

for immunohistochemical expression of cluster of differentiation (CD4 +, CD8 +, CD68 +).

It was found that the development of gastroduodenal EUL's in patients with RA characterized by the longer period of disease and activity of inflammation index DAS 28, levels of systemic inflammation (CRP), a significant radiological stage of RA joints lesion and functional insufficiency ( $p < 0.05$  and more). The features of expression, histotopography and distribution of T-lymphocytes and macrophages cellular elements in the mucous membrane of GDZ in patients with EUL are decreased T-helper function (CD4 +), increased immune

cytolysis (CD8 +) and macrophage (CD68) reaction. Macrophage-T-helper disbalance in the mucosa of GDZ in RA were detected by immunohistochemistry at earlier stage, before clinical features and UE visualization. This phenomenon may be as a marker of "hidden" gastropathy in RA patients and requires a future investigations of the effectiveness of prevention gastroprotection at this stage of the disease.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, erosive and ulcerative lesions of gastroduodenal zone, C-reactive protein, mucous cell (T- lymphocyte, phagocyte), immunity.

УДК 618.145 – 002-091.8:612.017.1+577.112.85:577.218

### ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МАТРИЧНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ 9 В ЕКТОПІЧНОМУ ЕНДОМЕТРІЇ У ЖІНОК З ЕНДОМЕТРІОЗОМ ТА ЇХ РОЛЬ В ЛОКАЛЬНОМУ ІМУНІТЕТІ

*КОВАЛЬ Г.Д., КУРЧЕНКО І.Ф., ЧОП'ЯК В.В., КУРЧЕНКО А.І.*

Буковинський державний медичний університет (Чернівці), Львівський Національний університет ім. Д. Галицького (Львів), Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (Київ)

Ендометриоз належить до найпоширеніших захворювань репродуктивної сфери, характеризується ектопічним розростанням ендометрію в позаматковому просторі, асоціюється з безпліддям та імунологічною дисфункцією. Актуальною проблемою патогенезу ендометриозу є дослідження факторів та механізмів, що сприяють імплантації ектопічного ендометрію. В світлі останніх наукових подій, важливу роль в цих процесах приділяють різноманітним протеїназам [10,12]. Клас протеїназ представлений цистеїновими, сериновими, аспартильними та металозалежними протеазами. Матриксні металопротеїнази належать до родини Zn<sup>2+</sup>- та Ca<sup>2+</sup>-залежних ендopeптидаз, що приймають участь у ремоделюванні сполучної тканини шляхом руйнування її органічних компонентів при фізіологічних значеннях рН [10,9]. Свою назву ММП отримали за здатність специфічно гідролізувати основні білки міжклітинного матриксу (Nagase). Система матриксних металопротеїназ складається з ферментативних компонентів (ММП) і фермент інгібуючого компонента - тканинних інгібіторів металопротеїназ або TIMPs [9]. Ці компоненти включають, серед іншого, колаген, желатин, фібронектин і ламінін. Деградація позаклітинного матриксу ММП відбувається в нормальних повсякденних фізіологічних процесах, таких як загоєння ран, ангиогенез, а також при різних аспектах репродуктивного процесу. Активність цих ферментів контролюється рівнями тканинних або

клітинних інгібіторів металопротеїназ TIMPs. На сьогоднішній день були визначені гомологи 25-ти ММП хребетних та 22-х ММП людини. Кожна ММП визначена або під загальним ім'ям або відповідно до послідовної цифрової системної номенклатури, прийнятою для всіх хребетних [8,9,10]. ММП також класифікуються за підгрупами на основі їх структури і субстратної специфічності. Ці класи включають колагенази (ММП-1, ММП-8 та ММП-13), желатинази (ММП-2 і ММП-9), матрилізини (ММП-7 і ММП-26), стромелізини (ММП-3 і ММП-10), стромелізини (ММП-11 і ММП-12), матриксні металопротеїнази мембранного типу (MT), такі як: (ММП-14, ММП-15, ММП-16, ММП-17, ММП-24 і ММП-25) або інші ММП (ММП-19, ММП-20, ММП-23, ММП-28). Більшість ММП є секретуємими протеїназами. Однак існує клас ММП, які мають трансмембранні області і експресуються на клітинній поверхні - матриксні металопротеїнази мембранного типу - MT-ММП, вони можуть функціонувати як класичні протеїнази в якості співактиваторів інших ММП. Для того, щоб ММП виконували свої звичайні функції, вони повинні бути в правильному перичелюлярном місці, в певний фізіологічний момент часу, і у відповідному "активному" стані. Для правильної функції ММП це має першорядне значення і жорстко регулюється. Це регулювання функції ММП здійснюється шляхом: 1) синтезу ММП у неактивній (пре-) формі, 2) активації прихованих ММП у міжклітинному просторі 3) зниженні активності

