

Маркеры ремоделирования соединительной ткани при пролапсе гениталий

М.Л.Ханзадян^{✉1}, В.Е.Радзинский¹, Т.А.Демур², А.Е.Донников³

¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов. 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

²ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России. 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

³ООО «НПФ ДНК-Технология». 117587, Россия, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, корп. 6

Цель – расширить представления о молекулярно-биохимических изменениях при пролапсе гениталий (ПГ) на основании изучения иммуногистохимических и морфологических особенностей в соединительнотканых структурах связочного аппарата тазового дна и их обусловленности генетическими полиморфизмами MMP/TIMP.

Материалы и методы. Обследованы 178 женщин в возрасте от 35 до 65 лет, 134 из них – с рецидивами ПГ (после гистерэктомии влагалищным доступом в связи с полным и неполным выпадением матки и стенок влагалища), рандомизированы по группам: 1-я (n=86) – с проявлениями недифференцированной дисплазии соединительной ткани – ДСТ (11,7 балла в среднем); 2-я (n=48) – без признаков ДСТ. Контрольную 3-ю группу (n=44) составили здоровые женщины без признаков ПГ (у 15 проведена гистерэктомия абдоминальным доступом по поводу гиперпластических процессов матки). Использованы морфологический метод исследования, иммуногистохимический – для оценки биофатов тканей крестцово-маточных и круглых связок матки, экспрессия матриксных металлопротеиназ (MMP) и тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP), генотипирование методом полимеразной цепной реакции полиморфизмов MMP/TIMP.

Результаты. При морфологическом исследовании связочного аппарата женщин с ПГ выявлены значительное фибрирование, более грубые коллагеновые септы между пучками гладкомышечных волокон и дистрофические изменения отдельных гладкомышечных клеток. В группе с ПГ и признаками ДСТ в 65% образцов выявлены диффузная атрофия, гиалиновая или муцинозная дегенерация гладкомышечной ткани и выраженный отек внеклеточного матрикса. Патобиохимию нарушений при тазовой десценции определяли дисбаланс содержания коллагенов I и III типа с преобладанием последнего, менее прочного; снижение уровня эластина на фоне его значительной фрагментации. Наибольшую выраженность тканевой деградации отмечали у женщин с ПГ и проявлениями ДСТ за счет повышенных уровней MMP-1, -2; содержание TIMP-1 в группе было наименьшим. Ассоциативные связи с развитием ПГ были установлены у женщин с признаками ДСТ для генетических полиморфизмов: rs3918242 CT гена MMP9 – 0,54 ($p=0,007$; отношение шансов – ОШ 3,2; 95% доверительный интервал – ДИ 1,3–7,6), rs17576 AG гена MMP9 (0,62 против 0,32, $p=0,01$; ОШ 2,9; 95% ДИ 1,2–7,0); rs3025058 5A6A гена MMP3 (0,52 против 0,45, $p=0,009$; ОШ 3,7; 95% ДИ 1,3–10,1); rs2285053 (rs2285052) CT гена MMP2 (0,44 против 0,27, $p=0,007$; ОШ 3,2; 95% ДИ 1,3–7,5). Статистическая значимость для групп сохранялась после введения поправки на множественные сравнения.

Заключение. Полученные данные позволяют раскрыть патогенетические аспекты ПГ – превалирование процессов деградации внеклеточного матрикса в условиях диспластического морфогенеза. Установлены генетические предикторы ремоделирования тазового дна с формированием его несостоятельности, позволяющие расширить спектр диагностических возможностей прогрессирования заболевания на начальных стадиях или определить риск его рецидивирования после оперативного лечения. Персонализация ведения женщин групп риска предусматривает исключение или модификацию всех предрасполагающих к развитию заболевания факторов, проведение своевременных лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: пролапс гениталий, дисплазия соединительной ткани, коллаген, эластин, внеклеточный матрикс, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, генетические полиморфизмы.

✉ khmala@rambler.ru

Для цитирования: Ханзадян М.Л., Радзинский В.Е., Демур Т.А., Донников А.Е. Маркеры ремоделирования соединительной ткани при пролапсе гениталий. Гинекология. 2016; 18 (3): 59–65.

Markers of connective tissue remodeling in genital prolapse

M.L.Khazadjan^{✉1}, V.E.Radzinskii¹, T.A.Demura², A.E.Donnikov³

¹People's Friendship University of Russia. 117198, Russian Federation, Moscow, ul. Miklukho-Maklaya, d. 6;

²I.M.Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. 119991, Russian Federation, Moscow, ul. Trubetskaya, d. 8, str. 2;

³Company DNA-Technology LLC. 117587, Russian Federation, Moscow, Varshavskoe sh., d. 125zh, korp. 6

Objective – to expand the conception of molecular and biochemical changes in genital prolapse (GP) based on the study of morphological and immunohistochemical features in connective tissue structures of the ligamentous apparatus of the pelvic floor and their dependence on genetic polymorphisms MMP/TIMP.

Materials and methods. The study involved 178 women aged 35 to 65, 134 of them with GP relapses (after hysterectomy by vaginal access because of a total and partial uterus and vaginal walls prolapse). Patients were randomized into the following groups: 1 – with manifestations of undifferentiated connective tissue dysplasia – CTD (11.7 points on average; n=86); 2 – with no CTD signs (n=48). Control group 3 consisted of healthy women without any GP signs (among 15 patients abdominal hysterectomy was performed in connection with uterus hyperplastic processes); n=44.

Used. Morphological method of studies, immunohistochemical (to assess tissue biopsies of sacrum-uterine and round uterine ligaments), the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs), genotyping by polymerase chain reaction of MMP/TIMP polymorphisms.

