

## ЗНАЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АДЕНОМИОЗА

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

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: h.harutyunyan76@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: prof.kustarov@gmail.com

Проведено изучение распространенности генных вариантов металлопротеиназы-1(MMP-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1(PAI-1) (4G/5G) у пациенток с различными клиническими вариантами течения аденомиоза для выявления значения генетических факторов в патогенезе аденомиоза. Оценка распространенности генных вариантов матричной металлопротеиназы-1(MMP-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1(PAI-1) (4G/5G) проведена у 150 больных с аденомиозом. Группу популяционного контроля составили 200 жителей Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Результаты исследования показали, что наличие у пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 и сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5G PAI-1 характерно для пролиферирующей формы аденомиоза и прогресса заболевания. Молекулярно-генетическое исследование изменений генной активности у больных аденомиозом обнаружило значимую роль определенных генных полиморфных вариантов гена матричных металлопротеиназ (MMP-1) и гена ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1) в развитии различных клинических форм течения заболевания, что показало значимость в патогенезе аденомиоза механизмов регуляции процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса.

Ключевые слова: Аденомиоз, матричная металлопротеиназа-1(MMP-1), ингибитор активатора плазминогена типа 1(PAI-1), экстрацеллюлярный матрикс.

## OF GENETIC FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF ADENOMYOSIS

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

<sup>1</sup>GBOU VPO «Saint Petersburg State Pediatric Medical University» Ministry of Health of the Russian Federation. Saint Petersburg, e-mail: h.harutyunyan76@mail.ru;

<sup>2</sup>FGBU «Medical research center named after VA Almazov» Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, e-mail: prof.kustarov@gmail.com

The study of prevalence of gene variants metalloproteinase-1 (MMP-1) (1G / 2G) and activator inhibitor (4G / 5G) plasminogen-1 (PAI-1) in patients with different clinical versions flow adenomyosis for detecting values of genetic factors in the pathogenesis of adenomyosis. Assessment of gene variants incidence matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) (1G / 2G) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (4G / 5G) was performed in 150 patients with adenomyosis. Population control group included 200 residents of St. Petersburg and Leningrad region. The results showed that the presence of homozygous patients (2G / 2G) or heterozygous (1G / 2G) gene status of MMP-1 and a combination of alleles MMP-1 2G and 5G PAI-1 characteristic of proliferating forms of adenomyosis and progress of the disease. Molecular genetic study of changes in gene activity in patients with adenomyosis showed a significant role of specific gene polymorphisms of the gene of matrix metalloproteinases (MMP-1) gene and plasminogen activator inhibitor type 1 (of PAI-1) in the development of different clinical forms of the disease that showed significance in the pathogenesis of adenomyosis mechanisms regulating extracellular matrix remodeling processes.

Keywords: Adenomyosis, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and extracellular matrix.

Аденомиоз является одним из наиболее распространенных заболеваний, занимая в структуре гинекологической патологии третье место после воспалительных заболеваний и миомы матки. По данным ряд авторов, частота его составляет от 12 до 50 % [2,5,7]. Концепция клиники, тактики ведения, пато- и морфогенеза аденомиоза подробно обсуждаются в литературе не одно десятилетие. [3,6], однако многие аспекты данной

проблемы остаются малоизученными. Практически отсутствуют сведения о молекулярно-биологических особенностях процессов неоангиогенеза и экспрессии факторов роста, отражающих ремоделирование стромы в аденомиозе [3]. В данном этапе развития медицины, учитывая важную роль матриксных металлопротеиназ (ММП) в ремоделировании тканей и органов, представляет интерес их регулирование в репродуктивных органах женщин. Известно более 20 видов ММП, которые осуществляют различные этапы деградации коллагена, эластина и других белков экстрацеллюлярного матрикса. Среди них особую роль играет интерстициальная коллагеназа (матриксная металлопротеиназа-1, ММП-1), которая осуществляет первичную деградацию молекул коллагена, после чего происходит их дальнейший распад под действием остальных ММП, в частности, стромелизина-1 (ММП-3) [3,10]. Значительную роль в ремоделировании тканей матки играют также факторы системы гемостаза, которые, как правило, являются специализированными протеазами, осуществляющими активацию факторов каскада свертывания крови и фибринолиза. В связи с этим **целью настоящего исследования** явилось изучение распространенности генных вариантов металлопротеиназы-1(ММП-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1(PAI-1) (4G/5G) у пациенток с различными клиническими вариантами течения аденомиоза для выявления значения генетических факторов в патогенезе аденомиоза.