MMP у позаклітинному середовищі інгібіторами металопротеїназ TIMPs сироваткового походження. На тканинному або клітинних рівнях, інгібітори металопротеїназ TIMPs є основними ендogenous регуляторами діяльності MMP. На сьогоднішній день визначено чотири гомологічних TIMPs (від TIMP-1 до TIMP-4). TIMPs являють собою сімейство секретуємих білків, які зв'язують та інгібують активну MMP при мольній еквівалентності. Індивідуальні TIMPs проявляють диференційні здатності інгібувати різні MMP. Окрім того, TIMPs є багатофункціональними білками, які також беруть участь у регуляції клітинної проліферації, апоптозу і диференціації. Таким чином, TIMPs важливі не тільки в процесах розщеплення екстрацелюлярного матриксу, але і в регуляції клітинних функцій. Не дивлячись на свою структурну схожість, багато MMP здатні розпізнавати окремі компоненти екстрацелюлярного матриксу. Наприклад, колагенази (MMP-1, -8 і -13) здатні розщеплювати як фібрилярні, так і не фібрилярні колагени. Фібрилярні колагенази, розщеплюючи колаген, змінюють його стабільність і розчинність, що робить його сприйнятливим до широкого спектру тканинних протеїназ, які включають в себе желатинази (MMP-2, -9) і стромелізини (MMP-3, -10). Желатинази і стромелізини також здатні змінювати властивості колагену IV типу, ламініну, фібронектину і тенасцину. На додаток до деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу, багато MMP також проявляють свою активність по відношенню до інших MMP, факторів росту, цитокінів і молекул клітинної адгезії. Ці здібності MMP розширювати репертуар своїх властивостей дозволяє їм потенційно впливати на функціональну активність клітин шляхом розщеплення молекул клітинної адгезії, біологічно активних молекул клітинної поверхні, шляхом розщеплення поверхневих рецепторів та інактивації біологічно активних білків [7,8,9,10].

Таким чином, точний контроль у відповідний момент часу рівня експресії та функції MMP має величезне значення для нормального перебігу фізіологічних процесів. Неправильна експресія MMP, або у неправильний час або у невідповідному рівні, безсумнівно, може призвести до патофізіологічних змін у результаті зміни клітинної поведінки. Ці ферменти є незамінними учасниками багатьох фізіологічних процесів - морфогенезу, резорбції та ремоделювання тканин, міграції, адгезії, диференціювання та проліферації кліток (0). Значна, інколи ведуча роль, MMP доведена й при багатьох патологічних станах, таких як ревматоїдний артрит, остеоартрит, періодонтит, ряд аутоімунних захворювань [8,9,10]. Проте, найцікавішою виявилася роль MMP у розвитку та генералізації пухлинної інва-

зії та метастазування. [2,3,4]. Для багатьох типів пухлин зростання рівнів желатиназ (MMP-2, -9) в плазмі крові позитивно корелює з високими показниками метастазування та вважається значимим прогностичним фактором. Наприклад, у пацієнтів з меланою, високі рівні MMP корелюють з важчим перебігом хвороби та низьким виживанням [2,3,4,12]. Не менш цікавим є й результати досліджень експресії MMP залежно від типу тканин. Виявилось, що найбільше виражені зміни експресії MMP в тих тканинах, що зазнають інтенсивної циклічної перебудови, наприклад, таких як ендометрій людини та післяпологова матка мишей. Зокрема в епітеліальних клітинах ендометрію людини відмічається висока активність MMP (метрилізину) в проліферативній, пізній секреторній та менструальній фазах циклу, коли відбуваються зміни ендометрію і підвищений рівень естрогенів по відношенню до прогестерону. Відомо, що експресія MMP-1 в клітинах ендометрію залежить від рівня естрадіолу та прогестерону, а MMP-2 та TIMP-1, ймовірно, синтезуються конститутивно [8,9,11,13].

