

В.О. Туманський, І.С. Коваленко

Імуногістохімічні особливості експресії матриксної металопротеїнази 9 та її тканинного інгібітора ТІМР-1 при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: хронічний фіброзно-індуративний панкреатит, матриксна металопротеїназа-9, тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ-1.

За допомогою імуногістохімічних методик встановлено, що у хворих на хронічний фіброзно-індуративний панкреатит з різними гістотопографічними різновидами фіброзу підшлункової залози експресія матриксної металопротеїнази 9 визначається у значній кількості панкреатичних зірчастих клітин, у нечисленних ацинарних клітинах і в епітеліальних клітинах протоків, а також у макрофагах імуноклітинних інфільтратів; експресія ТІМР-1 виявляється в зонах фіброзу в панкреатичних зірчастих клітинах і в макрофагах імуноклітинних інфільтратів.

Иммунногистохимические особенности экспрессии матриксной металлопротеиназы 9 и ее тканевого ингибитора ТІМР-1 при хроническом фиброзно-индуративном панкреатите

В.А. Туманский, И.С. Коваленко

Иммунногистохимическими методиками установлено, что у больных хроническим фиброзно-индуративным панкреатитом с разными гистотопографическими разновидностями фиброза поджелудочной железы экспрессия матриксной металлопротеиназы 9 определяется в значительном количестве панкреатических звездчатых клеток, в немногочисленных ацинарных клетках и эпителиальных клетках протоков, а также в макрофагах иммунноклеточных инфильтратов; экспрессия ТІМР-1 определяется в зонах фиброза в панкреатических звездчатых клетках и в макрофагах иммунноклеточных инфильтратов.

Ключевые слова: хронический фиброзно-индуративный панкреатит, матриксная металлопротеиназа-9, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1.

Патология. – 2012. – №1 (24). – С. 74–76

Immunohistochemical features of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor TIMP-1 expression in chronic fibrous-indurative pancreatitis

V.A. Tumanskiy, I.S. Kovalenko

Using immunohistochemical methods matrix metalloproteinase-9 expression was found in most of the pancreatic stellate cells, in some acinar cells, epithelial cells of ducts as well as in macrophages of immune infiltrates in patients with chronic fibrous-indurative pancreatitis with different histotopographic forms of pancreas fibrosis. The expression of TIMP-1 was found in pancreatic stellate cells of the fibrosis areas and in macrophages of immune infiltrates.

Key words: chronic fibrous-indurative pancreatitis, pancreatic fibrosis, matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1.

Pathologia. 2012; №1 (24): 74–76

Фіброз підшлункової залози (ПЗ) – одна з головних клініко-патоморфологічних особливостей хронічного панкреатиту. Сьогодні відомо, що при фіброзі підшлункової залози основними продуцентами надлишку фібрилярного колагену і таких молекул позаклітинного матриксу (ПКМ), як фібронектин і ламінін, є активовані панкреатичні зірчасті клітини (ПЗК) [1,3]. ПКМ відіграє центральну роль у підтримці нормальної архітекtonіки тканини залози, його синтез, секреція та деградація динамічно змінюються в процесі тканинного ремоделювання. Багатьма дослідженнями хронічного вірусного гепатиту визначено, що в основі фіброзу органа лежить дисбаланс між синтезом надлишку компонентів ПКМ клітинами-продуцентами та уповільненою деградацією протеїнів ПКМ [4] цинк-залежними ензимами родини матриксних металопротеїназ (ММР). Ця родина включає 25 цинк-залежних ензимів, більшість з яких секретується як неактивні (латентні) проферменти. Активність ММР може бути врегульована на рівнях транскрипції, активації проензимів або гальмуванням ензимів тканинними

