

УДК 618.14-006

І.М. Савченко,

В.Ю. Гарбузова

Сумський державний університет

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ 1G/2G-1607 ГЕНА МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇ- НАЗИ-1 ІЗ ФОНОВИМИ ПРОЦЕСАМИ ШИЙКИ МАТКИ СЕРЕД ЖІНОК ІЗ ЛЕЙОМІОМОЮ

Ключові слова: матриксна металопротеїназа-1, однонуклеотидний поліморфізм, лейоміома матки, ерозія.

Резюме. Наведено результати визначення поліморфізму 1G/2G-1607 гена матриксної металопротеїнази-1 у 108 жінок з лейоміомою матки (ЛМ) і 84 жінок без вказаної патології (контрольна група). Проведений порівняльний аналіз розподілу генотипів серед жінок з ерозією шийки матки. Результати виконаних нами досліджень показали, що існує зв'язок між поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 і розвитком лейоміоми матки, перебіг якої супроводжується несправжньою ерозією шийки матки (ектопією циліндричного епітелію) ($P=0,004$ за χ^2 -критерієм Пірсона).

Вступ

Важливість проблеми вивчення стану шийки матки у пацієнок із лейоміомою матки (ЛМ) зумовлена однаково великою частотою, з якою зустрічаються згадані вище патології в структурі гінекологічної захворюваності. ЛМ діагностується у 20-40% жінок різного віку [1]. Середній вік жінок при первинному виявленні ЛМ становить $32,8 \pm 0,47$ років [2]. Ріст цієї доброякісної пухлини порушує фізіологічний перебіг менструальної, секреторної і дітородної функцій. Прогресує патологія шийки матки при наявності супутньої гінекологічної патології пухлинного характеру. Дані про її частоту при ЛМ відсутні. Наявність змін поверхневого епітелію шийки матки та характер їх вираженості суттєво змінює об'єм оперативного втручання з приводу ЛМ, інвалідизуючи жінку.

Основу пато- і морфогенезу ЛМ забезпечують процеси ангиогенезу. Сидорова І.С. та співавтори. за клініко-морфологічною картиною обґрунтували поділ ЛМ на прості та проліферуючі. Прості ЛМ характеризуються повільним ростом, інтрамуральною чи субсерозною локалізацією одиничних вузлів, схильних до фіброзу або самовільної регресії. Такі пухлини відрізняються слабкою активністю периваскулярних зон та процесів неангіогенезу (утворення судин синусоїдного типу), підвищеною синтетичною активністю міоцитів пухлини з високою продукцією компонентів екстрацелюлярного матриксу.

Гістологічно проліферуючі ЛМ характеризуються множинними зонами росту з вираженою периваскулярною активністю та ангиогенезом, зниженою синтетичною активністю м'язевих клітин та слабкою продукцією

компонентів позаклітинного матриксу. Частіше локалізуються субмукозно та інтрамурально, швидко ростуть, часто поєднуючись із гіперпластичними процесами ендометрію та яєчників, а також неопластичними змінами шийки матки [3, 5].

Вплив системи ферментів матриксних металопротеїназ (ММР) сьогодні є сферою наукових і практичних інтересів щодо пошуку прогностичних критеріїв при доброякісних та злоякісних пухлинах. Особливе значення для інвазивності пухлинних клітин має наявність і активність ферментів-колагеназ, у тому числі матриксної металопротеїнази-1 (ММР-1).

Відомо, що генний поліморфізм ММР-1 (2G/2G) призводить до посиленої продукції фермента і пов'язаний із підвищеною інвазивністю пухлин. Велике прогностичне значення ММР-1 продемонстровано при раку легень [13], підшлункової залози [9], стравоходу [14], яєчників [11], ободової та прямої кишки [7, 8, 15].