Добре відомо, що система MMP відіграє важливу роль у нормальному розвитку і зростанні ендометрію, а також багатьох інших фізіологічних процесах. Зокрема, показано, що успішна імплантація зародка при екстракорпоральному заплідненні залежить від відповідного стану матки та від активності MMP, цитокінів, простагландинів, молекул адгезії [7,8,11]. В біоптатах маткового епітелію рівні транскриптів колагену 1 типу та MMP-2 є вищими у жінок з діагнозом ідіопатичне безпліддя при нормальних фолікулогенезі, менструальному циклу та овідсутності злукового процесу і особливо підвищувався у жінок з повторними викиднями. Також відомо, що підвищення активності і вмісту MMP-2 та зниження рівня TIMP перешкоджають нормальному процесу інвазії бластоцисти [11,12]. Експресія, рівень та активність MMP регулюються статевими гормонами [8,9]. Прогестерон та естрогени в культурі клітин ендометрію знижують активність металопротеїназ, проте, за відміни гормонів активність різко підвищується, що супроводжується морфологічними змінами клітин ендометрію, характерними для маткового епітелію в період менструації [7,8,10]. При необхідності підтримання балансу в організмі між MMP і TIMPs, очевидним стає той факт, що аберантна експресія між MMP і TIMPs часто пов'язана з патофізіологією багатьох захворювань. У цей список захворювань потрапляє й ендометріоз. Ендометріодна (ектопічна) тканина, а також еутопічна тканина ендометрію у жінок при розвитку захворювання є результатом зміни патернів експресії MMP і TIMPs, які сприяють вторгненню та реконструк-

ції ендометріюїдної тканини. Таким чином, існує припущення, що успішна модуляція системою MMP/ TIMPs може обмежити інвазивні події та запобігти розвитку прогресування ендометріозу. При нормальних фізіологічних умовах в ендометрії, система MMP регулюється стероїдними гормонами, факторами росту і цитокинами. Наукові дослідження вказують на функціональну роль MMP у розвитку ендометріозу. MMP виробляються ендометріюїдною тканиною і цей патерн експресії MMP змінюється в порівнянні з еутопічним ендометрієм.

Ці спостереження дають підстави припускати, що система MMP може бути приваблива для майбутнього лікування ендометріозу, який становить актуальну проблему на даний час, так як спостерігається у 10 - 15% всіх жінок репродуктивного віку і до 40 до 50% всіх жінок з безпліддям. Класично захворювання визначається присутністю стромі і залозистої тканини ендометрію поза маткою. Вважається, що хвороба розвивається в результаті заносу під час ретроградної менструації життєздатних тканин ендометрію в черевну порожнину. Оскільки, майже всі жінки репродуктивного віку володіють певним ступенем ретроградної менструації, передбачається існування інших чинників, які сприяють розвитку і прогресуванню ендометріозу. Численні дослідження припустили, що існує зв'язок між наявністю ендометріозу і змінами локального імунітету. Посилення запальної реакції в очеревині, про що свідчать підвищені рівні цитокинів у перитонеальній рідині, добре відомо у жінок з ендометріозом.

Було продемонстровано наявність змін в структурі експресії для кількох членів системи MMP в еутопічному та ектопічному ендометрії, отриманому від жінок з ендометріозом. Ендометріюїдні імплантати виражають аберрантні або підвищені рівні MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 і MMP-9, а також зниження рівня інгібіторів TIMP-1 і TIMP-2. Разом ці дані можуть бути інтерпретовані як припущення, що посилення експресії MMP, будь то у зв'язку зі збільшенням експресії MMP чи зниженням експресії TIMP, буде означати, інвазивний характер ендометріюїдних імплантатів. На додаток до цих, асоціативними даними, які припускають роль MMP у патофізіології ендометріозу, функціональні дослідження також вказують на роль MMP у розвитку ендометріозу. Використанням моделі ендометріозу на мишах було показано, що посилення експресії MMP на тканині ендометрію відбувається паралельно зі здатністю цієї тканини розвивати ектопічні вогнища. Розвиток ендометріозу на тлі посилення експресії та функції MMP було заблоковано при одночасному введенні прогестерону одночасно з інгібіторами MMP. Для глибшого