**Материалы и методы.** В настоящее исследование включены 150 больных с внутренним эндометриозом тела матки. Критерием включения в исследование пациенток явилось: наличие диффузного аденомиоза у женщин репродуктивного и перименопаузального возраста (на основании тщательного анализа клинико-анамнестических и инструментально-диагностических данных: эхографическое, доплерометрическое, гистероскопическое обследование с пункционной биопсией миометрия). Возраст больных составлял от 32 до 48 лет ( $41 \pm 2,5$  года). Длительность клинических проявлений заболевания была от нескольких месяцев до 10 лет. Основными симптомами заболевания были обильные и длительные менструации у 34 (22,7 %) пациенток, скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации у 97 (64,7 %) женщин, болезненные менструации у 58 (38,7 %) обследованных. У 73 (48,7 %) больных отмечались тазовые боли различной интенсивности и у 33 (22 %) женщин – диспареуния. Первичное бесплодие имело место у 14(9,3 %) женщин, а вторичное – у 19 (12,7 %). Известно, что аденомиоз часто сопровождается маточными кровотечениями, приводящими к анемизации больных. Исходя из полученных данных, показатель уровня гемоглобина в пределах 125–110 г/л наблюдался у 116 (77,3 %) пациенток с внутренним эндометриозом тела матки. Показатель уровня гемоглобина 109–100 г/л отмечала 34(22,7 %) больных с аденомиозом. При определении размеров матки получили следующие результаты: у 58 (38,7

%) пациенток матка соответствовала размерам 5–6 н.б., у 61 (40,7 %) больных – 7–8 н.б., у 31 (20,6 %) женщин – 9–12 н.б. Средняя величина матки в среднем составила 7,8±1,2 н.б. 49 пациенткам производилась экстирпация матки, вопрос об удалении придатков решался индивидуально. Основными показаниями для проведения гистерэктомии у обследованных больных с аденомиозом были: маточные кровотечения у 34 больных (69,4 %); сильные тазовые боли у 15 пациенток (30,6 %); постгеморрагическая анемия у 34 больных (69,4 %); отсутствие эффекта от проведенной терапии аГнРГ у 37 (75,5 %).

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили с помощью ультразвукового диагностического прибора SonolineG40, фирмы Siemens с использованием трансвагинального датчика (частота 6,7МГц). При ультразвуковом исследовании определяли размеры матки, толщину и структуру миометрия, эндометрия, размеры яичников. После проведения биометрии матки и яичников осуществляли цветное доплеровское картирование с последующей оценкой кривых скоростей кровотока в маточных артериях. Для устранения низкочастотных сигналов, производимых движениями стенок сосудов, применяли фильтр 100 Гц. Общая мощность доплеровского излучения не превышала 100 мВт/см<sup>2</sup>. Ультразвуковое исследование органов малого таза и доплерографию проводили на 20–23 дни менструального цикла. Для качественного анализа спектральных кривых скоростей кровотока оценивали ИР – индекс резистентности. Операционную гистерорезектоскопию (фирмы Olympus) с биопсией миометрия выполняли пациенткам с монополярной петлей резектоскопа. Захватывали участки миометрия в области визуализируемых железистых ходов (при их отсутствии – в нескольких произвольных точках на разных стенках полости матки).

Морфологические исследования были выполнены у всех 49 оперированных больных. Срезы операционного материала окрашивались гематоксилином-эозином, пикрофуксином для выявления соединительной ткани. Просмотр микропрепаратов осуществлялся на микроскопе МИКМЕД-2, видеограммы получены с помощью автоматического анализатора изображения ВИДИО-ТЕСТ-2,0. При определении функционально активного и неактивного типов эндометриоидных гетеротопий использовали морфологическую классификацию предложенная И.И. Куценко[4], которая позволяет выделять следующие формы заболевания: пролиферирующую, стабильную (фиброзную), регрессирующую (дистрофическую).

