

- Constantinidis T. Treatment of endometrial hyperplasias with gonadotropin-releasing hormone agonists: pathological, clinical, morphometric, and DNA-cytometric data. *Gynecol Oncol.* 1997; 65(1):102-114.
8. Sherif L. S., Totongy M., Tawfeek M., Abdel-Ghafar H., Badawy A. M. Can flowcytometric DNA studies forecast the prognosis of endometrial hyperplasia? *Europ. J. of Obstet. & Gynecol. and Reprod. Biology.* 2005; 122(1):104-106.
  9. Baak J. P. Further evaluation of the practical applicability of nuclear morphometry for the prediction of the outcome of atypical endometrial hyperplasia. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1986; 8(1):46-48.
  10. Baak J. P., Nauta J. J., Wisse-Brekkelmans E. C., Bezemer P. D. Architectural and nuclear morphometrical features together are more important prognosticators in endometrial hyperplasias than nuclear morphometrical features alone. *J. Pathol.* 1988; 154(4):335-341.
  11. Fu Y. S., Ferenczy A., Huang I., Gelfand M. M. Digital imaging analysis of normal, hyperplastic and malignant endometrial cells in endometrial brushing samples. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 1988; 10(2):139-149.
  12. Orbo A., Baak J. P., Kleivan I., Lysne S., Ptzty P. S., Broeckaert M. A., Slappendel A., Tichelaar H.J. Computerised morphometrical analysis in endometrial hyperplasia for the prediction of cancer development. A long-term retrospective study from northern Norway. *J. Clin. Pathol.* 2000; 53(9):697-703.
  13. Дубенская Л. И., Баженов С. М. Белки, ассоциированные с зонами ядрышкового организатора: практическое применение в онкоморфологии и связь с биологическими особенностями опухоли. *Арх. патологии.* 1992; 4:40-43.
  14. Куренков Е. Л., Коваленко В. Л. Активность ядрышковых организаторов слизепroduцирующего эпителия в морфогенезе приобретенных эпителиальных полипов желудка. *Росс. журн. гастроэнт., гепатол., колопрокт.* 2004; 5:30-34.
  15. Лазарев А. Ф., Климачев В. В., Бобров И. П., Лубеников В. А. Характеристика ядрышкового аппарата опухолевых клеток при раке желудка. *Арх. патологии.* 2002; 6:30-32.
  16. Эллиниди В. Н., Пожариский К. М. Ядрышковые организаторы и митотический режим в гиперпластических изменениях и раке эндометрия. *Вопр. онкологии.* 1999; 6:636-640.
  17. Derenzini M., Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991; 32:149-191.
  18. Crocker J., Boldy D. A. R., Egan M. J. How should we count AgNORs. *J. Pathol.* 1989; 158:185-188.
  19. Автандилов Г. Г., Саннев К. Б. Пloidометрия в повышении качества патогистологической диагностики. *Арх. патологии.* 2002; 3:31-33.
  20. Петров С. В., Райхлин Н. Т. (ред.). Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань, 2000.
  21. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111-118.
  22. Crocker J., Egan M. J. Correlation between NOR sizes and number in non-Hodgkin's lymphomas. *J. Pathol.* 1988; 156:233-239.
  23. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии: учебное пособие. М.: Медицина; 2002.
  24. Автандилов Г. Г., Холодова Ж. Л., Лысенко О. Н., Стрижова Н. В. Морфометрическая (оценка ploидности) характеристика степени дифференцировки аденокарцином тела матки. *Арх. патологии.* 2002; 6:27-30.