розуміння ролі MMP в етіології ендометріозу, цей момент має першорядне значення для розшифровки механізмів, які призводять до аномальної експресії і функції цих протеаз. Ці механізми можуть включати наявність вроджених аномалій у ектопічному ендометрії у жінок з ендометріозом, змін у функціональному складі імунних і перитонеальних клітин, які співставні з дією чисельних цитокинів і факторів росту, кількість яких підвищена у перитонеальній рідині у жінок з цим захворюванням.

**Мета дослідження:** визначити активність та роль в локальному імунітеті MMP9 в ендометріозних вогнищах жінок з безпліддям асоційованим з ендометріозом.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджено активність матричних металопротеїназ (MMP2, MMP9 та MMP11) на 20 зразках ектопічного ендометрію (ендометріозної тканини), у жінок з ендометріозом, отриманих лапароскопічним методом. Досліджувані зразки фіксували у формаліні з наступним формуванням парафінових блоків та отриманням зрізів товщиною 4мкм. Визначення активності MMP2, 9 та 11 проводилося імуногістохімічним методом за стандартною методикою з використанням кролячих моноклональних антитіл проти людських MMP2, MMP9 та MMP11 виробництва фірми Dako. Результати оцінювалися з використанням світлового мікроскопу Olympus CH20, підключеного до цифрової камери Nikon D90. Дані оброблялися за допомогою Adobe Photoshop, версії 3.0.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При оцінці результатів імуногістохімічного дослідження встановлено, що на границі локалізації ендометріозної тканини та очеревини відмічається підвищення активності MMP9. Також, підвищення активності MMP9 відмічалось в стромі ектопічного ендометрію на границі з підлеглою стромою (рис. 1). При оцінці результатів дослідження виявилось підвищення активності MMP9 в стромі ектопічного ендометрію на границі з підлеглою стромою, що супроводжувалося формуванням інфільтратів з макрофагального та лімфоцитарного клітинних компонентів (рис. 2, рис. 3). Таким чином, отримані результати дослідження вказують, що у вогнищах ендометріозного враження у жінок з ендометріозом відмічається підвищена активність MMP9, що може сприяти інфільтрації клітин ендометрію в очеревину та активації локального імунітету, шляхом привабливання у зону макрофагального та лімфоцитарного клітинних компонентів із формуванням інфільтратів.

