



УДК 616.34-002-036.1

К.Е. МАЗОВКА, А.В. ТКАЧЕВ

Ростовский государственный медицинский университет, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29

Экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в слизистой оболочке кишечника у больных с воспалительными заболеваниями кишечника в зависимости от активности заболевания

Мазовка Карина Евгеньевна — ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней, тел. (863) 271-99-15, e-mail: c.bac@rambler.ru
Ткачев Александр Васильевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней, тел. (863) 250-41-74, e-mail: tkachev@aaanet.ru

В статье представлены данные исследования экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 (ТИМП-1). Установлено, что при синдроме раздраженного кишечника (СРК) экспрессия ММП-9 низкая, этот показатель резко возрастает при ЯК. Результаты исследования свидетельствуют о наличии достоверно значимых различий в экспрессии ММП-9 и ТИМП-1 в стадии обострения и ремиссии при язвенном колите. Данные показатели могут использоваться для оценки степени активности заболевания.

Ключевые слова: язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, металлопротеиназы, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы.

К.Е. MAZOVKA, A.V. TKACHEV

Rostov State Medical University, 29 Nakhichevanskii alley, Rostov-on-Don, Russian Federation, 344022

Expression of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in intestinal mucosa in patients with ulcerative colitis according to disease activity

Mazovka K.E. — Assistant Professor of Internal Diseases Propaedeutics Department, tel. (863) 271-99-15, e-mail: c.bac@rambler.ru
Tkachev A.V. — D. Med. Sc., Professor, Head of Internal Diseases Propaedeutics Department, tel. (863) 250-41-74, e-mail: tkachev@aaanet.ru

The article presents data on expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1. It is established that at irritable bowel disease the MMP-9 expression is very weak, while this indicator sharply increases at ulcerative colitis. The research results also testify to the existence of reliably significant differences of MMP-9 and TIMP-1 expression during aggravation and remission stages of ulcer colitis. The obtained data prove that these indicators can be used for assessing the disease activity.

Key words: ulcerative colitis, irritable bowel syndrome, metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase.

Уровень заболеваемости язвенными колитами значительно ниже, чем другими гастроэнтерологическими заболеваниями, однако по тяжести, частоте осложнений и летальности занимает одно из лидирующих мест в структуре заболеваний органов пищеварительной системы, что обуславливает ак-

туальность изучения данной патологии и постоянный интерес к проблеме ее этиологии, патогенеза и лечения данной патологии [1, 2].

Язвенный колит представляет собой хроническое воспалительное заболевание, обусловленное воспалением слизистой оболочки кишечника при от-

сутствии гранулем при биопсии с вовлечением в воспалительный процесс прямой кишки и других отделов толстой кишки различной протяженности, которое характеризуется периодами обострения и ремиссии [2, 3].

В постановке диагноза язвенного колита (ЯК) используются различные инструментальные методы исследования: эндоскопия, гистологическое исследование биоптатов слизистой оболочки, рентгеноконтрастное исследование кишечника [5].

Этиология ЯК до сих пор остается неизвестной, во многих звеньях патогенеза имеются «белые пятна», а клиника заболевания зачастую бывает стертой. Это обуславливает большой объем проводимых исследований и сложности постановки диагноза. После верификации ЯК возникает новая проблема — достижение клинической, эндоскопической и морфологической ремиссии заболевания. Эта потребность обуславливает поиск новых диагностических методик.

Воспалительный процесс при язвенном колите характеризуется формированием криптитов, крипт-абсцессов, эрозий и язв в слизистой оболочке, иногда с распространением в подслизистый слой слизистой оболочки кишечника с расщеплением внеклеточного матрикса [6].