## Морфофункциональная характеристика ремоделирования слизистой оболочки матки при невынашивании беременности инфекционно-воспалительного генеза

Е. Л. Казачков, Е. Е. Воробаева, Э. А. Казачкова

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом, акушерства и гинекологии №1 ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Росздрава», г. Челябинск

## Morphofunctional characteristic of remodeling of endometrium on the syndrome of loss of pregnancy by infectionally-inflammatory genesis

E. L. Kazachkov, E. E. Voropaeva, E. A. Kazachkova

The Chelyabinsk state medical academy

### Резюме

Для оценки интенсивности и направленности процессов ремоделирования слизистой оболочки матки проведено иммуногистохимическое исследование биоптатов эндометрия с помощью моноклональных антител к желатиназам (ММР-2, ММР-9) и их ингибитору TIMP-1 у 30 женщин с хроническим эндометритом и невынашиванием беременности. Контролем служили биоптаты слизистой оболочки тела матки от 15 соматически и гинекологически здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся для обследования перед планированием беременности или контрацепции.

Результаты проведенного исследования эндометрия при невынашивании беременности, ассоциированном с хроническим эндометритом, свидетельствуют о снижении уровня экспрессии ММР-9 и ММР-2, а также повышении значений TIMP-1 как своеобразного «противовеса» системе желатиназ. Это служит причиной ремоделирования слизистой оболочки матки с прогрессирующим коллагеногенезом и атрофии железистого аппарата на фоне персистенции возбудителей инфекции, что может

явиться одним из факторов в генезе невынашивания беременности. Отмеченная прямая сильная корреляционная связь дисбаланса в системе «протеазы–антипротеазы» со степенью активности воспаления в слизистой оболочке матки позволяет наметить подходы к таргетному медикаментозному воздействию на некоторые патогенетические звенья невынашивания беременности, ассоциированного с хроническим эндометритом.

**Ключевые слова:** синдром потери плода инфекционного генеза, желатиназы, ингибитор желатиназ.

### Summary

It was carried out clinico-laboratory inspection of 30 women, which were suffering from the loss of pregnancy and from chronic endometritis. It was spent immunohistochemical research of endometrium biopsies with the help monoclonal antibodies to gelatinase (MMP-2, MMP-9) and their inhibitor TIMP-1 for an estimation of intensity and an orientation of remodeling processes in endometrium. As the control served biopsies, which were taken from a mucous membrane of body in uterus from 15 somatically and gynecologically healthy women of the reproductive age who has addressed for inspection before planning of pregnancy or contraception. Results of this experience show that the main features are reduction of MMP-9 and MMP-2 intensity expression and also increasing of values TIMP-1 as original «counterbalance» to system of gelatinases. It serves as the reason of the remodeling in endometrium with progressing of collagenogenesis and atrophy of the glandular device on a background against persistence activators of an infection. It can be one of factors in the loss of pregnancy genesis. The marked direct strong correlation between violations in the system «proteases–antiproteases» and the degree of activity of an inflammation in a mucous membrane of uterus allows to plan approaches to purposive medicamentous influence on some pathogenetic parts of loss of pregnancy, associated with chronic endometritis.

**Key words:** the syndrome of loss of pregnancy by infectionally-inflammatory genesis, gelatinases, inhibitor of gelatinases.

### Введение

В настоящее время в России сложилась неблагоприятная демографическая ситуация, характеризующаяся низкой рождаемостью, высокой смертностью, сокращением общей численности населения, в основном за счет лиц трудоспособного возраста и детей в возрасте от 0 до 18 лет. У 50-75% девочек-подростков отмечаются расстройства здоровья, способные оказать отрицательное влияние на реализацию репродуктивного потенциала.

Повсеместно отмечается рост частоты инфекционно-воспалительных процессов женских половых органов, которые нередко являются дебютом большинства гинекологических заболеваний, нарушающих функцию репродуктивной системы, и ведущих к формированию синдрома привычной потери беременности. Данная ситуация является крайне негативной на фоне продолжающейся депопуляции населения, а проблема сохранения репродуктивного здоровья отнесена к разряду приоритетных государственных задач. В свете изложенного чрезвычайно актуальным представляется изучение материального субстрата поражений различных отделов репродуктивного тракта женщин с помощью новых технологий для разработки эффективных таргетных терапевтических воздействий.