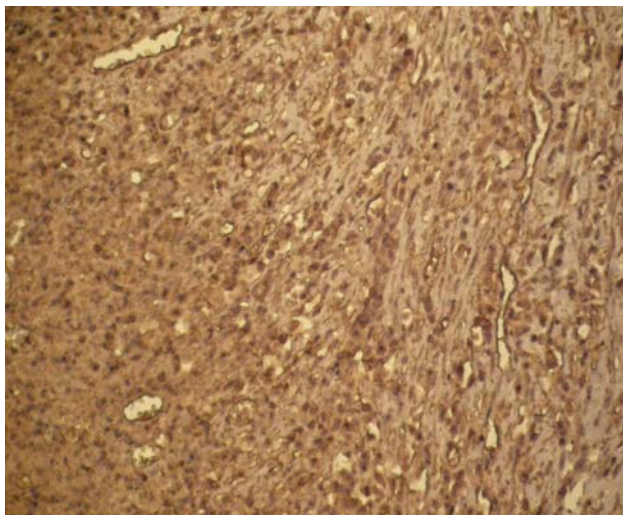


Рис. 1. Експресія ММП-9 на ектопічному ендометрії у жінок з ендометріозом

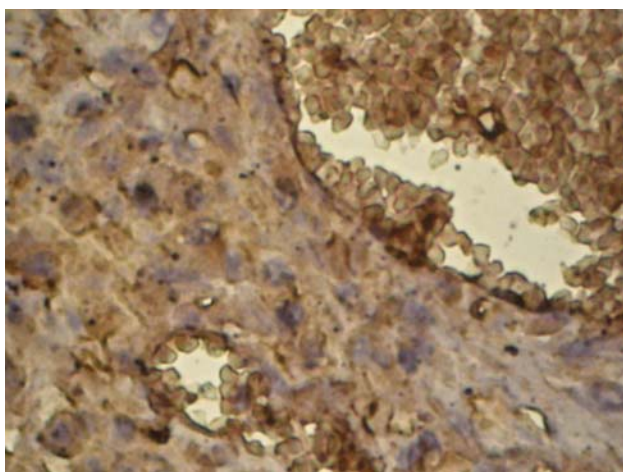


Рис. 2. Експресія ММП-9 на ектопічному ендометрії жінок з ендометріозом. Інфільтрація строми ендометрію моноцитами та макрофагами.

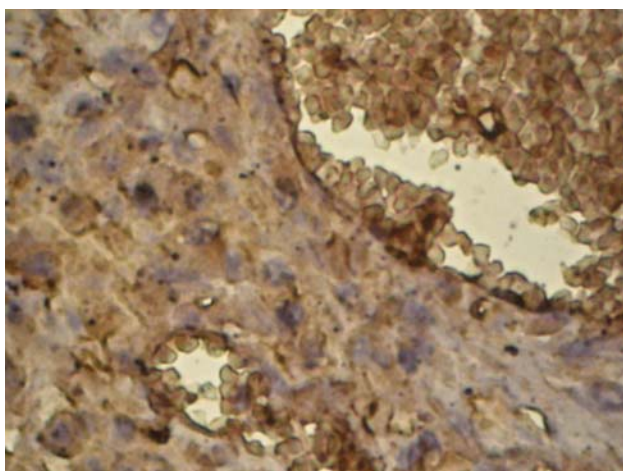


Рис. 3. Активність ММП-9 в ектопічному ендометрії у жінок з ендометріозом. Інфільтрація строми ендометрію моноцитами та макрофагами.

## ВИСНОВКИ:

1. На ектопічному ендометрії жінок з ендометріозом відмічається підвищення активності ММП9, що супроводжується інфільтрацією макрофагами та лімфоцитами.
2. Імуногістохімічне визначення ММП 9 можна використовувати в якості маркера запалення у жінок з ендометріозом.
3. Вивчення активності матричних металопротеїназ в ектопічному ендометрії жінок з ендометріозом є перспективним для подальших досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бокерия Л.А., Гудкова А.Я., Созин С.Е., Семернин Е.Н., Борисов К.В., Чухловин А.Б., Тотолян А.А., Рыбакова М.Г., Шляхто Е.В. Экспрессия генов матричной металлопротеиназы-1 (mmp-1), тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-1 (timp-1), коллагена II и III типов в миокарде больных идиопатической obstructивной гипертрофической кардиомиопатией / Л.А. Бокерия, А.Я. Гудкова, С.Е. Созин, Е.Н. Семернин, К.В. Борисов, А. Б. Чухловин, А.А. Тотолян, М.Г. Рыбакова, Е.В. Шляхто // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. - 2005. - Т. 6, № 4. - С. 35-42.
2. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Пророков В.В., Кушлинский Н.Е. // Матричные металлопротеиназы 2, 3, 13 и их тканевой ингибитор 2-го типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой / Е. С. Герштейн, А. Е. Короткова, В. В. Пророков, Н. Е. Кушлинский //
3. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Шишкин Д.А. Уровень матричной металлопротеиназы ММП-9 и ее эндогенного тканевого ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови у больных с плоскоклеточными карциномами головы и шеи / Е. В. Клишо, И. В. Кондакова, Е. Л. Чойнзонов, Д. А. Шишкин // Российский онкологический журнал. - 2008. - № 2, С. - 16-18.
4. Константинова Е.В., Шурдумова М.Х., Еремин И.И., Шостак Н.А., Скеорцова В.И. Влияние периндоприла на уровень фактора некроза опухоли-а и матричной металлопротеиназы-9 периферической крови в остром периоде атеротромботического ишемического инсульта и инфаркта миокарда / Е. В. Константинова, М.Х. Шурдумова, И. И. Еремин, Н. А. Шостак, В.И. Скеорцова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2008. - Т. 108, № S23. - С. 15-20.