Известно, что при ВЗК в процесс тканевого повреждения и заживления вовлечено большое количество воспалительных медиаторов, таких как протеолитические ферменты, цитокины, факторы роста, лейкоциты, стромальные и ряд других клеток [7]. Одним из наиболее важных ферментов, участвующих в расщеплении внеклеточного матрикса, является матриксная металлопротеиназа.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство Zn²⁺-содержащих протеаз, которые имеют общие функциональные домены, механизмы активации и совместно гидролизуют все компоненты внеклеточного матрикса при нейтральных значениях pH [8]. Многие ученые отмечают, что ММП являются одними из главных факторов повреждения ткани кишечника, опосредованное Т-лимфоцитами при ВЗК [9, 10]. Как показали исследования Vaugh, ММП-9 в наибольшей степени коррелирует с активностью ВЗК [11].

ММП-9 — желатиназа В — воздействует на такие вещества, как желатин, эластин и природные коллагены IV и V типа; однако не обладает активностью в отношении коллагена I типа, протеогликанов или ламининов [12, 13]. In vivo регуляция ММП-9 осуществляется тканевым ингибитором матриксной металлопротеиназы-1 (ТИМП-1). В норме ММП-9 экспрессируются трофобластами, остеокластами, нейтрофилами и макрофагами, следует отметить, что наибольшее количество экспрессируется полиморфноядерными лейкоцитами (ПМЯЛ). Нельзя не отметить, что при воздействии таких медиаторов, как факторы роста или цитокины, экспрессия ММП-9 может быть индуцирована и в клетках других типов [14]. Применительно к кишечной стенке, по данным Castaneda, эпителиальная ММП-9 увеличивает степень повреждения ткани при колитах [15]. Таким образом, от активности экспрессии ММП-9 зависит степень расщепления внеклеточного матрикса и, как следствие, формирование фиброза в тканях. Вместе с тем остается открытым вопрос о корреляции маркеров воспаления в крови, эндоскопической и гистологической активности воспалительного процесса в кишечнике, экспрессии ММП-9 и ТИМП-1 в слизи-

стой оболочке кишечника в стадии обострения и ремиссии, что обосновывает проведение данного исследования.

Цель работы — установить диагностическую значимость ММП-9 и ТИМП-1 для оценки степени воспаления в кишечнике у больных ВЗК.

Материалы и методы

Обследованы 25 пациентов с язвенным колитом, 17 — с синдромом раздраженного кишечника (СРК). В основной группе, представленной пациентами с ЯК, было 14 женщин и 11 мужчин, в группе пациентов с СРК — 12 женщин и 5 мужчин. Возраст пациентов с ЯК варьировал от 24 до 65 лет. В группе пациентов с СРК возраст составил от 19 до 38 лет. У 2 пациентов наблюдалась дистальная форма ЯК, у 14 — левостороннее поражение, тотальное поражение отмечалось у 9 пациентов.

Активность ММП-9 и ТИМП-1 определяли посредством иммуногистохимического исследования с использованием моноклональных кроличьих антител к ММП-9 и поликлональных — к ТИМП-1. Для лабораторной оценки степени тяжести заболевания проводили анализ абсолютного количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и СРБ. Оценка клинической активности ЯК проводилась с использованием шкалы по Rachmilewitz (1989). Сумма баллов от 0 до 4 — ремиссия заболевания, 5-10 баллов — низкая активность, 11-15 баллов — средней и более 16 баллов — высокой степени клинической активности ЯК.

Для иммуногистохимического исследования использовалась полуколичественная оценка с последующей балльной оценкой: 0 — нет окрашивания, 1 — несколько положительных клеток/областей ткани или слабая интенсивность окрашивания во всех клетках, 2 — меньшинство клеток/областей ткани положительны или умеренная интенсивность окрашивания во всех клетках, 3 — большинство клеток/областей ткани положительны /умеренная интенсивность окрашивания во всех клетках, 4 — все клетки/поля ткани резко положительны.

Статистическая обработка данных проводилась методами описательной статистики, рассчитывалась медиана (Me), нижняя квартиль ($Q_{0,25}$) и верхняя квартиль ($Q_{0,75}$). Данные в таблицах представлены в виде: Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Значимость различий между группами оценивалась U-критерием Манна – Уитни. Критический уровень статистической значимости принят равным 0,05. Обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследования

Показатели ММП-9 у больных ЯК и СРК представлены в табл. 1.