Оценка распространенности генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 (ММР-1) (1G/2G) и ингибитора активатора плазминогена-1 (РАI-1) (4G/5G) проведена у 150 больных с аденомиозом. Группу популяционного контроля составили 200 жительниц Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов крови больных и доноров с применением набора «ДНК-Сорб» («Литех», Москва). Тип

промоторного полиморфизма генов MMP-1 (1G/2G), PAI-1 (4G/5G) определяли с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции ДНК (ПЦР ДНК). Продукты ПЦР после электрофореза оценивали в агарозном геле при окраске этидий-бромидом.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общеупотребительных методов параметрической и непараметрической статистики. Методы описательной (дескриптивной) статистики включали в себя оценку среднего арифметического ( $M$ ), средней ошибки среднего значения ( $m$ ) – для признаков, имеющих непрерывное распределение; а также частоты встречаемости признаков с дискретными значениями. Для оценки межгрупповых различий значений признаков, имеющих непрерывное распределение, применяли t-критерий Стьюдента. Анализ зависимости между признаками проводили с помощью г-критерия Пирсона (где  $g=0,3-0,5$  – умеренная,  $g=0,5-0,7$  – значительные и  $g=0,7-0,9$  – сильно выраженная связь). Статистическая обработка материала выполнялась на ЭВМ с использованием стандартного пакета программ прикладного статистического анализа (Statistica for Windows v. 6.0). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий или факторных влияний) принимали равным 0,05.

### **Результаты исследования и обсуждение**

Анализ распределения изученных генных вариантов показал высокую частоту встречаемости альтернативных аллелей генов MMP-1, PAI-1 у обследованных больных аденомиозом. Получены результаты, свидетельствующие о высокой частоте встречаемости генотипа 1G/1G MMP-1 в группе женщин 25 (16,7 %), находившихся в перименопаузе и имевших по данным анамнеза неактивное течение заболевания (малые, стабильные размеры матки, невысокая частота меноррагий). Основными симптомами были скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации и альгодисменорея. Размеры матки в данной группе больных соответствовала размерам 5–6 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР=0,83\pm 0,01$ . Кроме того, было обнаружено, что у больных стабильным течением заболевания отмечалась повышенная встречаемость генотипа 1G/1G гена MMP-1, тогда прогресс аденомиоза ассоциировался с пониженной частотой данного аллеля ( $p=0,02$ ). Молекулярно-генетическое исследование установило роль гиперактивных генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 в прогрессирование аденомиоза. Наличие у 92 (61,3 %) пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 ассоциировано с прогрессированием заболевания. Основными симптомами у пациенток из данной клинической группы были обильные и длительные менструации и болевой синдром. Размеры матки у 31 пациенток в данной группе больных соответствовала размерам 9–12 н.б.,

у 61 больных – 7–8 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР=0,70\pm 0,02$ . При исследовании частоты встречаемости различных генотипов гена PAI-1 у пациенток с различными клиническими течениями аденомиоза была обнаружена достоверная ассоциация между наличием аллеля 5G гена PAI-1 и пролиферирующей формой заболевания ( $p=0,04$ ). При анализе гаплотипов MMP-1/PAI-1 у обследованных больных с аденомиозом было обнаружено, что сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5GPAI-1 коррелировало с прогрессированием заболевания и достоверно чаще встречалось у больных с пролиферирующей формой аденомиоза ( $p=0,05$ ) по сравнению с 33 (22 %) больными, имевшими стабильную или фиброзную форму опухоли. У пациенток, имевших стабильную или фиброзную форму опухоли, основными симптомами были: скудные темно-коричневые выделения до и (или) после менструации, альгодисменорея и диспареуния. Размеры матки у всех пациенток в данной группе соответствовали размерам 5–6 н.б. При анализе доплерометрических характеристик кровотока ИР в маточных артериях в среднем составил  $ИР=0,79\pm 0,02$ .