5. Кушлинский Н.Е., Соловьев Ю.Н., Бабкина И.В., Герштейн Е.С., Булычева И.В. Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 9 и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ 1-го типа в сыворотке крови больных опухолями костей / Н. Е. Кушлинский, Ю. Н. Соловьев, И. В. Бабкина, Е.С. Герштейн, И. В. Булычева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2010. - Т. 149, № 2. - С. 194-196.
6. Сагиндикова Г.Е., Коган Е.А., Сатбаева Э.Б., Парамонова Н.Б. Матриксные металлопротеиназы, их ингибиторы и ангиогенез при различных морфологических вариантах предрака легкого у жителей радиоактивно-загрязненных территорий Семипалатинской области / Г.Е. Сагиндикова, Е.А. Коган, Э.Б. Сатбаева, Н. Б. Парамонова // Архив патологии. – 2008. - Т. 70, № 2. - С. 21-25.
7. Чандру Х., Шарада А., Манджунас С. Экспрессия матриксной металлопротеиназы (mmp-2) и внеклеточного индуктора матриксных металлопротеиназ (emmpin) в образцах тканей доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы / Х. Чандру, А. Шарада, С. Манджунас // Биомедицинская химия. - 2007.Т - Т. 53, № 4. - С. 461-467.
8. Baker A. B. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities / A. Baker, D. Edwards, G. Murphy // J. Cell Science. – 2002. – Vol. 115. – P. 3719–3727.
9. Irwin J. C. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle / J. C. Irwin [et al.] // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 97, N 2. – P. 438–447.
10. Leinonen T., Pirinen R., Bohm J. et. al. // Histol. Histopathol.–2008.– Vol.23, №6.– P.693–700.
11. Marbaix E. The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation / E. Marbaix [et al.] // Biochem. J. – 1995. – Vol. 305. – P. 1027–30.
12. Natoli A. K. Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression / A. Natoli [et al.] // Hypertension. - 2005. – N 46. – P. 1129–34.

## РЕЗЮМЕ

### ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАТРИЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 В ЭКТОПИЧЕСКОМ ЭНДОМЕТРИИ У ЖЕНЩИН С ЭНДОМЕТРИОЗОМ И РОЛЬ В ЛОКАЛЬНОМ ИММУНИТЕТЕ

Коваль Г.Д., Курченко И.Ф., Чопяк В.В., Курченко А.И.

Буковинский государственный медицинский университет (Черновцы), Львовский Национальный медицинский университет им. Д.Галицкого (Львов), Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца (Киев)

Исследована активность матричной металлопротеиназы 9 (ММП9) на 20 образцах эктопического эндометрия (эндометриозной ткани) у женщин с эндометриозом иммуногистохимическим методом по стандартной методике с использованием кроличьих моноклональных антител против человеческих ММП9. Установлено повышение активности ММП9 в строме эктопического эндометрия на границе с подлежащей стромой, что сопровождалось формированием макрофагальных и лимфоцитарных инфильтратов. Повышенная активность ММП9 может способствовать инвазии клеток эндометрия в брюшину и активации местного иммунитета.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, эндометриоз, матричные металлопротеиназы, локальный иммунитет.

## SUMMARY

### FEATURES OF MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSION 9 IN ECTOPIC ENDOMETRIUM IN WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS AND ROLE IN LOCAL IMMUNITY

Koval G.D., Kurchenko I.F., Chopyak V.V., Kurchenko A.I.

Bukovinian state medical university (Chernivtsi), Lviv National University. D. Galician (Lviv) O.O. Bogomoletz national medical university (Kyiv)

Abstract. The activity of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in 20 samples of ectopic endometrium (endometriotic tissue) in women with endometriosis have been investigated by immunohistochemical method with the standard method using rabbit monoclonal antibodies against human MMP9. The increasing activity of MMP9 in the stroma of ectopic endometrium on the boundary with the underlying stroma, accompanied by the formation of macrophage infiltration and lymphocytic cellular components have been revealed. Increased activity of MMP9 may contribute to endometrial cells invasion in the peritoneum and activation of local immunity.

**Key words:** immunohistochemistry, endometriosis, matrix metalloproteinases, local immunity.