Results. The morphological study of women's ligamentous apparatus in cases with GP revealed significant fibrosis, coarser collagen septa among bundles of smooth muscle fibers and degenerative changes in individual smooth muscle cells. The group with GP and CTD features showed diffuse atrophy, hyaline or mucinous degeneration of smooth muscle tissue and evident edema of extracellular matrix in 65% of samples. Pathobiochemical disorders in cases of pelvic descencia were determined by an imbalance in collagen type I and III content, with the predominance of the latter, less durable; a decrease in elastin levels and its considerable fragmentation. The greatest expression of tissue degradation was observed among women with GP and CTD manifestations on account of increased MMP-1 and -2 levels; TIMP-1 content was lowest in the group. Associations with GP development have been established among women with CTD signs for genetic polymorphisms: rs3918242 CT gene MMP9 (0.54) ($p=0,007$; OR 3.2; 95% CI 1.3–7.6), rs17576 AG gene MMP9 (0.62 vs. 0.32, $p=0,01$; OR 2.9; 95% CI 1.2–7.0); rs3025058 5A6A gene MMP3 (0.52 vs. 0.45, $p=0,009$; OR 3.7; 95% CI 1.3–10.1); rs2285053 (rs2285052) CT gene MMP2 (0.44 vs. 0.27, $p=0,007$; OR 3.2; 95% CI 1.3–7.5). Statistical significance for the groups was preserved after the correction for multiple comparisons.

Conclusion. The data obtained reveal pathogenetic aspects of genital prolapse – the prevalence of extracellular matrix degradation in a dysplastic morphogenesis. Genetic predictors of pelvic floor remodeling including the formation of its insolvency were established, allowing to extend the range of diagnostic possibilities of the disease progression at early stages or detection of the risk of recurrence after surgical treatment. Personalization of high-risk groups conducting provides for the exclusion or modification of all the factors predisposing to the development of the disease and performing timely treatment and preventive measures.

Key words: pelvic organ prolapse, dysplasia of connective tissue, collagen, elastin, extracellular matrix, matrix metalloproteinase, tissue inhibitors matrix metalloproteinase, genetic polymorphisms.

✉ khmala@rambler.ru

For citation: Khazadjan M.L., Radzinskii V.E., Demura T.A., Donnikov A.V. Markers of connective tissue remodeling in genital prolapse. Gynecology. 2016; 18 (3): 59–65.

Пролапс гениталий (ПГ) в связи с превалированием среди пациентов сегмента женщин старших возрастных групп, ростом заболеваемости и тяжелой дисфункцией органов малого таза представляет не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему [1, 2].

По прогнозам, в ближайшие 30 лет количество оперативных вмешательств по поводу несостоятельности тазового дна у пожилых женщин увеличится на 45% [3], принимая масштабы «скрытой эпидемии». Вызывает обеспокоенность констатация заболевания практически у 1/3 женщин репродуктивного возраста [4]. Дисфункция тазовых органов, сочетанная с неполным опорожнением мочевого пузыря и кишечника, симптоматикой чувства тяжести и инородного тела в нижних отделах живота, расстройств мочеиспускания и диспареунии, причиняет пациентам значительные физические и психические страдания.

Сложность ведения больных с ПГ предопределяет ряд нюансов: с одной стороны, ввиду редкой обращаемости объективные признаки заболевания выявляют только у 40% женщин 45–85 лет, с другой – отсутствие клинических проявлений, состояние «ложного благополучия» констатируют практически у 2/3 рожавших пациенток с анатомическими признаками тазовой дисфункции [5]. Итог неутешителен – отсроченность хирургических вмешательств с целью восстановления архитектоники тазового дна при заведомо низком индексе качества жизни. Прогноз для таких пациенток обусловлен не только степенью выраженности структурно-функциональных поражений тазового дна и клинических проявлений заболевания, но и качеством исполнения выбранной технологии оперативного лечения. Стратегическая значимость «хирургического этапа» в разрешении проблемы бесспорна, однако сопряжена с рядом аспектов: при множестве существующих технологий ни одна не может считаться устойчиво эффективной. Вероятность развития рецидива несостоятельности тазового дна в течение 1–3 лет после операции составляет 33–61,3%, что сопряжено с последующей чередой пластических вмешательств и частичной или полной нетрудоспособностью пациенток [6].

Изучение механизмов прогрессирования ПГ – приоритетная научная задача во всем мире, решаемая только при углубленном анализе этиологии и патогенеза заболевания, большинство аспектов которого остаются дискуссионными.

Выявление факторов своевременной оценки риска заболевания, его рецидивов после хирургического лечения будет способствовать повышению эффективности ведения контингента с ПГ и решению практических вопросов улучшения качества жизни.

Эволюция представлений о генезе заболевания за последние десятилетия более чем наглядна: изначально его развитие связывали с влиянием факторов, приводящих к резкому повышению внутрибрюшного давления: болезнями кишечника и легких, сопровождающихся хроническими запорами и кашлем; тяжелым физическим трудом, менопаузой, гипострогией, неврогенными дисфункциями тазового дна и метаболическим синдромом [3]. Непосредственную передачу внутрибрюшного давления на стенки влагалища с возрастанием механической нагрузки и растяжением его тканей во время вагинальных родов ранее рассматривали как основной аспект ПГ, как и денервацию или травму *musculus levator ani* в родах [3, 7].

Эпидемиология последних лет указывает на старение, увеличение индекса массы тела и вагинальные роды как на основные предикторы заболевания [2], однако более дискуссионна вероятность развития ПГ в отсутствие повреждения опорных мышечно-фасциальных структур тазового дна в родах через естественные родовые пути, предпосылкой к хроническому повышению внутрибрюшного давления при адекватном гормональном фоне.