Покривний епітелій піхвової частини шийки матки характеризується високою регенеративною активністю та виконує захисну функцію, виступаючи індикатором змін її біоценозу чи присутності вірусної інфекції. Стан шийки матки у більшості випадків підтверджує порушення гормонального балансу в організмі жінки. Ділянки пошкодженого багаточарового плоского незроговілого епітелію на поверхні шийки матки замінюються клітинами циліндричного епітелію з цервікального каналу - виникає ектопія або несправжня ерозія шийки матки. Ектопію циліндричного епітелію прийнято вважати доброякісним процесом шийки, але вона є фоновою патологією для розвитку передракових змін шийки матки. Дані щодо розподілу алельних варіантів гена

ММР-1 у жінок із лейоміомою матки, перебіг якої супроводжується ектопічними змінами шийки, в українській популяції відсутні.

Мета дослідження

Вивчити зв'язок алельних варіантів гена ММР-1 за поліморфізмом 1G/2G-1607 у хворих з ЛМ серед жінок, що мають фонову патологію шийки матки.

Матеріали і методи

Діагноз лейоміоми матки було встановлено 108 жінкам основної групи віком від 26 до 60 років (середній вік $47,82 \pm 6,6$ роки) на основі аналізу анамнестичних та клінічних даних, а також результатах гінекологічного огляду та підтверджено показниками ультразвукового дослідження. До цієї ж групи увійшли і прооперовані пацієнтки, у яких спостерігався симптомний перебіг даної пухлини (47,2%); у таких хворих діагноз ЛМ підтверджений гістологічно. Усі жінки основної групи зверталися зі скаргами з приводу ускладнень ЛМ до гінекологічних відділень Путивльської та Конотопської ЦРЛ, міських лікарень №1 та №5 м. Суми, Обласного перинатального центру.

Групу популяційного контролю склали 84 жінки в менопаузі (середній вік $69,75 \pm 8,4$ років), що робило неможливим розвиток даної патології в наступні роки життя таких пацієнток, тим самим збільшуючи надійність контролю. Відсутність лейоміоми матки у жінок цієї групи підтверджувалась даними УЗД та гінекологічного огляду під час обов'язкового щорічного обстеження в жіночій консультації Конотопської ЦРЛ у зв'язку з лікуванням іншої екстрагенітальної патології.

Пацієнтки зі злоякісною пухлинною патологією будь-якої локалізації в дослідженні участі не брали. Не було у складі основної групи і жінок у період вагітності та лактації. Усі жінки, що брали участь у дослідженні, на момент опитування виконали свою дітородну функцію. Під час гінекологічного обстеження у пацієнток обох груп зібрано гінекологічний анамнез, проведено огляд шийки матки у дзеркалах, цитологічне дослідження, просту та розширену кольпоскопію, бімануальне піхвове обстеження.

При вивченні даних кольпоскопії керувалися міжнародною класифікацією кольпоскопічних термінів, прийнятою на VII Всесвітньому конгресі з патології шийки матки і кольпоскопії (Рим, 1990) та кольпоскопічною класифікацією патологічних процесів шийки матки за Коханевич С.В. (1997 рік) [4].

Аналіз даних гінекологічного анамнезу та

огляду встановив, що несправжня ерозія шийки матки була діагностована у 52,7% жінок основної та 54,8% жінок контрольної груп. Хворих із ЛМ і жінок контрольної групи, залежно від наявності чи відсутності несправжньої ерозії (ектопії циліндричного епітелію) піхвової частини шийки матки, було поділено на підгрупи.

Дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етнічні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Усі пацієнти підписали інформовану угоду про участь у дослідженнях із наступним забором венозної крові з метою генетичного аналізу.

Визначення 1G/2G-1607 поліморфізму (rs 1799750) гена ММР-1 проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів при виділенні їх шляхом електрофорезу в 2,5% агарозному гелі.

