** p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в брюшине женщин без НГЭ.

с контролем и прогрессия в соответствии со стадией эндометриоза могут говорить о повышении протеолитической активности MMP-2 при развитии заболевания, что может указывать на увеличение вероятности ретроградного заброса материала эндометрия в брюшную полость [5].

Полученные данные об увеличении экспрессии MMP-2 могут указывать на инициацию молекулярных каскадов позитивной индукции, которые развиваются при прогрессировании эндометриоза. При этом следует отметить, что достоверное увеличение экспрессии MMP-2 в эндометриальных гетеротопиях при НГЭ по сравнению с контролем может быть предположительно проявлением подавляющей активности MMP-2 в отношении ангиогенеза – одного из звеньев патогенеза НГЭ. Данная гипотеза основана на результатах исследований, свидетельствующих об активности MMP-2 в подавлении адгезии эндотелиальных клеток [5].

По нашим данным, экспрессия MMP-9 (табл. 2) в железистом компоненте эндометрия у женщин с НГЭ I–IV стадий была достоверно выше, чем в контроле А,

Таблица 2
Относительная площадь экспрессии MMP-9 (%) в исследованных образцах у пациенток с НГЭ и у женщин контрольных групп А и Б
Table 2
Relative expression area of MMP-9 (%) in the studied samples in patients with NGE and in women of control groups A and B

Компонент эндометрия	Эндометрий				
	Контроль А	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
Железистый	0,06±0,01	3,82±0,25**	5,56±0,34**	7,78±0,39**	11,28±1,03**
Стромальный	0,51±0,03	34,32±1,21*	35,56±1,86*	34,21±1,26*	58,32±2,12*
Контроль Б	Эндометриоидные гетеротопии				
		1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
	2,69±0,12	9,21±0,32***	9,98±0,21***	8,68±0,95***	9,85±0,37***

Примечания: * p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в железистом компоненте эндометрия женщин без НГЭ; ** p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в стромальном компоненте эндометрия женщин без НГЭ; *** p<0,05 по сравнению с соответствующим показателем в брюшине женщин без НГЭ.

соответственно в 63, 92, 129 и 188 раз ($p < 0,05$). При этом следует отметить достоверные изменения между группами по мере прогрессирования стадии эндометриоза ($p < 0,05$).

В стромальном компоненте эндометрия у пациенток с НГЭ I–IV стадии экспрессия MMP-9 была соответственно в 67, 70, 67 и 114 раз выше, чем в контроле А ($p < 0,05$). Следует отметить, что в 4-й группе показатель экспрессии MMP-9 был также достоверно более высоким по сравнению с тремя основными группами ($p < 0,05$). В эндометриоидных гетеротопиях при I–IV стадиях НГЭ экспрессия MMP-9 была соответственно в 3,4, 3,7, 3,2 и 3,7 раза выше, чем в материале брюшины контрольной группы Б ($p < 0,05$). Вместе с этим мы не выявили достоверных различий между группами, указывающих на прогрессирование экспрессии MMP-2 в соответствии со стадией распространения НГЭ ($p > 0,05$).

По данным литературы, ведущей функцией MMP является расщепление компонентов межклеточного матрикса [7–9]. Доказано, что в первичной структуре MMP-2 в составе каталитического центра имеется фибронектиновый домен, который ответственен за связывание с ламинином и фибронектином [8]. Известно, что ламинин является компонентом мембран эндотелиоцитов, а фибронектин входит в состав межклеточного вещества. Кроме того, авторами обнаружено, что в структуре MMP-9 имеется домен, обеспечивающий высокое сродство MMP-9 к коллагену IV типа, являющийся, как и ламинин, компонентом клеточных мембран. В связи с этим не вызывает сомнений то, что разрушение межклеточного матрикса и базальных мембран эндотелиоцитов лежит в основе имплантации эндометриальных гетеротопий и неоваскулогенеза, которые являются основными звеньями возникновения и развития НГЭ [7, 9].

Гипотеза о том, что MMP-2 и MMP-9 играют важную роль и в развитии НГЭ, была высказана и другими исследователями [7, 8, 10]. В исследовании Szymanski и соавторов не было выявлено достоверных различий в экспрессии мРНК MMP-2 и MMP-9 в эндометрии женщин с первой и второй степенью тяжести НГЭ по сравнению с эндометрием у женщин без патологии репродуктивной системы. Эти авторы полагают, что полученные результаты исследования указывают на целесообразность дальнейшего изучения роли MMP в патогенезе эндометриоза [9]. В другой работе было показано отсутствие достоверных различий в экспрессии мРНК MMP-9 в эндометрии женщин с НГЭ и женщин без патологии [4]. Однако в этом исследовании не проводилось разделения пациенток в соответствии со степенью тяжести эндометриоза и не изучался уровень экспрессии MMP-9 в эктопическом эндометрии.

