

УДК 618.4-092:615.355

©Кореновский, Ремнёва

**РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ
ММП-1, ММП-2, ММП-9 И ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ
ТИМП-1 В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ В РОДАХ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ
ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

Ю.В. Кореновский*, О.В. Ремнёва

Алтайский государственный медицинский университет,
656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 40; тел.: +7 (3852) 24-13-92; эл. почта: timidin@gmail.com

Целью исследования было установить допустимые диапазоны концентраций матриксных металлопротеиназ ММП-1, ММП-2, ММП-9 и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (ТИМП-1) в амниотической жидкости в первом периоде родов при физиологически протекающей беременности. Обследовано 89 женщин в первом периоде срочных родов. Образцы амниотической жидкости забирали в первом периоде родов вагинальной амниотомией. Методом иммуноферментного анализа определены концентрации ММП-1, ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 в образцах амниотической жидкости. Установлены допустимые диапазоны концентраций ММП-1, ММП-2, ММП-9, ТИМП-1, а также отношения концентраций матриксных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора (ММП-1/ТИМП-1, ММП-2/ТИМП-1, ММП-9/ТИМП-1) в амниотической жидкости в первом периоде родов при физиологически протекающей беременности. Они составили: ММП-1 - 5,1-16,8 пг/мг белка, ММП-2 - 238,3-374,1 пг/мг белка, ММП-9 - 66,1-113,3 пг/мг белка, ТИМП-1 - 4,7-13,6 пг/мг белка, отношение ММП-1/ТИМП-1 - 0,1-2,2, отношение ММП-2/ТИМП-1 - 19,9-55,7, отношение ММП-9/ТИМП-1 - 4,2-17,2.

Ключевые слова: амниотическая жидкость, матриксные металлопротеиназы, роды

DOI: 10.18097/PBMC20166201096

ВВЕДЕНИЕ

Исследование амниотической жидкости представляет существенный теоретический и практический интерес, поскольку выяснение механизмов протекания физиологических родов, механизмов, лежащих в основе преждевременных родов, а также развития гипоксии и идентификация ключевых молекулярных маркеров гипоксического и гипоксически-ишемического повреждения тканей (прежде всего центральной нервной системы) плода может дать ценную информацию о его состоянии перед родами и решить главную задачу акушерства – определение времени и способа родоразрешения [1, 2].

Срочные роды характеризуются постепенным размягчением и расширением шейки матки, сокращениями матки и разрывом оболочек плода [3]. Матриксные металлопротеиназы (ММП) и физиологические регуляторы активности этих ферментов – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП) – играют критическую роль в начале родов и разрушении оболочек плода [4]. До начала сокращений матки децидуальная оболочка является главным продуцентом ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 [3]. Сразу после начала сокращений миометрия продукция ММП-2 и ММП-9 существенно повышается [5]. При этом ММП-2 является главной ММП в децидуальной оболочке, а ММП-9 – в амнионе. Уровень ММП-9 повышается в оболочках плода после начала сокращений матки [6], а в амниотической жидкости ММП-9 замещается ММП-2, что сопровождается снижением концентраций ТИМП-1 [5].

Патологическое разрушение оболочек плода ранее 37 недели беременности (преждевременный дородовый разрыв оболочек) является главной причиной спонтанных преждевременных родов [7]. При преждевременном дородовом разрыве оболочек плода в ответ на продукты бактерий, цитокины IL-1 β и TNF- α , паракринные или аутокринные сигналы аномально повышается экспрессия и активность ММП-1, ММП-2 и ММП-9, которые разрушают соединительную ткань [7].

Установление допустимых диапазонов концентраций ММП-1, ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 позволит использовать их в качестве ориентировочных значений для уточнения механизма физиологических срочных родов.

МЕТОДИКА

Организация исследования

В исследовании приняли участие 89 беременных женщин с физиологически протекающей беременностью. Критериями включения пациенток в исследование были: 1) срок родоразрешения 37 и более недель; 2) госпитализация беременных женщин не менее чем за одни сутки до родов; 3) одноплодная беременность. Критериями исключения пациенток из исследования были: 1) срок родоразрешения женщин менее 37 недель; 2) наличие у женщин нарушений репродуктивной функции в анамнезе, экстрагенитальных заболеваний в стадии субкомпенсации и декомпенсации и преэклампсии; 3) наличие у женщин лекарственной

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

и/или наркотической и/или токсической (в том числе алкогольной) зависимости, установленной на основании анамнестических данных; 4) наличие у новорожденных врожденных пороков развития и генетических нарушений метаболизма; 5) наличие у женщин верифицированного диагноза сахарного диабета любого типа и любой степени тяжести; 6) иммуноконфликтная и многоплодная беременность. Клиническая характеристика рожениц и новорожденных представлена в таблице 1. Все пациентки давали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Взятие образца амниотической жидкости

Образцы амниотической жидкости забирали во время проведения оперативного родоразрешения или в первом периоде родов вагинальной амниотомией при раскрытии шейки матки 4-5 см. Образцы амниотической жидкости центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин, замораживали и хранили до проведения лабораторного исследования при температуре -20°C не более 1 месяца.

