Активность матриксной металлопротеиназы-3 (стромелизина-1) в сыворотке крови больных ревматоидным артритом

А.А.Турна¹, Р.Т.Тогузов², Р.С.Сайковский¹

¹Клиническая больница №83 ФМБА России, Москва
(главный врач – проф. О.П.Кузовлев);

²Российский государственный медицинский университет, кафедра клинической лабораторной диагностики ФУВ, Москва
(зав. кафедрой – проф. Р.Т.Тогузов)

Целью исследования было изучение уровня матриксной металлопротеиназы (ММР-3, стромелизин-1) в сыворотке крови больных на ранней стадии ревматоидного артрита с учетом продолжительности заболевания и половой принадлежности. Использовались реагенты фирмы «BIOSOURCE» (Бельгия). Исследования выполнялись на иммуноферментном анализаторе «Eliza-3000» (США – Германия). В сыворотке крови больных выявлены изменения уровня стромелизина-1, которые увеличиваются по мере продолжительности заболевания. Установлено, что активность ММР-3 в группе здоровых мужчин достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группе здоровых женщин. Полученные данные могут быть использованы при оценке активности воспалительного процесса у больных на различной стадии развития ревматоидного артрита.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, протеолиз, матриксная металлопротеиназа-3 (ММР-3, стромелизин-1)

The activity of matrix metalloproteinase-3 (stromelizin-1) in the serum of patients with rheumatoid arthritis

А.А.Turna¹, R.T.Toguzov², R.S.Saykovskiy¹

¹Clinical Hospital № 83 of Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow
(Chief Doctor – Prof. O.P.Kuzovlev);

²Russian State Medical University, Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Doctors' Improvement Faculty, Moscow
(Head of the Department – R.T.Toguzov)

The aim of this study was to examine the levels of matrix metalloproteinase (MMP-3, stromelizin-1) in the serum of patients with early rheumatoid arthritis, taking into account the duration of illness and sex. There were used reagents of «BIOSOURCE» company (Belgium) and the investigation was performed on the immunoferment analyzer «Eliza-3000» (the U.S.A. and Germany). In the blood serum of patients changes in the level of stromelizin-1 which increased with the duration of the disease were detected. It was found that the activity of MMP-3 in the group of healthy men was higher ($p < 0,05$) than in the group of healthy women. The data obtained can be used in assessing the activity of inflammation in patients at varying stages of the development of rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis, proteolysis, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3, stromelinsins-1)

В настоящее время ревматоидный артрит (РА) считается одним из наиболее частых хронических системных воспалительных заболеваний соединительной ткани с преимущественным поражением периферических (синовиальных) суставов по типу симметричного прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита [1, 2]. Воспаление с максимальной ин-

тенсивностью затрагивает синовиальную оболочку суставов, приводя к гиперплазии и быстрому увеличению объема синовиальной ткани; именно развитие прогрессирующего синовиального воспаления отличает РА от других воспалительных заболеваний человека [3]. Основные клинические проявления РА приводят к снижению качества жизни и ранней инвалидности больных, фактически 10,0% больных в течение первых двух лет заболевания становятся инвалидами [4, 5]. В настоящее время установлено, что женщины болеют в 2,5–3 раза чаще мужчин, преимущественно в возрасте 35–80 лет [6].

Открытие процессов протеолиза в регуляции жизнедеятельности организма является одним из самых значительных достижений биохимии, которые следует рассматривать как особую форму биологического контроля, занимающего центральное место в реализации основных биохимических

Для корреспонденции:

Турна Алия Абдурахмановна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ИПК ФМБА России, врач клинической лабораторной диагностики клинко-диагностической лаборатории Клинической больницы № 83 Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 115582, Москва, Ореховый бульвар, 28

Телефон: (495) 395-6387

E-mail: turna2605@yandex.ru

Статья поступила 16.04.2008 г., принята к печати 25.02.2009 г.