Ярким примером необходимости векторизации научного поиска в молекулярную патобиохимию тазовой дисфункции и анализа потенциальной роли фиброзно-мышечной и соединительной тканей (СТ) является развитие заболевания у нерожавших женщин, без «традиционных» факторов риска.

Фундаментальные исследования последних лет актуализировали тему теории дисплазии СТ (ДСТ) – состояния с разными клиническими проявлениями, определенными висцеромоторными поражениями, возникающими эмбрионально и постнатально, прогрессирующим течением и рядом дисфункциональных проявлений, что позволило приблизиться к пониманию патогенетических основ ПГ на тканевом, органном и организменном уровнях [8]. В срезе особенностей проявлений ДСТ на полиорганном уровне перспективен анализ нарушений метаболизма белков, дефектов синтеза или деградации компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и дисрегуляции морфогенеза, иммуногистохимии тканей больных с ПГ.

Многообразие функций СТ, определяющих активное участие ее элементов в непрерывном обновлении и перестройке в ответ на нагрузку и повреждение, регулируется наследственными, гормональными и обменными факторами [8].

По итогам исследований отечественных и зарубежных авторов биологическая несостоятельность СТ при ПГ формируется в результате качественных преобразований, связанных с нарушением метаболизма белков и усилением их литической активности, снижением прочности тканей в разрыв, возрастанием их растяжимости наряду с изменением соотношения коллагенов [14]. Повреждению коллагенового каркаса в поддерживающем связочном аппарате матки и нарушению регулирующих их синтез ферментов отводится особое внимание, учитывая их роль в ослаблении и перерастяжении СТ и, как следствие, развитии ее несостоятельности [9].

Вариабельность дефектов генов, кодирующих биосинтез и деградацию коллагена, который обеспечивает прочность и целостность тканей и эластина, – эластичность и упругость соответственно, как и других компонентов межклеточного вещества и их многообразные сочетания определяют выраженную гетерогенность и полиморфизм ДСТ.

Существенная неоднородность результатов исследований в области патобиохимии ПГ обусловлена, очевидно, различием методик для измерения содержания коллагена и эластина, мест забора биопсийных образцов тазового дна (стенка влагалища, *arcus tendineus fascia pelvis*, парауретральные ткани, параметрий и крестцово-маточные связки – КМС) и выборки пациентов [4].

Ремоделирование ВКМ СТ путем деградации или протеолиза коллагеновых волокон осуществляется посредством матричных металлопротеиназ (ММП) – семейства внеклеточных цинкзависимых эндопептидаз, сигнальных молекул программируемой гибели клеток, стимулирующих выброс лигандов апоптоза и способных разрушать все типы белков ВКМ. Их участие в ремоделировании тканей, регуляции гомеостаза ВКМ, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей регулируется на нескольких уровнях (ядерный, клеточный, тканевой) [7].

Представителями групп ММП являются интерстициальные коллагеназы (ММП-1, -2, -3), расщепляющие фибриллярный коллаген соответствующих типов; желатиназы (ММП-2, -9), действующие на аморфный коллаген и фибронектин; стромелизины (ММП-3, -10, -11), влияющие на разные компоненты межклеточного матрикса, в том числе – на протеогликаны, ламинин, фибронектин и аморфные коллагены.

ММП-1 синтезируется фибробластами СТ и моноцитами и участвует в катаболизме фибриллярных и нефибриллярных коллагенов, преимущественно в поддерживающем аппарате органов малого таза. ММП-2 (желатиназа А) – одна из протеиназ ВКМ человека, кодируемая геном ММП-2 на хромосоме 16. ММП-2 специфически активна в отношении коллагена IV типа, основного компонента базальных мембран, гидролиз которого позволяет усиливать процессы синтеза коллагенов I и III. ММП-9 (желатиназа В) – один из ферментов, участвующих в ремоделировании структур ВКМ. Повышение активности ММП-9 приводит к замедлению синтеза белков в СТ, прогрессивной деградации ВКМ за счет более быстрого разрушения структурного остова ткани в сравне-

нии с синтезом [14]. Сообщается, что деградация ВКМ с участием MMP играет большую роль в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата, как и в активном ремоделировании соединительнотканых структур органов малого таза – поддерживающих связок матки и стенок влагалища [4].

Приоритетность в диагностике причин соединительнотканной недостаточности морфологических и иммуногистохимических исследований неоспорима, однако их многочисленность и противоречивость склоняют к комплексному анализу проблем перинеологии. Остаются неуточненными как биохимические изменения тканей тазового дна женщин с ПГ, так и их генетическая детерминированность.

Представления о генетической составляющей мультифакториальных заболеваний, к которым можно отнести и ПГ, базируются на фактах об ассоциативности вариантного генотипа с риском, превышающим среднепопуляционный [8]. Дисрегуляция морфогенеза СТ инициируется генетическими «поломками», приводящими к нарушению формирования первичной структуры белков и компонентов ВКМ, в дальнейшем – дестабилизации органно-тканевой архитектуры, составляющей суть дисплазии [9].

Принимая во внимание данные о молекулярно-генетической основе ПГ, формирование комплексных представлений о патофизиологии заболевания невозможно вне изучения генетических предикторов патобиохимических изменений в соединительнотканых структурах тазового дна. Вклад MMP в возрастание коллагенолиза может быть обусловлен особенностями генетических полиморфизмов и их мутантными формами, определяющими сложное молекулярно-биохимическое взаимодействие в СТ-остове структур тазового дна при его несостоятельности. Неоднозначные факты о возможной причастности к развитию ПГ полиморфизмов MMP и их тканевых ингибиторов (тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ – TIMP) может объясняться генетической разнородностью популяций в тех зарубежных исследованиях, где рандомизация по этносу не соблюдалась.