Среди 49 оперированных больных генотип 1G/1G MMP-1 имели 8(16,3 %) женщин, находившихся в перименопаузе, имевших по данным морфологии регрессирующий (дистрофический) тип опухоли и 10 (20,4 %) больных, имевшими стабильную или фиброзную форму опухоли, находившихся в репродуктивном периоде. У 31(63,3 %) оперированных пациенток пролиферирующей формой аденомиоза выявили гомозиготное (2G/2G) или гетерозиготное (1G/2G) состояния гена MMP-1 и сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5GPAI-1. При макроскопическом исследовании матка была округлой или бугристой формы, увеличена в основном за счет утолщения задней (61,2 %) и передней стенок, обусловленного наличием аденомиоза. Консистенция маки в большинстве случаев была неравномерно плотной. На разрезе в миометрии очаги аденомиоза имели вид участков уплотнения ячеистого строения, без капсулы и четких границ, представляющих собой инфильтраты и кистозные образования. В ряде случаев в толще миометрия имелись мелкие (0,3–0,8 см) полости с геморрагическим содержимым. Очаги аденомиоза были представлены железистыми структурами различной величины и стромой окружающей железы, которая имела цитогенный характер и состояла из многочисленных фибробластоподобных клеток с различным содержанием коллагеновых волокон. Характерным было наличие множества тонкостенных сосудов. Как правило, стромальный компонент преобладал над железистым. Преобладание стромального компонента в основном отмечалось в группе 31(63,3 %) пациенток клинически активным проявлением, у которых морфологически верифицирована пролиферирующая форма аденомиоза. Вокруг очагов аденомиоза обнаруживались характерные изменения миометрия: гипертрофия миоцитов, формирование периваскулярных

зон роста, сходных с наблюдаемыми в миомах. Функционально активные эндометриоидные гетеротопии часто располагались вблизи гетеротопий, в которых эпителий не имел признаков функциональной активности, что согласуется с данными Унанян А.Л. [7].

Молекулярно-генетическое исследование изменений генной активности у больных аденомиозом обнаружило значимую роль определенных генных полиморфных вариантов гена матриксных металлопротеиназ (ММП-1) и гена ингибитора активатора плазминогена типа 1 (РАI-1) в развитии различных клинических форм течения заболевания [1], что показало значимость в патогенезе аденомиоза механизмов регуляции процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса. Экстрацеллюлярный матрикс, являющийся супрамолекулярным комплексом, образующим внеклеточное окружение, влияет на дифференцировку, пролиферацию, организацию и прикрепление клеток. Он включает в себя интерстициальный коллаген, протеогликаны, фибронектин, ламинин и другие крупномолекулярные соединения. При опухолевом росте в миометрии происходят изменения экспрессии ряда генов внеклеточного матрикса, что ведет к усиленному накоплению коллагена, мукополисахаридов. Ультраструктура коллагеновых фибрилл в ткани аденомиоза имеет нетипичное строение, ориентацию и отличается от ткани нормального миометрия [9]. Матриксные металлопротеиназы участвуют в процессах ремоделинга коллагена в опухолевых тканях, осуществляя различные этапы деградации коллагена, эластина и других белков экстрацеллюлярного матрикса [3,10]. Полиморфизм регуляторных участков физиологически значимых генов существенно изменяет транскрипционную активность генов, продукцию мРНК и специфических белков, что приводит к усилению генной активности. В нашем исследовании установлена роль гиперактивных генных вариантов матриксной металлопротеиназы-1 в развитии клинически активных форм аденомиоза [1]. Наличие у пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена ММП-1 ассоциировано с усиленной склонностью к диссеминации новообразования и, следовательно, к развитию прогресса заболевания. Напротив, носительство низкоактивного аллеля 1G (генотип 1G/1G) играет протективную роль в развитии клинически активных форм аденомиоза. При носительстве аллеля 2G у больных наблюдается более активная продукция проэнзима ММП-1, это приводит к активации коллагенолиза и увеличивает вероятность инвазии клеток эндометрия в прилежащие области с их последующим эктопическим ростом. Кроме того, процессы неоангиогенеза, играющие важную роль в патогенезе аденомиоза и миомы матки, прогрессируют при усилении активности матриксных металлопротеиназ [8]. Участвуя в процессах деградации матрикса при росте тканей, они тем самым формируют пространства для прорастания в межклеточном матриксе новых капилляров, обеспечивающих питание новообразований. Значительную роль в ремоделировании тканей миометрия играют