процессов [7]. Протеазы – одни из основных медиаторов повреждения внеклеточного матрикса в процессе воспаления. Согласно классификации они представлены четырьмя основными классами: сериновые, цистеиновые (тиоловые, сульфгидрильные), аспартатные (карбоксильные) и металлопротеиназы. К настоящему времени известно около 30 матричных металлопротеиназ (ММП) [8]. Последние получили своё название за наличие в активном центре ионов металлов, как правило, цинка и кальция. Протеиназы локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, плазматических мембранах, митохондриях и цитоплазме фибробластов, эпителиальных клетках, клетках плазмы крови и других тканях [9]. ММП принадлежит существенная роль в развитии широкого спектра физиологических процессов, включая эмбриогенез [10], ангиогенез [11], а также в формировании патологических процессов, таких как воспаление, артрит и т.д. [12, 13]. Фундаментальная роль ММП и их физиологических тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP) заключается в регуляции процессов деградации межклеточных белков, компонентов базальной мембраны, коллагена различных типов, эластина и т.д. Нарушение устойчивости системы протеазы – антипротеазы активирует изменение контактного торможения клеток при их миграции в ходе гистогенеза, воспалительной инфильтрации и метастазировании опухолей [14].

Матричная металлопротеиназа-3 (ММП-3, стромелизин-1) относится к подсемейству стромелизинов, секретируется как профермент массой 57 kDa и *in vivo* активируется путём ограниченного протеолиза тканевыми и плазматическими эндопептидазами. Первичная структура стромелизина-1 синтезируется в форме пробелка и состоит из 477 аминокислотных остатков. Активность стромелизина-1 регулируется на уровне транскрипции цитокинами (факторами роста) [15]. ММП3 представляет собой «скрытую» металлопротеиназу, главным образом вырабатываемую клетками соединительной ткани, активируется через проколлагеназу-1 и деградирует компоненты экстрацеллюлярной матрицы протеогликан, фибронектин, желатин и различные типы коллагенов [16]. Матричная металлопротеиназа-3 имеет широкий диапазон субстратной специфичности и обладает способностью активировать другие ММП, что суммарно вызывает деградацию большинства компонентов экстрацеллюлярного матрикса и прогрессирование заболевания [17].

Нарушение экспрессии и активации ММП играет основную роль при развитии большого числа патологических состояний, таких как РА, опухолевые инвазии, болезнь Альцгеймера [18,19]. Поэтому исследование ММП-3 в сыворотке крови больных РА с различной продолжительностью заболевания может установить зависимость между степенью активности стромелизина-1 и продолжительностью заболевания.

Целью исследования было изучение уровня ММП-3 в сыворотке крови больных ревматоидным артритом с учётом продолжительности заболевания и полового признака.

Пациенты и методы

В исследование последовательно включены 60 пациентов с диагнозом: «РА I и II стадии заболевания, I и II степени активности», ранее не получавшие базисной тера-

пии. Диагноз РА установлен согласно критериям АРА. Продолжительность заболевания составляла от 4 мес до 1,5 года. Из исследования исключены женщины и мужчины, больные РА, с высокой степенью активности, ранее получавшие базисную терапию, а также с тяжёлыми сопутствующими заболеваниями. Согласно критериям включения и исключения, основная группа представлена 43 женщинами (71,7%), средний возраст которых составил $40,5 \pm 6,5$ года, и 17 мужчинами (28,3%), средний возраст – 47 ± 6 лет. Средний возраст всей группы исследования составил $43,8 \pm 6,2$ года.

В контрольную группу включены 40 человек, из них 29 женщин (72,5%) и 11 мужчин (27,5%), практически здоровые. Следует отметить, что столь многочисленная группа контроля отобрана сознательно, так как рекомендуемые значения нормы, на наш взгляд, имели широкий диапазон. Средний возраст женщин составил $38,5 \pm 4,0$ года, в группе мужчин – $46,5 \pm 5,5$ года. Средний возраст контрольной группы соответствовал $42,5 \pm 4,8$ года. Таким образом, основная и контрольная группы сопоставимы по полу и возрасту. Кровь забиралась из локтевой вены утром, строго натощак, до начала базисной терапии, исследования выполнялись в первые дни госпитализации.