З метою генотипування, венозну кров набирали у стерильних умовах у моновети, об'ємом 2,7мл., із калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти ("Sarstent", Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C . ДНК із неї виділяли, використовуючи набори "Изоген" (Росія). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт 1G/2G-1607 поліморфізму в промоторі гена ММР-1, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) 5'TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA 3' і зворотнього (antisense) 5'TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGA 3'. Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5- кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 1,0 ОД Taq- полімерази, об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Програма ампліфікації: денатурація - 94°C (50с), гібридизація праймерів $62,5^{\circ}\text{C}$ (45с), елонгація 72°C (1хв.) разом 30 циклів. Для рестрикційного аналізу 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C упродовж 18 годин з 3 ОД рестриктази AluI у буфері Tango такого складу: 3,3 мМ трис-ацетату (рН 7,9), 10 мМ ацетату магнію, 66 мМ ацетату калію, 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 1607-й позиції гена ММР-1 не містився додатковий один гуанін, ампліфікат, що складався з 269 пар основ, розщеплювався рестриктазою

AluI на два фрагменти 241 і 28 пар основ. У разі присутності додаткового гуаніну, сайт рестрикції для AluI втрачався і візуалізувався один фрагмент завдовжки 269 пар основ. Ампліфікати одержаного фрагменту гена MMP-1 після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидій, горизонтальний електрофорез (0,1A; 140V) проводили протягом 35 хвилин. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 критерієм. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Обговорення результатів дослідження

Генотипування хворих із лейоміомою та пацієнтів контрольної групи за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 дало змогу порівняти їх між відповідними підгрупами, утвореними за наявності та відсутності такої патології шийки матки як ектопія циліндричного епітелію піхвової частини шийки матки в анамнезі.

Вивчення частоти генотипів за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 у пацієток з наявністю

або відсутністю в анамнезі ерозії шийки матки (табл.), виявило істотні відмінності в розподілі частот алельних варіантів 1G/2G-1607 поліморфізму гена MMP-1 між хворими на ЛМ і пацієнтками контрольної групи лише серед жінок, у яких діагностовано ектопію циліндричного епітелію шийки матки ($P=0,004$).

Фермент MMP-1 забезпечує деградацію колагенів I, II і III типів, приймаючи участь у ремоделюванні позаклітинного мікрооточення. Попередник цього білка - про-MMP-1, стає функціонально активним під впливом гормонів, цитокінів, протеаз. Інсерція додаткового нуклеотиду гуаніну в положенні -1607 в промоторній ділянці гена створює додатковий сайт для транскрипції у мРНК та призводить до посилення продукції про-MMP-1. Отже, промотор з інсерцією 2G володіє більшою транскрипційною здатністю, ніж варіант промотору 1G [6].

Одержані нами результати свідчать про те, що існують істотні відмінності в розподілі генотипів за поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 між хворими з ЛМ та пацієнтками контрольної групи.

Таблиця 1

Розподіл частоти осіб із різними генотипами за 1G/2G-1607 поліморфізмом гена MMP-1 у контрольній групі та у хворих із ЛМ залежно від наявності ектопії шийки матки в анамнезі

Генотип	Наявність ектопії		Відсутність ектопії	
	Контроль, n (%)	ЛМ, n (%)	Контроль, n (%)	ЛМ, n (%)
1G/1G	11 (23,9)	6 (10,5)	4 (10,5)	3 (5,9)
1G/2G	24 (52,2)	19 (33,3)	20 (52,6)	32 (62,7)
2G/2G	11 (23,9)	32 (56,1)	14 (36,8)	16 (31,4)
	$\chi^2=11,261$; $P=0,004$		$\chi^2=1,172$; $P=0,557$	

Примітки: n – кількість осіб; P – значимість відмінностей у розподілі генотипів між контролем і ЛМ.

Ці відмінності, зокрема, є характерними для жінок, у яких присутні ерозивні зміни епітелію шийки матки в анамнезі.