інгібіторами металопротеїназ (ТІМР) 4 підтипів (ТІМР-1 – ТІМР-4). ТІМР-1 інгібує активність кількох ММР (ММР-1, 3, 8, 9, 10, 13 та 18), а ТІМР-2 відіграє важливу роль у гальмуванні лише ММР-2 [5–7]. Порушення балансу експресії між ММР та їх тканинними інгібіторами відбувається при хронічних запальних та аутоімунних процесах, у тому числі, при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті. При хронічному панкреатиті збільшується секреція протеїназ (насамперед ММР-9) зірчастими клітинами під дією TGF- β 1, IL-6, етанолу й ацетальдегіду, що призводить до збільшення деградації базальних мембран і сприяє відкладенню фібрилярного колагену з подальшим розвитком фіброзу залози [7]. У регуляції фіброгенезу та фібролізу ПЗ особливо важливі ММР-2 і ММР-9. Вони частково деградують колагени I та III типів і колаген IV типу базальних мембран. Особливості деградації компонентів ПКМ металопротеїназами та їх взаємовідносини з тканинними інгібіторами ТІМР при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті поки що вивчено недостатньо.

Мета роботи

Визначення особливостей експресії MMP-9 і TIMP-1 у хворих з фіброзом ПЗ при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті.

Матеріали і методи дослідження

Виконано комплексне гістологічне, гістохімічне та імуногістохімічне дослідження тканини підшлункової залози, отриманої при інтраопераційних інцизійних панкреатобіопсіях у 15 хворих на хронічний фіброзно-індуративний панкреатит віком від 32 до 57 років. У групі умовного контролю досліджено 5 біоптатів ПЗ без ознак фіброзу. Біопсійний матеріал ПЗ фіксували в забуференому 10% формаліні, заливали в парафін, на ротатійному мікротомі HM 3600 («MICROM», Німеччина) виготовляли серійні зрізи для гістологічних, гістохімічних та імуногістохімічних досліджень. Для оглядової світлової мікроскопії та визначення виразності фіброзу гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, за ван Гізон і триколюровим методом Масона. Для імуногістохімічного дослідження в депарафінованих зрізах ПЗ проводили демаскування антигенів у цитратному буфері на водяній бані протягом 20 хвилин, непрямим імунопероксидазним методом визначали експресію MMP-9 і TIMP-1 з використанням поліклональних антитіл *Rb a-Hu MMP-9 (92kDa Collagenase IV)* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США), моноклональних антитіл *Mo a-Hu TIMP-1 Ab-2, Clone 102D1* (фірми «Thermo Fisher Scientific Inc.», США) і системи візуалізації DAKO En Vision+ (Данія) з діамінобензидином. Зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра. Оцінку експресії MMP-9 і TIMP-1 у підшлунковій залозі проводили в мікроскопі Axioplan 2 («Carl Zeiss», Німеччина).

Результати та їх обговорення

При імуногістохімічному дослідженні ПЗ групи умовного контролю виявлено слабку дифузну, дрібногранулярну цитоплазматичну експресію MMP-9 у поодиноких периацинарних ПЗК, ацинарних і епітеліальних протокових клітинах. Експресію TIMP-1 спостерігали у вигляді дрібних гранул у цитоплазмі окремих ПЗК. Можливо, саме така характеристика експресії матриксних протеїназ та їх тканинних інгібіторів відображає збалансований стан ПКМ, при якому відсутнє патологічне депонування колагену з подальшим розвитком фіброзу. Згідно до відомостей спеціалізованої літератури, у нормальній тканині ПЗ слабка експресія MMP-9 (що деградує колаген I, III, IV, V типів, фібрoneктин тощо), а також її інгібітора TIMP-1 відзначається не тільки у ПЗК і в ендотеліальних клітинах, але й може також виявлятися у цитоплазмі ацинарних клітин, у макрофагах, клітинах нервових стовбурів і цитоплазмі поодиноких клітин епітелію дрібних протоків [7].

У гістологічних зрізах тканини ПЗ хворих на хронічний фіброзно-індуративний панкреатит, забарвлених гематоксиліном та еозином, за ван Гізон і триколюровим методом Масона виділено 3 гістотопографічні різновиди фіброзу ПЗ: 1 – перидуктальний та інтерлобулярний фіброз підшлункової залози (7 хворих); 2 – перидуктальний, інтра- та інтерлобулярний фіброз з вогнищами імуноклітинної інфільтрації (3 хворих); 3 – перилобулярно-мікронодулярний (цирозоподібний)

панкреатичний фіброз (5 хворих). У групі умовного контролю панкреатичний фіброз відсутній.