В поддержании тканевого гомеостаза ключевую роль играют матриксные металлопротеиназы (MMPs), составляющие семейство цин-

кзависимых внеклеточных эндопептидаз [1, 2]. Каждый член семейства MMPs обладает специфичностью к субнабору молекул внеклеточного матрикса [3, 4]. Группа желатиназ состоит из MMP-2 (желатиназа А) и MMP-9 (желатиназа В), деградирующих коллагены IV, V, VII, X, XI и XIV типов, желатин, эластин, белковое ядро протеогликанов, основной белок миеллина, фибронектин, фибриллин-1, предшественники TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и денатурированные коллагены [5, 6, 7]. Контроль активности MMPs обеспечивается тканевыми ингибиторами MMPs (TIMPs) ткане- и субстрат-специфическим образом [8, 9].

Регуляция синтеза MMPs и TIMPs осуществляется некоторыми про- и противовоспалительными цитокинами и факторами роста. Так, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) блокирует индуцированный IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и эпидермальным фактором роста (EGF) синтез MMPs и активатора плазминогена [1, 10, 11]. Таким образом, MMPs и TIMPs активно участвуют в воспалительных, репаративных процессах и ремоделировании тканей [12, 13].

Литературные данные подтверждают патогенетическое значение MMPs в становлении и развитии воспалительного процесса при хроническом эндометрите [14]. Однако вопросы, касающиеся дисбаланса этих цитокинов и их ингибиторов, а также роли этого дисбаланса в генезе невынашивания беременности при хро-

Е. Л. Казачков — зав. кафедрой патологической анатомии с секционным курсом Челябинской государственной медицинской академии, д. м. н., профессор;

Е. Е. Воропаева — ассистент кафедры акушерства и гинекологии №1 Челябинской государственной медицинской академии, к. м. н.;

Э. А. Казачкова — профессор кафедры акушерства и гинекологии №1 Челябинской государственной медицинской академии, д. м. н.

ническом эндометрите до сих пор остаются открытыми.

**Цель исследования** — определить роль желатиназы (ММР-2 и ММР-9) и их тканевого ингибитора ТИМР-1 в генезе невынашивания беременности, ассоциированного с хроническим эндометритом.

### Материал и методы

В работе представлены результаты комплексного морфологического исследования биоптатов эндометрия от 30 пациенток с верифицированным хроническим эндометритом и невынашиванием беременности. Эндометрий получали путем пайпель-биопсии на 20-22-й день менструального цикла. Гистологическое изучение парафиновых срезов проводили при окраске материала гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и метиловым зеленым-пиронином по Браше.

Для объективного суждения о степени выраженности хронического эндометрита применяли полуколичественный метод оценки интенсивности лимфоцитарной инфильтрации, плазматизации и фибротизации стромы эндометрия в биопсийном материале, разработанный Э.А. Казачковой [15] и в дальнейшем нами модифицированный для анализа степени активности воспалительного процесса [16].

Для оценки интенсивности и направленности процессов ремоделирования слизистой оболочки матки проведено иммуногистохимическое исследование материала с демаскировкой антигенов в СВЧ-лечи по общепринятой методике с помощью моноклональных антител к ММР-2 («Novocastra», clone 17B11, рабочее разведение 1:60), ММР-9 («Novocastra», clone 15W2, рабочее разведение 1:30) и ТИМР-1 («Novocastra», clone 6F6a, рабочее разведение 1:150).

Для визуализации антигенреактивных клеток пользовались тест-системой Novostain Universal Detection Kit («Novocastra», UK). Применение каждого вида моноклональных антител сопровождалось постановкой положительных контрольных реакций с учетом рекомендаций оригинальных инструкций к применяемым реактивам. Иммуноморфологическую оценку препарата начинали с просмотра негативного контроля. В случае отсутствия окрашивания приступали к анализу исследуемого материала.