Биохимические исследования

В образцах амниотической жидкости определяли концентрации белка колориметрическим методом с пирогаллоловым красным [8] реагентами фирмы “Вектор-Бест” (Россия) (Белок-ПГК-Ново кат. № В-8047) на анализаторе общего белка в моче “Беллур-600” (ООО НПП “Техномедика”, Россия) и методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов поликлональных антител – концентрации ММП-1 (“RayBiotech Inc.”, США; кат. № ELH-MMP1-001), ММП-2 (“RayBiotech Inc.”, кат. № ELH-MMP2-001),

ММП-9 (“RayBiotech Inc.”, кат. № ELH-MMP9-001), ТИМП-1 (“RayBiotech Inc.”, кат. № ELH-TIMP1-001) с помощью вертикального фотометра 352 Multiskan MS Microplate Reader при длине волны 450 нм (“Thermo/LabSystems”, Финляндия). Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями производителя наборов реагентов.

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе JMP 7.0 (“SAS Institute”, США), вычисляя следующие параметры: среднее, среднее квадратичное отклонение, медиана, 25-й процентиль, 75-й процентиль, доверительный интервал 95%. Между полученными показателями вычисляли r-коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принимая во внимание данные литературы об изменениях в системе ММП в течение родов [3], с целью установления допустимых диапазонов мы исследовали в амниотической жидкости ключевые параметры этой протеолитической системы: концентрации ММП-1, ММП-2, ММП-9 и ТИМП-1 (табл. 2). Поскольку активность ММП контролирует их физиологический ингибитор ТИМП-1 [9-11], а концентрация ММП может сильно зависеть от степени их разведения в амниотической жидкости, объём которой перед родами может значительно варьировать [12], то важно анализировать не только абсолютные концентрации этих ферментов, но и отношение концентраций фермент/ингибитор в амниотической жидкости (табл. 3) [13].

Таблица 1. Клиническая характеристика рожениц и их новорожденных детей.

Показатель	Среднее $\pm \sigma$	Медиана	25-75 процентиль	Доверительный интервал 95%
Возраст рожениц, лет	24,7 \pm 3,48	25	22,0-27,0	18,25-32,75
Первородящие / повторнородящие, n	71 / 18	-	-	-
Индекс массы тела, кг/м ²	30,5 \pm 3,24	30,3	27,9-33,0	24,8-36,5
Срок родов, нед	37,8 \pm 0,75	38	37,0-38,0	37,0-39,0
ИАЖ, мм	179,7 \pm 39,46	180	151,0-206,0	107,5-259,8
Масса новорожденного, г	3097,1 \pm 418,71	3127	2837,0-3388,0	2125,0-3890,5
Пол новорожденных мужской/женский, n	43 / 46	-	-	-
Баллы по шкале Апгар на 1 мин	7,5 \pm 0,68	8	7,0-8,0	6,0-9,0
Баллы по шкале Апгар на 5 мин	8,7 \pm 0,51	9	8,0-9,0	8,0-9,0

Примечание: σ - стандартное квадратичное отклонение, ИАЖ - индекс амниотической жидкости.

Таблица 2. Концентрация матриксных металлопротеиназ ММП-1, ММП-2, ММП-9 и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ ТИМП-1 в амниотической жидкости в первом периоде родов физиологически протекающей одноплодной беременности.

Показатель	Среднее $\pm \sigma$	Медиана	25-75 процентиль	Доверительный интервал 95%
ММП-1, пг/мг белка	10,5 \pm 3,02	10,5	8,8-12,8	5,1-16,8
ММП-2, пг/мг белка	300,7 \pm 32,50	298,1	279,0-320,0	238,3-374,1
ММП-9, пг/мг белка	91,8 \pm 12,07	90,9	85,4-102,0	66,1-113,3
ТИМП-1, пг/мг белка	9,0 \pm 2,11	9,1	7,7-10,2	4,7-13,6

Примечание. Здесь и в таблице 3: σ - стандартное квадратичное отклонение, ММП - матриксная металлопротеиназа, ТИМП - тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ.

Таблица 3. Отношение концентраций матриксных металлопротеиназ ММП-1, ММП-2, ММП-9 к концентрации тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ ТИМП-1 в амниотической жидкости в первом периоде родов физиологически протекающей одноплодной беременности.