Изучение функциональной активности факторов, принимающих участие в биотрансформации компонентов ВКМ, ферментов, детерминирующих внутри- и внеклеточное созревание коллагена и фибриллогенез, будет способствовать объяснению механизмов пато- и морфогенеза, с выделением иммуногистохимических и молекулярно-генетических предикторов развития ПГ, возможностью оценки степени тяжести тазовой дисцензии и вероятности послеоперационного рецидивирования.

Цель – расширить представления о молекулярно-биохимических изменениях при ПГ на основании изучения иммуногистохимических и морфологических особенностей в соединительнотканых структурах связочного аппарата тазового дна и их обусловленность генетическими полиморфизмами MMP/TIMP.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базах кафедры акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины факультета повышения квалификации медицинских работников РУДН (заведующий кафедрой – заслуженный деятель науки РФ профессор В.Е.Радзинский) и патологической анатомии им. акад. А.И.Струкова Первого МГМУ им. И.М.Сеченова (заведующий кафедрой – профессор В.С.Пауков).

В исследование включены 178 женщин, обратившихся для обследования в гинекологическое отделение ГКБ №64, из которых 134 – с рецидивами ПГ в возрасте от 35 до 65 лет (76 – после гистерэктомии влагалищным доступом в связи с полным и неполным выпадением матки и стенок влагалища). После обследования на предмет наличия признаков ДСТ их рандомизировали по группам: 1-я – с проявлениями недифференцированной ДСТ (малые и большие – 1 и 2 балла соответственно; суммарная градация – до 9 баллов и 10–16 соответственно); n=86; 2-я группа – без признаков ДСТ (n=48). Контрольную 3-ю группу составили здоровые женщины в возрасте от 35 до 52 лет без признаков ПГ

(у 15 женщин проведена гистерэктомия абдоминальным доступом по поводу гиперпластических процессов матки – миомы, аденомиоза и гиперплазии эндометрия); n=44.

Критерии включения: наличие несостоятельности тазового дна, признаков недифференцированной ДСТ по критериям Т.И.Кадуриной (2009 г.) для соответствующей группы [10].

Критерии исключения: злокачественные и аутоиммунные заболевания.

Степень выраженности ПГ оценивали по классификации POP-Q (Pelvic Organ Prolapse Quantification), предложенной Международным обществом по удержанию мочи – ICS (1996 г.). Все женщины основной и контрольной группы имели сопоставимое число родов в анамнезе. Изучен анамнез жизни пациенток, включая перенесенные соматические заболевания. Особое внимание уделено заболеваниям, входящим в симптомокомплекс ДСТ.

В 1-й группе по 1 и 2 малых признака недифференцированной ДСТ констатировали у 39 женщин (45,0% за счет вегетососудистых дисфункций, астенического типа телосложения, легкого образования гематом при незначительных ударах, плоскостопия, миопии, склонности к мышечной астении по данным кистевой манометрии). Большие признаки ДСТ включали наличие патологии скелета, грыж переднебрюшной стенки (паховые и пупочные), склонность к аллергическим реакциям, заболеваниям бронхолегочной системы, желудочно-кишечного тракта, высокую частоту варикозной болезни, пролапс митрального клапана. Суммарная балльная оценка составила 11,7 балла в среднем.

В контрольной группе пролапс митрального клапана обнаружили у 4 женщин, у 2 – варикозное расширение вен.

С целью гистологического исследования у 54 женщин из групп с ПГ и 15 здоровых в результате гистерэктомии влагалищным методом было получено по 4 образца ткани: правая и левая КМС, правая и левая круглые связки (КС) матки. Биоптаты фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин, после чего изготавливали парафиновые срезы толщиной 4 мкм (Thermo Scientific Microm HM355S). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону и фукселином по Вейгерту. Изготавливали дополнительные срезы на предметных стеклах Menzel Super Frost Ultra Plus, покрытых адгезивом, и проводили иммуногистохимические реакции (иммунопероксидазные) по стандартной методике с термической демаскировкой антигенов (Dako Protocols) и использованием первичных антител к MMP-1, -2 (LabVision, readytouse), TIMP-1 (LabVision, 1:50).

Результаты иммуногистохимических реакций оценивали полуквантитетным методом по 6-балльной шкале по проценту окрашенных клеток или окрашенного ВКМ и интенсивности окраски: 2 балла – менее 20% окрашенного ВКМ/клеток, 4 балла – от 20 до 40%, 6 баллов – более 40% (n=54 – с ПГ и n=15 – здоровые женщины).

Выполнен анализ полиморфизмов генов MMP и TIMP (n=178): MMP2 rs2285053 (rs2285052) (735 C>T); MMP3 rs3025058 (1171 del>T [5A>6A]); MMP9 rs3918242 (1562 C>T); MMP9 rs17576 [836 (855) A>G (Gln279Arg)]; TIMP2 rs2277698 [303 C>T (Ser101Ser)]. Генотипы определяли методом полимеразной цепной реакции с анализом кривых плавления модифицированным методом «примыкающих проб» (adjacent probes, kissing probes) с помощью коммерческих тест-систем (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). ДНК для генотипирования выделяли из образцов периферической крови, взятой с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в качестве антикоагулянта с помощью комплекта реагентов «Проба-ГС-генетика». Определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием программного обеспечения SPSS 13 для Windows.

Для определения статистической значимости различий частот генотипов в группах больных применяли критерий χ^2 . Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. При статистическом анализе результа-

Группы	n	MMP-1	MMP-2	TIMP-1
Больные с ПГ и ДСТ	38	4,0±1,2*	6,0±0,3*	1,5±0,5*
Больные с ПГ без ДСТ	16	3,6±0,6*	5,4±0,5*	2,8±0,6*
Контроль	15	2,0±0,8	4,0±0,5	4,0±0,7

*Достоверность отличий ($p < 0,05$) от здоровых женщин.