В работах Ярмолинской и соавторов обобщены сведения о значении матриксных металлопротеиназ в патогенезе эндометриоза [3, 7]. Авторы отмечают увеличение экспрессии MMP-2 и MMP-9 в эктопическом эндометрии при внутреннем генитальном эндометриозе и подчеркивают связь MMP-1, -3, -9 с системой цитокинов. Вместе с тем исследователями показано повышение экспрессии мРНК MMP-2 и MMP-9 в эндометриальных гетеротопиях женщин с НГЭ по сравнению с экспрессией мРНК этих металлопротеиназ в нормальной эндометрии. Следует, тем не менее, отметить, что два последних результата не демонстрируют однородность выборки по степеням эндометриоза.

В исследовании Ильиной и соавторов показано увеличение экспрессии MMP-2 и MMP-9 в эндометрии и в эндометриальных гетеротопиях пациенток с НГЭ

всех степеней тяжести по сравнению с контролем, что свидетельствует о непосредственном участии MMP-2 и MMP-9 в патогенезе НГЭ [11]. Тем не менее авторы не обнаружили тенденции к выраженным достоверным внутригрупповым изменениям в соответствии со степенью распространения НГЭ.

Результаты проведенного нами исследования показали, что экспрессия MMP-2 и MMP-9 не только играет ключевую роль в патогенезе НГЭ, но и указывает на инициацию молекулярных каскадов индукции патологического процесса, развивающегося при прогрессировании эндометриоза. Согласно полученным нами данным, экспрессия MMP-2 и MMP-9 в железистом компоненте эндометрия у женщин с НГЭ, начиная с первой и заканчивая четвертой стадией, была достоверно выше, чем в контрольной группе женщин без НГЭ. Причем необходимо подчеркнуть, что с увеличением степени распространения эндометриоза соответственно от 1-й к 4-й группе достоверно увеличивалась экспрессия MMP-2 и MMP-9 в вышеуказанном компоненте эндометрия.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая данные литературы и полученные нами результаты, можно заключить, что расщепление межклеточного матрикса и базальных мембран эндотелиоцитов с участием MMP-2 и MMP-9 лежит в основе имплантации эндометриальных гетеротипий и неоангиогенеза, которые являются ключевыми звеньями наружного генитального эндометриоза.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lee H., Chang K.W., Yang H.Y. (2013) MT1-MMP regulates MMP-2 expression and angiogenesis-related functions in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 437, no 2, pp. 232–238. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.046
2. Markelova E.V., Zdor V.V., Romanchuk A.L. (2016) Matrix metalloproteinases: on their relationship with cytokine system, diagnostic and prognostic potential. *Immunopathology, Allergology, Infectology*, no 2, pp. 11–22. doi: 10.14427/jipai.2016.2.23. (in Russian)
3. Yarmolinskaya M.I., Rusina E.I., Khachatryan A.R. (2016) Clinical picture and diagnosis of genital endometriosis. *Journal of Obstetrics and Womens Diseases*, vol. 65, no 5, pp. 4–21. doi: 10.17816/JOWD6554-21. (in Russian)
4. Ahn S.H., Monsanto S.P., Miller C. (2015) Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *BioMed. Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/795976
5. Kianpour M., Nematbakhsh M., Ahmadi S.M. (2013) Serum and Peritoneal Fluid Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Women with Endometriosis. *Int J Fertil Steril*, vol. 7, no 2, pp. 96–99.
6. Tsitskarava D.Z., Yarmolinskaya M.I., Selyutin A.V. (2017) Evaluation of the content and the pathogenetic role of cytokines in the peritoneal fluid in patients with deep infiltrative endometriosis. *Journal of Obstetrics and Womens Diseases*, vol. 66, no 1, pp. 38–45. doi: 10.17816/JOWD66138-45
7. Yarmolinskaya M.I., Molotkov A.S., Denisova V.M. (2012) The role of matrix metalloproteinases in pathogenesis of genital endometriosis. *Journal of Obstetrics and Womens Diseases*, vol. 61, no 2, pp. 92–100. (in Russian)
8. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I. (2002) Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 37, no 6, pp. 375–536. doi: 10.1080/10409230290771546
9. Szymanowski K., Dera-Szymanowska A., Mikotajczyk M., Wirstlein P. (2016) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) and transforming growth factor-P2 (TGF-P2) expression in eutopic endometrium of women with peritoneal endometriosis. *Ann Agric Environ Med*, vol. 23, no 4, pp. 649–653. doi: 10.5604/12321966.1226861
10. Collette T., Maheux R., Mailloux J., Akoum A. (2006) Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Human Reproduction*, vol. 21, no 12, pp. 3059–3067. doi: 10.1093/humrep/del297
11. Ilina A.R., Mironova E.S., Linkova N.S. (2019) Matrix Metalloproteinases is One of the Chain of External Genital Endometriosis Pathogenesis. *Progress in Physiological Science*, vol. 50, no 4, pp. 81–86. doi: 10.1134/S0301179819040040. (in Russian)