Показатель	Среднее $\pm \sigma$	Медиана	25-75 процентиль	Доверительный интервал 95%
ММП-1/ТИМП-1	1,3 \pm 0,50	1,4	1,0-1,6	0,1-2,2
ММП-2/ТИМП-1	36,3 \pm 9,24	37	30,2-43,1	19,9-55,7
ММП-9/ТИМП-1	10,7 \pm 3,14	10,6	8,6-13,0	4,2-17,2

Концентрации ММП-1 в амниотической жидкости коррелировали с индексом массы тела рожениц ($r=0,23$, $p=0,029$) и их возрастом ($r=0,23$; $p=0,032$). Это косвенно свидетельствует о том, что именно роженица является главным источником этого фермента в амниотической жидкости. Концентрации ММП-1 обратно коррелировали с концентрацией ММП-9 в амниотической жидкости ($r=-0,21$, $p=0,049$), причём отношение ММП-1/ТИМП-1 прямо коррелировало с концентрацией ММП-9 в амниотической жидкости ($r=0,27$, $p=0,012$). Это свидетельствует о том, что ММП-1 препятствует накоплению ММП-9 в амниотической жидкости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Представленные в настоящей работе результаты исследования концентраций матриксных металлопротеиназ ММП-1, ММП-2, ММП-9 и их тканевого ингибитора ТИМП-1 позволяют использовать эти данные в качестве ориентировочных значений для уточнения механизмов физиологических срочных родов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Torrance H.L., Pistorius L., Voorbij H.A., Visser G.H. (2013) J. Matern. Fetal Neonatal Med., **26**, 728-730.

2. Wiberg-Itzel E., Akerud H., Andolf E., Hellstrom-Westas L., Winbladh B., Wennerholm U.-B. (2011) Obstet. Gynecol., **118**, 135-142.
3. Weiss A., Goldman S., Shalev E. (2007) Frontiers in Bioscience, **12**, 649-659.
4. Cockle J.V., Gopichandran N., Walker J.J., Levene M.I., Orsi N.M. (2007) Reprod. Sci., **14**, 629-645.
5. Goldman S., Weiss A., Eyal V., Shalev E. (2003) Mol. Hum. Reprod., **9**, 367-373.
6. Xu P., Alfaidy N., Challis J.R.G. (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab., **87**, 1353-1361.
7. Vadillo-Ortega F., Estrada-Gutiérrez G. (2005) BJOG, **112**, Suppl. 1, 19-22.
8. Пункова В.И., Прасолова Л.М. (2007) Определение белка в моче и спинномозговой жидкости, Кольцово, 43 с.
9. Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. (2002) J. Cell Sci., **115**, 3719-3727.
10. Hutton M., Willenbrock F., Brocklehurst K., Murphy G. (1998) Biochemistry, **37**(28), 10094-10098.
11. Кореновский Ю.В., Синельникова Л.М., Фильчакова О.Н., Шабалина Ю.В., Ершова Е.Г., Фадеева Н.И., Ельчанинова С.А. (2012) Бюллетень ВСИЦ СО РАМН, **5**(87), Ч. 2, 146-149.
12. Brace R.A., Cheung C.Y. (2014) Adv. Exp. Med. Biol., **814**, 49-68.
13. Turner S.W., Carter J., Danielian P., Chalmers I., McConaghy L., Pacitti N., Booth N. (2014) J. Matern. Fetal Neonatal Med., **27**, 416-420.

Поступила: 25. 06. 2015.
Принята к печати: 18. 08. 2015.

REFERENCE RANGES OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1, -2, -9 AND TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES-1 CONCENTRATIONS IN AMNIOTIC FLUID IN PHYSIOLOGICAL PREGNANCY

Yu.V. Korenovsky, O.V. Remneva

Altai State Medical University,
40 Lenina av., Barnaul, Altai Region, 656038 Russia

The aim of this study was to determine reference values of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the amniotic fluid at the first stage of labor in physiological pregnancy. 89 women at the first stage of term labor have been examined. Samples of amniotic fluid were taken at the first period of labor by vaginal amniotomy. Concentrations of MMP-1, MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 were investigated in amniotic fluid by ELISA kits. We have determined normal concentration ranges for MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and ratios of concentrations of MMPs and TIMP-1 (MMP-1/TIMP-1, MMP-2/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1) in the amniotic fluid at the first period of labor in physiological pregnancy. These included: MMP-1 - 5.1-16.8 pg/mg of protein, MMP-2 - 238.3-374.1 pg/mg of protein, MMP-9 - 66.1-113.3 pg/mg of protein, TIMP-1 - 4.7-13.6 pg/mg of protein, ratio of MMP-1/TIMP-1 - 0.1-2.2, ratio of MMP-2/TIMP-1 - 19.9-55.7, ratio of MMP-9/TIMP-1 - 4.2-17.2.

Key words: amniotic fluid, matrix metalloproteinase, labor