тов рассчитывали частоту встречаемости генотипов, отношение шансов (ОШ) и его 95% доверительный интервал (ДИ). При оценке достоверности выявленных различий между средними значениями выборок и достоверности выявленной корреляции рассчитывалась вероятность ошибки p (значимость при $p \leq 0,05$) с учетом введения поправки Бонферрони.

Результаты исследования

При морфологическом исследовании состава КМС и КС матки выводы сводились к отсутствию различий в строении обеих структурных единиц (правой и левой) и констатации преобладания в их составе фиброзно-эластической ткани с включениями гладкомышечной и сосудистой при ПГ.

Отличительной особенностью образцов связочного аппарата женщин с тазовой десценцией оказались значительное фибрирование СТ, наличие более грубых коллагеновых септ между пучками гладкомышечных волокон и дистрофических изменений отдельных гладкомышечных клеток. В группе с ПГ и признаками ДСТ в 65% образцов были выявлены набухание СТ (коллагеновых волокон) по типу дезорганизации и выраженный периваскулярный отек.

Вариабельность отклонений от физиологической нормы в образцах тканей связочного аппарата женщин с ПГ сводилась к наибольшей деструкции в группе с клиническими проявлениями ДСТ.

Разрыхление СТ наряду с уменьшением ее эластичности, растяжимости и прочности сопровождалось деградацией волокон и повышенным распадом коллагена, определяя патобиохимию нарушений при тазовой дисфункции.

Здоровых женщин отличал высокий индекс соотношения окрашенных коричневым глыбок коллагена I/III во ВКМ КМС и КС матки. При ПГ соотношение было обратным за счет превалирования в группе содержания коллагена ST типа – высокого в КМС и умеренного – в КС матки, определяющего снижение механической прочности тканей тазового дна. Низкий уровень экспрессии коллагенов I типа (3,2 и 2,7 балла соответственно) в группе с ПГ в КМС и КС матки значительно уступал значениям здоровых женщин (5,5 и 4,2 балла соответственно). Клинические подобные параллели реализовались в наличии в группах с ПГ женщин с варикозным расширением вен нижних конечностей, недержанием мочи на фоне снижения гипермобильности шейки мочевого пузыря и другими проявлениями ДСТ.

Особенностью распределения эластичного компонента в связках здоровых женщин следует считать равномерность и «монолитность» вдоль коллагеновых волокон, во ВКМ и фибробластах СТ, стенках артериол КМС и КС матки в виде окрашенных коричневым тяжей. В КС матки экспрессия эластина несколько превосходила таковую в КМС.

При исследовании степени развития эластических волокон в связочном аппарате матки с помощью окрашивания фукселином по Вейгерту у женщин с ПГ выявлено снижение их количества на фоне значительной фрагментации и визуализации глыбок.

Экспрессию MMP-1, -2 определяли как коричневое окрашивание ВКМ, гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов, причем количественная оценка маркеров при несостоятельности тазового дна превосходила показатели здоровых женщин.

Связочный аппарат пациенток с ПГ характеризовался повышенным уровнем металлопротеиназной активности в сравнении с показателями в контроле. Количественная оценка среднего уровня экспрессии MMP-1 при наличии в группе женщин с ПГ признаков ДСТ оказалась значительно

больше, чем в контроле (4±1,2 балла и 2±0,8 балла, $p < 0,05$); табл. 1.

Уровень экспрессии MMP-2 при ПГ составил 6±0,3 балла, что в 1,5 раза превышало показатель накопления фермента у здоровых женщин (4±0,5 балла, $p < 0,05$). Показатель содержания MMP-2 при ПГ (6±0,3 балла) значимо превышал уровень накопления фермента в контрольной группе (4±0,5 балла, $p < 0,05$). Уровень маркеров тканевой деградации при несостоятельности тазового дна в отсутствие признаков ДСТ также превосходил показатели здоровых женщин, однако в меньшей степени. Содержание уровней MMP-1 и MMP-2 в среднем составило 3,6±0,6 и 5,4±0,5 балла соответственно, что указывало на превалирование процессов деградации ВКМ в условиях диспластического морфогенеза.

Содержание маркера TIMP-1, окрашиваемого в цитоплазме фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток и во ВКМ в группе здоровых женщин в коричневый цвет, оказалось умеренным (4±0,7 балла). Показатель экспрессии TIMP-1 при ПГ у женщин с ДСТ был значимо снижен (1,5±0,5 балла, $p < 0,05$) в сравнении с показателем в контроле (4,0±0,7), в группе без проявлений ДСТ составил 2,8±0,7 балла ($p < 0,05$).

Анализ распределения частот генотипов (табл. 2) локуса 1562 гена MMP9 больных с ПГ показал значимые различия в зависимости от наличия в группах признаков ДСТ.

У здоровых женщин частота исследуемых генетических полиморфизмов соответствовала ожидаемым показателям.

Частота полиморфизма rs3918242 гена MMP9 в обеих группах с ПГ превосходила показатель здоровых женщин (0,29), однако чаще – при наличии проявлений ДСТ (0,54); $p = 0,007$; ОШ 3,2; 95% ДИ 1,3–7,6. Несмотря на тенденцию к превалированию аллеля СТ у больных с ПГ без признаков ДСТ в сравнении со здоровыми (0,43 против 0,29), его частота оказалась соотносима с носительством «протективного» аллеля СС (0,48).

Распределение аллельного варианта AG rs17576 (836 (855) гена MMP9 у больных с несостоятельностью тазового дна без признаков ДСТ и здоровых не отличалось (0,33 и 0,32). В группах с клиническими проявлениями ДСТ частота генотипа AG достоверно преобладала (0,62 против 0,32; $p = 0,01$; ОШ 2,9; 95% ДИ 1,2–7,0), указывая на ассоциативную связь полиморфизма с ПГ.