Результаты иммуногистохимических реакций оценивали в баллах (полуколичественный метод с учетом процента окрашенных клеток: 2 балла — менее 20% маркированных клеток, 4 балла — 20-50%, 6 баллов — более 50% клеток). Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной системы анализа

цветового изображения Диа-Морф\_ Cito\_W (Россия).

Для гистохимических и иммуноморфологических исследований эндометрия контролем служили биоптаты слизистой оболочки тела матки от 15 соматически и гинекологически здоровых женщин репродуктивного возраста, обратившихся для обследования перед планированием беременности или контрацепции. Все женщины дали информированное согласие на участие в исследовании и открытую публикацию его результатов.

### Результаты исследований и их обсуждение

В эндометрии пациенток группы контроля ММР-2 локализовалась в структурных элементах стромы (фибробласты, гистиоциты, эндотелиоциты), иногда в базальных мембранах желез, что свидетельствует об участии этой протеиназы в процессах деградации внеклеточного матрикса. Экспрессия рецепторов к ММР-9 отмечалась в цитоплазме покровных эпителиоцитов и glanduloцитов желез, клеток стромы и сосудов. По мнению А.В. Кузнецовой и соавт. [17], такая локализация протеазы указывает на ее неучастие в деградации внеклеточного матрикса. Однако в ряде случаев в норме мы обнаруживали ММР-9 в базальных мембранах желез и покровного эпителия. Это подчеркивает ее значение для контролируемого ремоделирования базальных мембран эндометрия, что отмечено и другими авторами [18]. В железах функционального слоя накопление этого маркера происходило преимущественно в базальных отделах glanduloцитов и базальной мембране. ТИМР-1 обнаруживался в эпителиальных структурах эндометрия, а также в некоторых клетках стромы, эндотелии сосудов и базальных мембранах (рис. 1, см. цвет. вкладку).

При невынашивании беременности, ассоциированном с хроническим эндометритом, уровень экспонирования ММР-9 эпителиоцитами желез и клетками стромы был в 1,5 раза ниже значения данного параметра в группе контроля: в покровных эпителиоцитах и glanduloцитах желез в среднем 1,6 балла (1,2 — 2,0), в базальной мембране и клетках воспалительного инфильтрата — 1,9 балла (1,4 — 2,5). Уровень экспрессии ММР-2 был примерно в 2 раза ниже одноименных показателей контрольной группы: в эпителиальных структурах эндометрия в среднем 1,0 балл, в базальной мембране и клетках воспалительного инфильтрата — 1,2 балла. При сравнении экспонирования ММР-2 и ММР-9 в слизистой оболочке матки в обеих группах на фоне общего снижения уровня их экспрессии отмечены более вы-

сокие значения исследуемых маркеров в базальном слое эндометрия, чем в функциональном слое. При этом выявлена прямая сильная корреляционная связь анализируемых параметров со степенью активности воспаления в слизистой оболочке матки ( $r=0,72$ ). Распределение TIMP-1 в цитоплазме поверхностных эпителиоцитов и glanduloцитов желез было неравномерным (в среднем 2,0 балла) и несколько превышало уровни MMP-9 и MMP-2. Экспрессия метки TIMP-1 отмечена и в клетках воспалительного инфильтрата (макрофаги, нейтрофильные гранулоциты) (в среднем 2,2 балла) (рис. 2, см. цв. вкладку).

## Заключение

Результаты проведенного исследования эндометрия при невынашивании беременности,

ассоциированном с хроническим эндометритом, свидетельствуют о снижении уровня экспрессии MMP-9 и MMP-2, а также повышении значений TIMP-1 как своеобразного «противовеса» системе желатиназ. Это служит причиной ремоделирования слизистой оболочки матки с прогрессирующим коллагенолизом и атрофией железистого аппарата на фоне персистенции возбудителя, что может явиться одним из факторов в генезе невынашивания беременности. Отмеченная прямая сильная корреляционная связь дисбаланса в системе «протеазы-антипротеазы» со степенью активности воспаления в слизистой оболочке матки позволяет наметить подходы к таргетному медикаментозному воздействию на некоторые патогенетические звенья невынашивания беременности, ассоциированного с хроническим эндометритом.