У больных ЯК при проведении иммуногистохимического исследования было выявлено резко выраженное позитивное контрастирование ММП-9 в ПМЯЛ, межклеточном веществе в зоне эрозии и язв по сравнению с пациентами с СРК. Следует отметить, что позитивное окрашивание ММП-9 в межклеточном веществе в зоне эрозии и язв, возрастает по мере тяжести тканевого воспаления у пациентов с ЯК. При определении экспрессии ТИМП-1 у пациентов с ЯК также отмечается ее повышение в покровном эпителии толстой кишки и ее криптах, однако менее выраженная, чем экспрессия ММП-9.



Таблица 1.
Показатели ММП-9 у больных ЯК и СРК

Показатель	НЯК		СРК		Уровень значимости различий (p)
	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	
общая	3,0 (1,0 – 4,0)	22	1,0 (1,0 – 1,0)	17	0,000124
межклеточное вещество	1,0 (0,0 – 2,0)	22	0,0 (0,0 – 0,0)	17	0,000477
в цитоплазме макрофагов и ПМЯЛ	3,0 (1,0 – 4,0)	22	1,0 (1,0 – 1,0)	17	0,000061
в цитоплазме одиночных энтероцитов	1,0 (1,0 – 2,0)	22	1,0 (0,0 – 1,0)	17	0,010373

Различия между показателями для НЯК и СРК статистически значимы ($p < 0,05$) во всех группах

Таблица 2.
Показатели ТИМП-1 у больных ЯК и СРК

Показатель	НЯК		СРК		Уровень значимости различий (p)
	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	
общий	2,0 (1,0-3,0)	22	1,0 (0,0-1,0)	17	0,000093
межклеточное вещество	1,0 (0,0-2,0)	22	0,0 (0,0-0,0)	17	0,007133
в цитоплазме макрофагов и ПМЯЛ	2,0 (1,0-3,0)	22	0,0 (0,0-0,0)	17	0,000003
в цитоплазме одиночных энтероцитов	1,0 (1,0-2,0)	22	1,0 (0,0-1,0)	17	0,014864

Различия между показателями ММП-9 и ТИМП-1 для НЯК и СРК статистически значимы ($p < 0,05$) во всех группах

Таблица 3.
Показатели ММП-9 при ЯК в зависимости от стадии заболевания

ММП-9 (прямая кишка)	Обострение		Ремиссия		Уровень значимости различий (p)
	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	
Общая	3,0 (3,0-4,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,000137
в межклеточном веществе в зоне язв	2,0 (1,0-3,0)	18	0,0 (0,0-1,0)	7	0,020442
в цитоплазме бол-ва макрофагов и ПМЯЛ преимущественно в зоне язв, в меньшей степени диффузно	3,0 (3,0-4,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,000137
диффузно умеренная в цитоплазме одиночных энтероцитов	1,5 (1,0-2,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,138127

Различия между показателем ММП-9 в трех первых группах для обострения и ремиссии статистически значимы ($p < 0,05$);

Различия между показателем ММП-9 в четвертой группе для обострения и ремиссии статистически не значимы ($p > 0,05$)



Таблица 4.
Показатели ТИМП-1 при ЯК в зависимости от стадии заболевания

ТИМП-1 (прямая кишка)	Обострение		Ремиссия		Уровень значимости различий (p)
	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	Me (Q _{0,25} – Q _{0,75})	n	
Общая	2,0 (2,0-3,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,000701
в межклеточном веществе в зоне язв	1,5 (0,0-3,0)	18	0,0 (0,0-0,0)	7	0,005891
в цитоплазме бол-ва макрофагов и ПМЯЛ преимущественно в зоне язв, в меньшей степени диффузно	2,5 (2,0-3,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,000317
диффузно умеренная в цитоплазме одиночных энтероцитов	2,0 (1,0-2,0)	18	1,0 (1,0-1,0)	7	0,003672

Различия между показателем ТИМП-1 для обострения и ремиссии статистически значимы (p<0,05) во всех группах

При исследовании ТИМП-1 у больных НЯК отмечалось менее интенсивное контрастирование, как в ПМЯЛ, так и в межклеточном веществе. Выявлены различия в экспрессии ММП-9 и ТИМП-1 в биопсийном материале из сигмовидной кишки у пациентов с ЯК и СРК.