Так, в контрольній групі відсоток гомозигот 1G/1G удвічі більший серед пацієток з ектопією циліндричного епітелію. Кількість носіїв із генотипом 1G/2G у пацієток зі змінами шийки матки та здоровою шийкою була однаковою. А відсоток гомозигот за 2G алелем в групі з ерозією був дещо меншим, ніж серед пацієток зі здоровою шийкою матки. В основній групі носіїв гомозиготних генотипів (1G/1G та 2G/2G) було вдвічі більше серед жінок з ерозією, порівняно із пацієнтками без ектопії. А кількість гетерозигот 1G/2G була істотно вищою серед жінок зі здоро-

вою шийкою.

Окрім впливу на перебіг фізіологічних процесів регенерації, MMP-1 є важливим модулятором канцерогенезу. Багато досліджень присвячено проблемам раку шийки матки, проте їх результати досить суперечливі. Так, Lai H.C. у своїх дослідженнях встановив, що частота алеля 2G у пацієток з плоскоклітинним раком різного ступеня інвазивності істотно не відрізняються від контрольних значень. А гетерозиготне носійство 1G/2G забезпечувало більшу тривалість життя у таких пацієток, порівняно з гомозиготами 2G/2G або 1G/1G ($P=0,02$). Зроблено висновок, що гетерозиготне носійство може бути використано як прогностичний маркер у хворих з раком шийки

матки [12].

Nishioka Y. виявив кореляцію даного SNP з клінічною стадією раку шийки матки. Результати досліджень свідчать, що промотор з 2G алелем підвищує транскрипційну активність гена MMP-1 та збільшує інвазивну здатність рака шийки матки [16]. Ju W. Дослідивши велику популяцію корейських жінок, не встановив істотної кореляції між поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 та підвищеною сприйнятливостю до раку шийки матки чи погіршенням прогнозу для таких пацієнток [10].

Висновки

Результати виконаних нами досліджень показали, що існує зв'язок між поліморфізмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 і розвитком лейоміоми матки. Цей зв'язок виявляє себе, зокрема, у жінок, які мають ектопію циліндричного епітелію піхвової частини шийки матки.

Перспективи подальших досліджень

Суперечливість і неоднозначність даних щодо впливу різних видів поліморфізму гена MMP-1 на розвиток патології шийки матки у жінок з лейоміомою свідчать про складність проблеми і зумовлюють необхідність продовжувати дослідження в цьому напрямі.

Література. 1. Айламазян Э.К. Гинекология от пубертата до постменопаузы / Э.К. Айламазян [и соавт.] / МЕДпресс-информ. // Практическое руководство для врачей. - 2007 - С. 276-284. 2. Вихляева Е.М. Руководство по эндокринной гинекологии / Е.М. Вихляева, Б.И. Железнов [и др.] // М.: МИА. - 2002. - С. 424-487. 3. Зайратьянц О.В. Особенности морфогенеза и ангиогенеза лейомиом матки / О.В. Зайратьянц, И.С. Сидорова, С.А. Леваков, Е.М. Левин, К.В. Опаленов // Архив патологии. - 2005. - Т.67, №3. - С. 29-31. 4. Наказ МОЗ України № 676 від 31.12.2004 "Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги". 5. Сидорова И.С. Диагностическая медицинская морфометрия / И.С. Сидорова, О.В. Зайратьянц, С.А. Леваков // М. - 2002. - С. 192-199. 6. Dunleavey L. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer / L. Dunleavey, S. Beyzade, S. Ye. // Matrix Biol. - 2000. - Vol.19. - P. 175-7. 7. Ghilardi G. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness / G. Ghilardi, M.L. Biondi, J. Mangoni, S. Leviti [et al.] // Clin Cancer Res. - 2001. - Vol.7 - P. 2344-2346. 8. Hinoda Y. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer / Y. Hinoda, N. Okayama, N. Takano, K. Fujimura [et al.] // Int. J. Cancer. - 2002. - Vol.102 - P. 526-529. 9. Ito T. Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor / M. Ito, J. Shiozawa, S. Naito, T. Kanematsu [et al.] // Mod. Pathol. - 1999. - Vol.12. - P. 669-674. 10. Ju W. Promoter polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and risk of cervical cancer in Korean women / W. Ju, S. Kang, J.W. Kim, N.H. Park [et al.] // Cancer Lett. - 2005. - Vol.217, №2. - P. 191-6. 11. Kanamori Y. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region / Y. Kanamori, M. Matsushima, T. Minaguchi, K. Kobayashi [et al.] // Cancer Res. - 1999. - Vol.59. - P. 4225-4227. 12. Lai H.C.

Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer / H.C. Lai, C.M. Chu, Y.W. Lin, C.C. Chang [et al.] // Gynecol Oncol. - 2005. - Vol.96. - P. 314-9. 13. Li M. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 levels in peripheral plasma and tumour tissues of lung cancer patients / M. Li, T. Xiao, Y. Zhang, L. Feng [et al.] // Lung Cancer. - 2010. - Vol.69, №3. - P. 341-7. 14. Murray G.I. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer / G.I. Murray, M.E. Duncan, P. O'Neil, J.A. McKay [et al.] // J Pathol. - 1998. - Vol.185. - P. 256-261. 15. Murray G.I. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer / G.I. Murray, M.E. Duncan, P. O'Neil, W.T. Melvin [et al.] // NatMed. - 1996. - Vol.2 - P. 461-462. 16. Nishioka Y. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression / Y. Nishioka, S. Sagae, A. Nishikawa, S. Ishioka, R. Kudo // Cancer Lett. - 2003. - Vol.200, №1. - P. 49-55. 17. Rutter J.L. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription / J.L. Rutter, T.I. Mitchell, G. Buttice [et al.] // Cancer Res. - 1998. - Vol.58. - P. 5321-5325. 18. Ye S. Invasiveness of cutaneous melanoma is influenced by matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism / S. Ye, S. Dhillon, S.J. Turner // Cancer Res. - 2001. - Vol.61. - P. 1296-1298.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА 1G/2G-1607 ГЕНА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1 С ФОНОВЫМИ ПРОЦЕССАМИ ШЕЙКИ МАТКИ СРЕДИ ЖЕНЩИН С ЛЕЙОМИОМОЙ

И.Н.Савченко, В.Ю.Гарбузова

Резюме. Приведены результаты определения полиморфизма 1G/2G гена матриксной металлопротеиназы-1 у 108 женщин с лейомиомой матки (ЛИМ) и 84 женщин без указанной патологии (контрольная группа). Проведен сравнительный анализ распределения генотипов среди женщин с эрозией шейки матки. Результаты выполненных нами исследований показали, что существует связь между полиморфизмом 1G/2G-1607 гена MMP-1 и развитием лейомиомы матки, течение которой сопровождается ложной эрозией шейки матки (эктопией цилиндрического эпителия) ($P=0,004$ за χ^2 -критерием Пирсона).

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа-1, однонуклеотидный полиморфизм, лейомиома матки, эрозия.

CONNECTION BETWEEN THE 1G/2G-1607 POLYMORPHISM OF THE MATRIX METALLOPROTEINAZA-1 GENE AND THE BACKGROUND PROCESSES OF THE CERVIX AMONG WOMEN DIAGNOSED WITH LEIOMYOMA

I.M.Savchenko, V.Yu.Garbusova

Abstract. Provided the results of the 1G/2G polymorphism detection of the matrix-metalloproteinaza-1 gene between 108 women with leiomyoma and 84 women without this pathology (the control group). A comparative analysis of the genotypes distribution between women with cervical erosion was conducted. The results of the research showed that there is a connection between the 1G/2G polymorphism of the MMP-1 gene and the leiomyoma development, which is followed by the false erosion of the cervix (ectopia of the columnar epithelium) ($P=0,004$ by the χ^2 -Pearson's criterion).

Key words: matrix-metalloproteinaza-1, single nucleotide polymorphism, leiomyoma, erosion.

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №1 (51). - P.127-130.

Надійшла до редакції 30.01.2015

Рецензент – проф. І.С. Давиденко

© І.М.Савченко, В.Ю. Гарбузова, 2015