также факторы гемокоагуляции, которые являются специализированными протеазами, осуществляющими активацию факторов каскада свертывания крови и фибринолиза. Результаты изучения нами полиморфизма гена ингибитора активатора плазминогена типа 1 (РАI-1) показали значение наличия аллеля 5G, характеризующегося умеренной транскрипцией и, следовательно, невысоким уровнем индукции РАI-1, в развитии клинически значимых форм аденомиоза. Кроме того, обнаружена корреляция прогресса заболевания с наличием у больных ассоциации аллелей 2GMMP-1/5GPAI-1. Роль указанных полиморфных вариантов в патогенезе клинически значимых форм заболевания связана с изменением процессов фибринолиза. Наличие аллеля 5G гена РАI-1 характеризуется низкой экспрессией белка и, таким образом, при этом в меньшей степени ингибируется выработка плазмينا, что приводит к усилению образования активной матриксной металлопротеиназы-1 из ее предшественника [10].

### **Выводы**

Таким образом, молекулярно-генетическое исследование изменений генной активности у больных аденомиозом обнаружило значимую роль определенных генных полиморфных вариантов гена матриксных металлопротеиназ (MMP-1) и гена ингибитора активатора плазминогена типа 1 (РАI-1) в развитии различных клинических форм течения заболевания, что показало значимость в патогенезе аденомиоза механизмов регуляции процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса. Наличие у пациенток гомозиготного (2G/2G) или гетерозиготного (1G/2G) состояния гена MMP-1 и сочетание аллелей 2G MMP-1 и 5GPAI-1 характерно для пролиферирующей формы аденомиоза и прогресса заболевания. Определение полиморфных генных вариантов MMP-1 и РАI-1 может быть использовано в целях прогноза течения заболевания.

### **Список литературы**

1. Гайдуков С.Н., Арутюнян А.Ф., Кустаров В.Н. Роль генного полиморфизма матриксных коллагеназ в профилактике и тактике ведения больных с аденомиозом // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 1–10. – С. 2019-2022.
2. *Доброкачественные заболевания матки* / А.Н. Стрижаков, А.И. Давыдов, В.М. Пашков, В.А. Лебедев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 312 с.
3. Киселев В.И., Лященко А.А. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов. – М., 2005. – 348 с.
4. Куценко И.И. Клинико-морфологическая диагностика и особенности лечения различных по активности форм генитального эндометриоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук.

– М., 1995. – 52 с.

5. Медицинские и социальные аспекты генитального эндометриоза / Л.В. Адамян, М.М. Сонова, Е.С. Тихонова, Э.В. Зимина, С.О. Антонова // Проблемы репродукции. – 2011. – № 6. – С.78-81.
6. Современное состояние вопроса о патогенезе, клинике, диагностике и лечении миомы матки у женщин репродуктивного возраста / И.С. Сидорова, А.Л. Унанян, М.Б. Агеев, Н.В. Ведерникова, М.Н. Жолобова // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2012. – № 4. – С.22-28.
7. Унанян А.Л. Эндометриоз тела матки и яичников: новые аспекты патогенеза, клиники и лечения: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2007. – 50с.
8. Angiogenesis and Endometriose / Becker C.M., Bartley J., Mechsner S., Ebert A.D. // ZentralbiGynakol. – 2004. – Vol. 126, № 4. – P. 252–258.
9. Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium / Leppert P.C., Baginski T., Prupas C., Catherino W.H., Pletcher S., Segars J.H. // Fertil. Steril. – 2004. – Vol. 82. – P. 1182-87.
10. Curry T.E.Jr., Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle // Endocr Rev. – 2003. – Vol. 24. – P. 428–465.