Гомозиготный аллель 5A5A гена MMP3 вследствие экспрессии гена связывают с высокой функциональной активностью, что позволяет рассматривать его как один из ключевых медиаторов в развитии несостоятельности тазового дна. Повышенный удельный вес полиморфизма 5A6A достоверно чаще присутствовал в генотипе пациенток с ПГ, однако после введения поправки Бонферрони ассоциации в группе женщин без ДСТ оказались не значимы.

При наличии проявлений ДСТ для полиморфизма rs3025058 (1171 del>T [5A>6A]) гена MMP3 была доказана связь с ПГ (0,52 против 0,45, $p = 0,009$; ОШ 3,7; 95% ДИ 1,3–10,1), что давало основание считать его фактором избыточной деградации ВМК и ремоделирования структур тазового дна. Носительство аллеля 6A ассоциировалось с низкой функциональной активностью и, соответственно, сниженной экспрессией белка в структурах связочного аппарата тазового дна в сравнении с представительницами с генотипом 5A5A.

Частота варианта rs2285053 (rs2285052) СТ гена MMP2 (0,32 против 0,27) у больных с ПГ без проявлений ДСТ встречалась несколько чаще, чем в контрольной группе, однако после введения поправки Бонферрони статистически значимых отличий выявлено не было. В группах с клиниче-

MISCELLANEA

Таблица 2. Частота генетических полиморфизмов MMP и TIMP-2									
	Группы		N	ПГ	Контроль	p (<0,0167)	ОШ	ДИ	
Без ДСТ	MMP9 1562 C>T	CC	66	абс.	41	25	0,32 доминантная модель	1,4	0,7–3,0
				%	0,48	0,57			
		CT	50	абс.	37	13			
				%	0,43	0,29			
		TT	14	абс.	8	6			
				%	0,09	0,14			
С ДСТ	MMP9 1562 C>T	CC	39	абс.	14	25	0,007 доминантная модель	3,2	1,3–7,6
				%	0,29	0,57			
		CT	39	абс.	26*	13			
				%	0,54	0,29			
		TT	14	абс.	8	6			
				%	0,17	0,14			
Без ДСТ	MMP9 836 (855) A>G	AA	72	абс.	49	23	0,37 доминантная модель	1,6	0,6–4,7
				%	0,57	0,52			
		AG	42	абс.	28	14			
				%	0,33	0,32			
		GG	16	абс.	9	7			
				%	0,1	0,16			
С ДСТ	MMP9836 (855) A>G	AA	36	абс.	13	23	0,01 доминантная модель	2,9	1,2–7,0
				%	0,27	0,52			
		AG	44	абс.	30*	14			
				%	0,62	0,32			
		GG	12	абс.	5	7			
				%	0,1	0,16			
Без ДСТ	MMP3 1171 Del>T 5A>6A	5A5A	27	абс.	20	7	0,02 доминантная модель	2,6	1,1–5,7
				%	0,23	0,16			
		5A6A	69	абс.	49	20			
				%	0,57	0,45			
		6A6A	34	абс.	17	17			
				%	0,19	0,39			
С ДСТ	MMP3 1171 Del>T 5A>6A	5A5A	23	абс.	16	7	0,009 доминантная модель	3,7	1,3–10,1
				%	0,33	0,16			
		5A6A	45	абс.	25*	20			
				%	0,52	0,45			
		6A6A	24	абс.	7	17			
				%	0,15	0,39			
Без ДСТ	MMP2 735 C>T	CC	62	абс.	35	27	0,03 доминантная модель	2,3	1,1–4,9
				%	0,47	0,61			
		CT	55	абс.	43	12			
				%	0,32	0,27			
		TT	13	абс.	8	5			
				%	0,2	0,11			
С ДСТ	MMP2 735 C>T	CC	46	абс.	19	27	0,007 доминантная модель	3,2	1,3–7,5
				%	0,39	0,61			
		CT	33	абс.	21*	12			
				%	0,44	0,27			
		TT	13	абс.	8	5			
				%	0,17	0,11			
Без ДСТ	TIMP2 C>T 101 S	CC	56	абс.	33	23	0,13 доминантная модель	1,8	0,8–3,7
				%	0,38	0,52			
		CT	61	абс.	47	14			
				%	0,55	0,32			
		TT	13	абс.	6	7			
				%	0,07	0,16			
С ДСТ	TIMP2 C>T 101 S	CC	46	абс.	23	23	0,43 доминантная модель	1,6	0,5–5,6
				%	0,4	0,52			
		CT	34	абс.	20	14			
				%	0,42	0,32			
		TT	12	абс.	5	7			
				%	0,1	0,16			

скими признаками ДСТ у носительниц полиморфизма СТ была установлена взаимосвязь с развитием тазовой десценции даже после поправки на множественные сравнения (0,44 против 0,27, $p=0,007$; ОШ 3,2; 95% ДИ 1,3–7,5).

Распределение полиморфных вариантов гена TIMP2 rs2277698 между группами женщин с ПГ без проявлений ДСТ и контролем значимо не отличалось, несмотря на некоторое преобладание аллеля GA (0,42 и 0,32). Генотип GA в группе женщин с клиническими признаками ДСТ составил 0,5 ($p=0,007$; ОШ 3,2; 95% ДИ 1,3–7,5), в группе сравнения встречался достоверно реже (0,27).

Обсуждение

Результаты исследований показывают, что, независимо от приобретенных факторов риска, женщины с ПГ отличаются морфологическими особенностями связочного аппарата тазового дна. Выраженная дезорганизация тканевой архитектоники: диффузная атрофия, гиалиновая или муцинозная дегенерация ткани и отек ВКМ – отличали отдельных пациенток с проявлением ДСТ. Деваскуляризация тканей в образцах связочного аппарата присутствовала в группе с ПГ и признаками ДСТ в большем количестве образцов тканей как подтверждение хронической локальной ишемии, детерминированной молекулярно-биохимическими сбоями.