Следует отметить, что позитивное окрашивание ММП-9 в межклеточном веществе в зоне эрозии и язв возрастает по мере тяжести тканевого воспаления у пациентов с ЯК. При определении экспрессии ТИМП-1 у пациентов с ЯК также отмечается ее повышение в покровном эпителии толстой кишки и ее криптах, однако менее выраженное, чем экспрессия ММП-9. При исследовании ТИМП-1 у больных

НЯК отмечалось менее интенсивное контрастирование, как в ПМЯЛ, так и в межклеточном веществе.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что при СРК экспрессия ММП-9 значительно снижена, в то время как при ЯК этот показатель резко возрастает.

Наибольшая экспрессия ММП-9 отмечается в зоне эрозии, язв, крипт-абсцессов, грануляционной ткани, при этом выявляется низкая экспрессия ТИМП-1 в межклеточном веществе, криптах. Представленные результаты исследования показывают, что для оценки степени активности воспаления слизистой оболочки толстой кишки у больных ЯК могут использоваться показатели ММП-9 и ТИМП-1.

ЛИТЕРАТУРА

- Allison M.C., Dbillou A.P., Lewis W.G., Pounder R.E. Inflammatory bowel disease. — Mosby, 1998.
- Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е. Особенности эпидемиологии и этиопатогенеза воспалительных заболеваний кишечника: состояние проблемы // Научная мысль Кавказа. — 2001. — № 2. — С. 175-180.
- ECCO Consensus on UC: Definitions and diagnosis, E.F. Stange et al. // Journal of Crohn's and Colitis. — 2008. — Vol. 2, Issue 1. — P. 24-62.
- Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Волынская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // Практическая медицина. — 2012. — Vol. № 3 (58). — 17-22.
- Андреев А.И., Тертычный А.С., Карэл Г. Современные подходы к морфологической диагностике воспалительных заболеваний кишечника на материале эндоскопических биопсий // Архив патологии. — 2011. — № 1. — С. 40-47.
- Wang Y.D., Yan P.Y. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in ulcerative colitis // World J Gastroenterol. — 2006. — Vol. 12, № 37. — P. 6050-6053.
- Meijer M.J., Mieremet-Ooms M.A., van Hogezaand R.A., Lamers C.B., Hommes D.W., Verspaget H.W. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor- α single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease // World J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13, № 21. — P. 2960-6.
- Ravi A., Garg P., Sh. V. Sitaraman. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or bane? // Inflamm Bowel Dis. — 2007. — Vol. 13, № 1. — P. 97-107.

- Pender S.L., McKenzie C., Shaida A., MacDonald T.T. Regulation of matrix metalloproteinases in human intestinal mucosa // Ann N Y Acad Sci. — 1999. — Vol. 878. — P. 581-2.
- Pender S.L., Tickle S.P., Docherty A.J., Howie D., Wathen N.C., Mac-Donald T.T. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut // J Immunol. — 1997. — Vol. 158. — P. 1582-90.
- Baugh M.D., Perry M.J., Hollander A.P., Davies D.R., Cross S.S., Lobo A.J., Taylor C.J., Evans G.S. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease // Gastroenterology. — 1999. — Vol. 117, № 4. — P. 814-22.
- Brinckerhoff C.E., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2002. — P. 207-14.
- McCawley L.J., Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore // Curr. Opin. Cell. Biol. — 2001. — Vol. 13. — P. 534-40.
- Thiennu H. Vu. and Zena Werb. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology // Genes & Development. — 2000. — Vol. 14. — P. 2123-2133.
- Castaneda F.E., Walia B., Vijay-Kumar M., Patel N.R. et al. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP // Gastroenterology. — 2005. — Vol. 129, № 6. — P. 1991-2008.