Принцип метода определения стромелизина-1 основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич». Микропланшет покрыт специфическими моноклональными антителами к hMMP-3. В ходе реакции в лунки планшета добавляются стандарты, контроли и исследуемые образцы. Затем вносятся вторые биотинилированные антитела против hMMP-3. Образованию цветного комплекса предшествуют первая и вторая инкубации. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации hMMP-3, присутствующей в образце. Работа выполнялась на иммуноферментном анализаторе «Eliza-3000» (США – Германия) с использованием реагентов фирмы «BIOSOURCE» (Бельгия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи пакета прикладных программ Excel и Statistica 6.0. Результаты представлены как среднее $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. Достоверность различий средних величин оцениваемых показателей у пациентов рассчитывали по непарному t-критерию Стьюдента, статистически значимым считали значение $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных исследований активности стромелизина-1 в контрольной группе и анализ полученных значений выявили существенные достоверные различия в группе здоровых женщин и здоровых мужчин.

Активность стромелизина-1 в сыворотке крови здоровых мужчин на 71,6% выше ($p < 0,05$), чем в группе здоровых женщин. Вероятно, полученные результаты следует расценивать как основание к установлению не только средних значений в контрольной группе, но и как нормативные значения с учетом половых признаков. При этом среднее значение активности стромелизина-1 в контрольной группе ($n = 40$) составляет $12,4 \pm 0,10$ нг/мл.

При анализе полученных результатов активности стромелизина-1 в сыворотке крови больных РА установлено, что в группе больных активность в 3,6 раза выше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе.

Активность стромелизина-1 в общей группе больных с продолжительностью заболевания от 4 мес. до 1,5 года составила $44,7 \pm 0,25$ нг/мл, в то время как в группе контроля – $12,4 \pm 0,1$ нг/мл. При отдельном исследовании стромелизина-1 в группе больных женщин и мужчин активность составила соответственно $43,9 \pm 0,21$ нг/мл и $45,5 \pm 0,29$ нг/мл, при этом достоверных различий между группами не выявлено.

В результате выполненных исследований установлено, что концентрация стромелизина-1 в группе пациентов с продолжительностью заболевания до 18 мес. выше ($p < 0,05$), чем в группе с продолжительностью заболевания до 6 мес, в то же время активность стромелизина-1 в сыворотке крови пациентов с продолжительностью заболевания до 18 мес на 44,7% выше ($p < 0,05$), чем у пациентов с продолжительностью заболевания до 6 мес., и на 26,7% выше ($p < 0,05$) по сравнению с активностью в сыворотке крови пациентов с продолжительностью заболевания до 12 мес. Можно видеть, что активность стромелизина-1 в сыворотке крови больных РА с различной продолжительностью заболевания и не получавших базисной терапии прямо пропорциональна длительности заболевания. Анализ полученных результатов существенно расширяет представления о патогенетических механизмах воспаления на различных этапах развития РА.

В настоящее время данная работа продолжается и проводится исследование активности стромелизина-1 во взаимосвязи с клиническими признаками (группа больных с системными проявлениями) и серопозитивным вариантом РА.

Таким образом, полученные нами результаты исследования свидетельствуют о повышении активности стромелизина-1 у больных РА, которое связано с длительностью заболевания. Следовательно, стромелизин-1 можно рекомендовать как новый ранний маркер с целью определения степени активности воспаления у ревматологических больных. Вместе с тем, более глубокое изучение активности матриксных металлопротеиназ позволит раскрыть отдельные механизмы патогенеза, расширить спектр диагностических возможностей, открыть новые перспективы в прогнозировании течения и терапии аутоиммунных заболеваний.