Выявленный дисбаланс коллагенов I и III типа в патологических образцах связочного аппарата женщин с ПГ подтвержден зарубежными исследователями, причем в отсутствие какой-либо зависимости между возрастом менопаузы и паритетом [11]. Преобладание при несостоятельности тазового дна синтеза коллагена III типа, относящегося к эмбриональным белкам с низкой прочностью, коррелирует с системным снижением уровня коллагена, определяющего целостность соединительнотканного остова на примерах оценки его экспрессии в передней стенке влагалища, тазовой фасции, КС матки [12]. Существенной при тазовой десценции представляется не только диспропорция коллагенов с преобладанием волокон III типа, но и их качественные преобразования – больший диаметр фибрилл и значительные промежутки между ними [13]. Полученные результаты соответствуют данным, что основой несостоятельности тазового дна выступают изменения в коллагеновом каркасе связочного аппарата матки, снижение синтеза общего коллагена и преобладание его незрелой фракции при дефиците компонентов ВКМ, определяющих ослабление и перерастяжение СТ и, как следствие, несостоятельность тазового дна.

Признаки аномального метаболизма эластина при ПГ доказаны в экспериментальных исследованиях, отмечены в тазовой фасции и передней стенке влагалища наряду с наблюдениями их меньшей ширины в сравнении с группой контроля (0,9 мкМ против 1,8 мкМ) [14]. Ослабление эластического каркаса и нарушение в распределении и строении этих волокон обуславливают избыточную растяжимость КС и КМС, что наряду с ухудшением микроциркуляции и ишемией тазовых структур отрицательно сказывается на развитии сосудистого русла.

Активное ремоделирование СТ поддерживающих связок матки и стенок влагалища, свойственное тазовой десценции, реализовалось в нарушении экспрессии MMP, определяющих сбалансированность протеолиза компонентов ВКМ. Возрастание уровня MMP-1, -2 в КМС и КС матки соответствовало данным об их избыточной активности в вагинальных тканях [12]. Совокупность молекулярных патобиохимических изменений при ПГ – дефицит коллагена I типа в КМС и возрастание уровня MMP-1 – отмечали также зарубежные авторы [5].

Представления о генетической детерминированности ПГ сформировались на основании исследований, посвященных поиску генов-кандидатов, контролирующих аномальный метаболизм белков ВКМ в структурах тазового дна, с формированием дисбаланса между активностью MMP и их ингибиторов. Выявление генетических биомаркеров ПГ может быть использовано для стратификации групп риска развития заболевания.

Деграция ВКМ многих компонентов СТ, катализируемая MMP, выступает одним из ключевых звеньев патогенеза

ПГ. Полученные результаты позволяют подтвердить многофункциональность MMP – не только как маркеров активности патологических процессов (сердечно-сосудистых процессов, ревматоидного артрита, обструктивной болезни легких, некоторых видов онкологических заболеваний), но и тканевого ремоделирования, составляющего патофизиологическую основу ПГ [16, 17].

Избыточная биодеградирующая способность MMP-3, стромелизина-1, влияющая на компоненты ВКМ – протеогликаны, коллаген II, IV, IX и XI типов, ламинин и фибронектин – оказалась predetermined преобладанием полиморфизма rs3025058 гена MMP3 (1171 del>T [5A>6A]).

Установленная ассоциация связи полиморфизма 5A6A с развитием тазовой десценции только в группе с проявлениями ДСТ позволяет говорить о ПГ как о частном органном поражении, точечной реализации генетической предрасположенности. Данное заключение различается с результатами метаанализа о причастности полиморфизма гена MMP3 к развитию тазовой десценции в двух выборках европейских женщин и побуждает к дальнейшим исследованиям в области анализа генетических предикторов заболевания [18].

Роль экспрессии протеазы MMP-9, кодируемой одноименным геном, как кофактора избыточной деградации коллагена и эластина во ВКМ в структурах тазового дна и вагинальной ткани женщин с ПГ ранее обсуждалась, подтверждая значимость наших выводов [2, 3].

H.Chen и соавт., изучавшие частоту встречаемости 3 одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) MMP9 (rs3918242, rs17576, и rs2250889) в популяции тайваньских женщин – 92 со II–IV стадиями ПГ и 152 здоровых – с помощью метода многофакторной логистической регрессии установили существенное различие в распределении полиморфизма rs17576 между группами [19]. Установлена взаимосвязь генотипов AG и GG с ПГ.

Несмотря на данные о возрастании при ПГ активности MMP9 в соединительнотканых структурах тазового дна, по результатам метаанализа в 4 выборках итальянских женщин, тайваньской и белых американок, значительных различий в частоте варианта rs17576 установлено не было [18]. Совокупный эффект встречаемости полиморфизма rs3918242 гена MMP9 в метаанализе 2 выборок был незначителен, тогда как ассоциативные связи с ПГ для других полиморфных локусов оказались наиболее выраженными:

1) rs3918253 (ОШ 0,64; 95% ДИ 0,41–1,0; $p=0,05$);

2) rs3918256 (ОШ 0,64; 95% ДИ 0,41–1,01; $p=0,05$) [20].

Преобладание генотипов СТ (полиморфизм rs3918242) и AG (rs17576) гена MMP9 обнаруживали у женщин с проявлениями ДСТ.

Тенденция к превалированию полиморфного варианта rs2277698 гена TIMP2 при ПГ позволяет говорить о генетической детерминированности к развитию заболевания и возможности выявления предрасполагающих комбинаций с формированием групп риска. Преобладающее количество ассоциативных моделей у женщин с ПГ и признаками ДСТ позволяет сделать вывод о молекулярной идентичности коллагенопатий и нарушений, реализующихся в разных органных проявлениях: варикозного расширения вен, гипермобильности суставов и несостоятельности тазового дна.