## Литература

1. Пальцев М. А., Иванов А. А., Северин С. Е. Межклеточные взаимодействия. 2-е изд. М: Медицина; 2003.
2. Wee Yong V. Metalloproteinases: mediators of Pathology and Regeneration in the CNS. *Nature Rev. Neuroscience*. 2005; 6 (12):931-44.
3. Bergin P. J., Raghavan S., Svensson H. et al. Gastric gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 is rapidly increased in *Helicobacter felis*-induced gastritis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52 (1):88-98.
4. Brinkerhoff C. E., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature Rev. Molecular Cell Biol.* 2002; 3:207-14.
5. Bai S. X., Wang Y. L., Qin L. et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction*. 2005; 129(1):103-13.
6. Chu Py P. Y., Salamonsen L. A., Lee C. S., Wright P. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction*. 2002; 123(3):467-77.
7. Kubben F. J., Sier C. F., Schram M. T. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection favorably affects altered gastric mucosal MMP-9 levels. *Helicobacter*. 2007; 12(5):498-504.
8. Bodger K., Ahmed S., Pazmany L. et al. Altered gastric corpus expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human and murine *Helicobacter* infection. *J. Clin. Pathol.* 2008; 61(1):72-78.
9. Imtiaz M. T., Schripsema J. H., Sigar I. M. et al. Inhibition of Matrix Metalloproteinases Protects Mice from Ascending Infection and Chronic Disease Manifestations Resulting from Urogenital Chlamydia muridarum Infection. *Infect. Immunity*. 2006; 74(10):5513-21.
10. Warner B. W., Erwin C. R. Critical roles for EGF receptor signaling during resection-induced intestinal adaptation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006; 43(Suppl.1):68-73.
11. Zhang M., Fraser D., Phillips A. ERK, p38, and Smad Signaling Pathways Differentially Regulate Transforming Growth Factor- $\beta$  autoinduction in proximal tubular epithelial cells. *Amer. J. Pathol.* 2007; 170:1219-28.
12. Hiden U., Glitzner E., Ivanisevic M. et al. MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels. *Diabetes*. 2008; 57(1):150-57.
13. Skrzypczak J., Wirstlein P., Mikolajczyk M. et al. Could the defects in the endometrial extracellular matrix during the implantation be a cause for impaired fertility? *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 57(1):40-48.
14. Сухих Г. Т., Соболева Г. М., Силантьева Е. С. и др. Неоднородность показателей сывороточной активности матриксных металлопротеиназ при хроническом эндометрите. *Бюллетень. экспер. биол. мед.* 2007; 143(4): 455-57.
15. Казачкова Э. А. Введение лекарственных препаратов в слизистую оболочку матки при хронических неспецифических эндометритах и сальпингофоритах [дис. канд. мед. наук]: Челябинск. 1984; 1-196.
16. Алимова О. А., Ворopaева Е. Е., Казачкова Э. А., Казачков Е. Л. Полуколичественная морфологическая оценка активности воспалительного процесса при хроническом эндометрите. *Матер. Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы патологоанатомической службы муниципальных учреждений здравоохранения».* Челябинск: 2008; 198-201.
17. Кузнецова А. В., Пауков В. С., Волощук И. Н., Демидова И. Н. Изменение компонентов внеклеточного матрикса и его регуляторов в эндометрии женщин с привычным невынашиванием беременности. *Арх. патологии.* 2002; 64(1):18-22.
18. Соболева Г. М., Шуршаллина А. В., Сухих Г. Т. Активность матриксных металлопротеиназ -2 и -9 в сыворотке крови. *Бюллетень. экспер. биол. мед.* 2006; 141(2): 210-13.