Выводы

1. Установлено, что активность стромелизина-1 в сыворотке крови здоровых женщин достоверно ниже, чем в сыворотке крови здоровых мужчин.

2. В группах женщин и мужчин, больных ревматоидным артритом, уровни активности стромелизина-1 не имеют достоверных различий.

3. В сыворотке крови больных ревматоидным артритом активность стромелизина-1 значительно выше, чем в сыворотке крови здоровых лиц, и прямо пропорционально связана с длительностью заболевания.

Литература

1. Насонова В.А., Бунчук Н.В. Руководство по внутренним болезням. Ревматические болезни. – М: Медицина, 1997. – 520 с.
2. McCarty D.J. Rheumatoid arthritis // *Curr. Practice of Medicine*. – 2000. – V.2. – P.11–13.
3. Harris E.D. Etiology and pathogenesis of RA. – In: *Textbook of Rheumatology* / Eds: W.N.Kelly, E.D.Harris, Sh.Ruddy, S.B.Sledge. – Philadelphia, 1993. – P.833–874.
4. Насонова В.А., Фоломеева О.М. Медико-социальные проблемы хронических заболеваний суставов и позвоночника // *Тер. арх.* – 2000. – №5. – С.5–8.
5. Насонов Е.Л. Противовоспалительная терапия ревматических болезней. – М.: М-Сити, 1996. – 345 с.
6. Насонова В.А., Бунчук Н.В. Руководство по внутренним болезням. Ревматические болезни. – М: Медицина, 1997. – 270 с.
7. Яровая Г.А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. III. Физиологическая роль и биохимические механизмы протеолитической деградации белков // *Лаб. мед.* – 2003. – №6. – С.48–54.
8. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // *Биоорганич. химия*. – 1998. – №24. – С.217–226.
9. Яровая Г.А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. II. Распространение, классификация и основы механизма действия протеаз // *Лаб. мед.* – 2001. – №4. – С.75–80.
10. Vu T.H., Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology // *Genes. Dev.* – 2000. – V.14. – P.2123–2133.
11. Roy R., Zhang B., Moses M.A. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis // *Exp. Cell. Res.* – 2006. – V.312. – P.608–622.
12. Mohammed F.F., Smookler D.S. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – V.62. – №2. – P.1143–1147.
13. Ahrens D., Koch A.E., Pope R.M. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kD gelatinase B) in human rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* – 1996. – V.39. – P.1576–1587.
14. Tchvetverikov I., Lard L.R., DeGroot J. et al. Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis // *Ann. Rheumat. Dis.* – 2003. – V.62. – P.1094–1099.
15. Quinones S., Buttice G., Kurkinen M. et al. Promoter elements in the transcriptional activation of the human stromelysin-1 gene by the inflammatory cytokine, interleukin 1 // *Biochem. J.* – 1994. – V.302. – P.471–477.
16. Firestein G.S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. – In: *Textbook of rheumatology* / Eds: W.N.Kelley, E.D.Harris, S.R.Ruddy, G.B.Sledge. – Philadelphia: W.B.Saunders, 1997. – P.851–897.
17. Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K. et al. Matrix metalloproteinase: a review // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* – 1993. – V.4. – P.197–250.
18. Dorr S., Lechtenbohrer N., Rau R. et al. Association of a specific haplotype across the genes MMP1 and MMP3 with radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V.6. – №3. – P.199–207.
19. Freije J.M., Diez-Iltza I., Balbin M. et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V.269. – №24. – P.16766–16773.

Информация об авторах:

Тогузов Руслан Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
 Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
 Телефон: (495) 434-5523
 E-mail: rtt@rsmu.ru

Сайковский Роман Станиславович, кандидат медицинских наук, заведующий ревматологическим отделением Клинической больницы №83 Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 115582, Москва, Ореховый бульвар, 28
 Телефон: (495) 391-6194