Установленные нами различия в количестве, характере распределения и локализации коллагеновых и эластических волокон наряду с нарушением экспрессии кодирующих белки генов, в частности, семейства MMP и TIMP, определяют многоуровневость изменений микроархитектоники тазового дна при ПГ. Основой структурно-функциональных дефектов тазового дна выступают патобиохимические реакции с наибольшей выраженностью дисметаболических превращений при сочетании ПГ с проявлениями ДСТ. Очевидно, что результативность таргетного лечебного воздействия возможна лишь на ранних стадиях заболевания, до пиковых значений аномального метаболизма в СТ-компонентах тазового дна.

Персонализация тактики ведения женщин группы риска предусматривает исключение или модификацию всех предрасполагающих к развитию заболевания факторов,

проведение лечебно-профилактических мероприятий для предупреждения прогрессирования или снижения клинических проявлений болезни, сокращения частоты послеоперационных рецидивов.

Реализация аномального ремоделирования тазового дна при наличии генетической предрасположенности и прочих проявлений ДСТ доказуема, однако инвазивным морфологическим и иммуногистохимическим методам исследования является альтернативой генетическое типирование, проводить которое следует при наличии наследственной отягощенности или начальных клинических проявлениях заболевания.

Литература/References

1. Радзинский В.Е. Перинеология. М.: РУДН, 2010. / Radzinskii V.E. *Perineologia*. M.: RUDN, 2010. [in Russian]
2. Budatha M, Rosbanravan S, Zbeng Q et al. Extracellular matrix proteases contribute to progression of pelvic organ prolapse in mice and humans. *J Clin Invest* 2011; 121 (5): 2048–59.
3. Zong W, Stein SE, Starcher B et al. Alteration of vaginal elastin metabolism in women with pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 2010; 115 (5): 953–61.
4. De Landsbeere L, Munaut C, Nussgens B et al. Histology of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse: a literature review. *Int Urogynecol J* 2013; 24 (12): 2011–20.
5. Slieker-ten Hove MC, Pool-Goudzwaard AL, Eijkemans MJ et al. Prediction model and prognostic index to estimate clinically relevant pelvic organ prolapse in a general female population. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2009; 20 (9): 1013–21.
6. Yu HY, Yang X, Li GH. Prospective study of the impact on lower urinary tract symptoms after pelvic organ prolapse surgery. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2011; 46 (8): 570–3.
7. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696–701.
8. Кадурина Т.И. Наследственные коллагенопатии (клиника, диагностика, лечение и диспансеризация). СПб: Невский диалект, 2000. / Kadurina T.I. *Nasledstvennyye kollagenopatii (klinika, diagnostika, lechenie i dispanserizatsiya)*. SPb: Nevskii dialekt, 2000. [in Russian]
9. Chen B, Yeh J. Alterations in connective tissue metabolism in stress incontinence and prolapse. *J Urol* 2011; 186 (5): 1768–72.
10. Кадурина Т.И. Дисплазия соединительной ткани. Руководство для врачей. СПб: ЭЛБИ, 2009. / Kadurina T.I. *Displaziiia soedinitel'noi tkani. Rukovodstvo dlia vrachei*. SPb: ELBI, 2009. [in Russian]
11. Yucel N, Usta A, Guzin K et al. Immunohistochemical analysis of connective tissue in patients with pelvic organ prolapse. *J Mol Histol* 2013; 44 (1): 97–102.
12. Gabriel B, Watermann D, Hancke K et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in uterosacral ligaments is associated with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2006; 17 (5): 478–82.
13. Abramowitch SD, Feola A, Jallab Z et al. Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 144 (Suppl. 1): S146–58.
14. Karam JA, Vazquez DV, Lin VK et al. Elastin expression and elastic fibre width in the anterior vaginal wall of postmenopausal women with and without prolapse. *BJU Int* 2007; 100 (2): 346–50.
15. Vulic M, Strinic T, Tomic S et al. Difference in expression of collagen type I and matrix metalloproteinase-1 in uterosacral ligaments of women with and without pelvic organ prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 155 (2): 225–8.
16. Chen L, Wang T, Liu L et al. Matrix metalloproteinase-9 -1562C/T promoter polymorphism confers risk for COPD: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(3): e60523.
17. Li M, Shi J, Fu L et al. Genetic polymorphism of MMP family and coronary disease susceptibility: a meta-analysis. *Gene* 2012; 495 (1): 36–41.
18. Cartwright R, Kirby AC, Tikkinen KA et al. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies of urinary symptoms and prolapse in women. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212 (2): 199.e1–24.
19. Chen HY, Lin WY, Chen YH et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphism and risk of pelvic organ prolapse in Taiwanese women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 149 (2): 222–4.
20. Wu JM, Visco AG, Grass EA et al. Matrix metalloproteinase-9 genetic polymorphisms and the risk for advanced pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 2012; 120 (3): 587–93.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ханзадян Марина Лаертовна – канд. мед. наук, доц. каф. акушерства, гинекологии и репродуктивной медицины ФПК МР ФГАОУ ВО РУДН. E-mail: khmala@rambler.ru

Радзинский Виктор Евсеевич – д-р мед. наук, проф., зав. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии ФГАОУ ВО РУДН. E-mail: radzinsky@mail.ru

Демура Татьяна Александровна – д-р мед. наук, проф. каф. патологической анатомии им. акад. А.И.Струкова ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова.

E-mail: demura-t@yandex.ru

Донников Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, рук. медицинского отдела ООО «НПФ ДНК-Технология»

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.