Рисунок 1. Распределение MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в слизистой оболочке матки соматически и гинекологически здоровой женщины группы контроля:

- а) Экспонирование MMP-2 клеточными элементами стромы (фибробласты, гистиоциты) (ок. 10, об. 10);
  - б) Локализация метки MMP-2 в базальных мембранах маточных желез (ок. 10, об. 10);
  - в) Экспонирование MMP-9 glandулоцитами эндометриальных желез и элементами внеклеточного матрикса стромы (ок. 10, об. 40);
  - г) Экспрессия MMP-9 клетками стромы и эпителием железистых ацинусов слизистой оболочки матки (ок. 10, об. 40);
  - д) Интенсивное распределение TIMP-1 в базальных мембранах маточных желез (ок. 10, об. 20);
  - е) Интенсивная экспрессия TIMP-1 в базальных мембранах, цитоплазме клеток желез и стромы эндометрия (ок. 10, об. 40).
- Стрептавидин-биотиновый метод с докраской ядер гематоксилином, система детекции — Novostain Universal Detection Kit («Novocastra»), хромоген — диаминобензидин тетрахлорид.

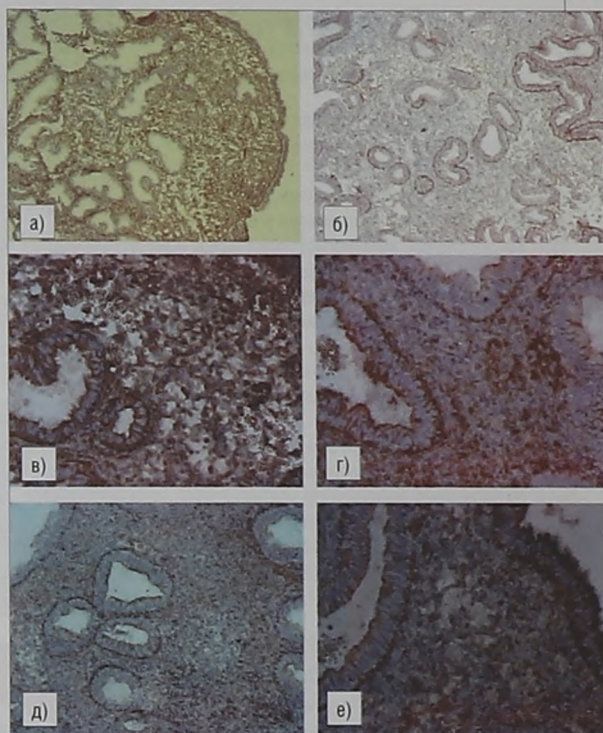


Рисунок 2. Иммуноморфологическая верификация рецепторов к MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 в эндометрии при невынашивании беременности, ассоциированном с хроническим эндометритом:

- а) Низкий уровень экспрессии MMP-9 glandулоцитами желез эндометрия (ок. 10, об. 10);
  - б) Слабое экспонирование MMP-9 клетками стромы слизистой оболочки матки (ок. 10, об. 10);
  - в) Экспрессия метки MMP-9 элементами воспалительноклеточного инфильтрата в строме эндометрия (ок. 10, об. 10);
  - г) Низкий уровень экспонирования MMP-2 клетками маточных желез (ок. 10, об. 10);
  - д) Умеренное содержание метки MMP-2 в клетках стромы и воспалительноклеточных элементах (ок. 10, об. 20);
  - е) Высокий уровень экспрессии TIMP-1 в клетках желез, стромы и внеклеточном матриксе интерстиция слизистой оболочки матки (ок. 10, об. 40).
- Стрептавидин-биотиновый метод с докраской ядер гематоксилином, система детекции — Novostain Universal Detection Kit («Novocastra»), хромоген — диаминобензидин тетрахлорид.