При імуногістохімічному дослідженні панкреатобіоптатів першої групи пацієнтів з перидуктальним та інтерлобулярним фіброзом залози виявлено дифузну цитоплазматичну експресію MMP-9 у значно більшій кількості периацинарних ПЗК, ацинарних і епітеліальних протокових клітин у порівнянні з групою умовного контролю (рис. 1, кольор. вкладка 3). Помірна позитивна експресія MMP-9 у цих клітинах визначалась у 72% хворих, слабка експресія – у 28%. Крім цього, у 42% пацієнтів визначалась слабка позитивна експресія у поодиноких зірчастих клітинах, розташованих у зонах перидуктального й інтерлобулярного фіброзу, у 58% хворих цієї групи експресія MMP-9 в осередках фіброзу не визначалась. Водночас, у 100% хворих цієї групи визначено негативну експресію TIMP-1 у ПЗ.

При імуногістохімічному дослідженні зрізів ПЗ другої групи пацієнтів з фіброзом та імуноклітинною інфільтрацією стромі у 100% досліджень виявлено помірну дифузну та дрібногранулярну цитоплазматичну експресію MMP-9 не тільки у значній кількості периацинарних зірчастих клітин, але й у деяких клітинах епітелію протоків, ацинарних і ендотеліальних клітинах, у макрофагах імуноклітинних інфільтратів (рис. 2, кольор. вкладка 3). Слабка позитивна експресія TIMP-1 (рис. 3, кольор. вкладка 3) визначалась у поодиноких макрофагах імуноклітинних інфільтратів і ПЗК. Нещодавні дослідження зафіксували, що за наявності імуноклітинних інфільтратів у стромі ПЗ спостерігають значне накопичення протеїнів ПКМ, у першу чергу, навколо скупчень імунних клітин, а також в осередках поодинокі розташованих імунних клітин [8]. Надлишок синтезу компонентів ПКМ активованими панкреатичними зірчастими клітинами відбувається під впливом стимулюючих факторів (PDGF, FGF, TGF- β , IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α тощо), що вивільняють імунні клітини [9].

При імуногістохімічному дослідженні панкреатобіоптатів пацієнтів третьої групи у 60% хворих виявлено помірну позитивну експресію MMP-9, у 40% хворих – виразну експресію MMP-9 у вигляді дифузної та дрібногранулярної імунореактивного забарвлення цитоплазми ацинарних, епітеліальних протокових і периацинарних зірчастих клітин ПЗ. У зонах перилобулярного панкреатичного фіброзу експресія MMP-9 (рис. 4, кольор. вкладка 3) була помірною у 40% хворих, у 60% хворих вона не визначалась. Слабка фокальна дрібногранулярна цитоплазматична експресія TIMP-1 у поодиноких зірчастих клітинах ПЗ виявлялась у 40% пацієнтів цієї групи.

Отже, результати дослідження показали, що ПЗК здатні синтезувати та секретувати матриксну металопротеїназу MMP-9, яка руйнує ПКМ, та її тканинний інгібітор TIMP-1, тобто підтвердили концепцію, що ці клітини відіграють важливу роль в обігу позаклітинного матриксу [4,6]. Отримані результати демонструють, що ПЗК секретують MMP-9 і TIMP-1 у тканині нормальної ПЗ і відіграють важливу роль у підтримці нормального ПКМ, регулюючи як його синтез, так і деградацію. При фіброзі підшлункової залози під впливом прозапальних

цитокінів збільшується секреція MMP-9 насамперед ПЗК, а також ацинарними й епітеліальними протоковими клітинами. Згідно до даних спеціалізованої літератури, це збільшує деградацію колагенів базальних мембран, що, у свою чергу, може призвести до депонування надлишку фібрилярного колагену і подальшого розвитку фіброзу – цирозу ПЗ [5–7].

Згідно до даних окремих джерел наукової літератури, експресія MMP-9 визначається насамперед у ПЗК, що знаходяться у периацinarних просторах і в осередках фіброзу [7,10]. Визначено слабку позитивну експресію MMP-9 у поодиноких зірчастих клітинах осередків панкреатичного фіброзу лише у 42% пацієнтів першої групи та у 40% хворих третьої групи, що, можливо, свідчить про стабілізацію фіброзу зі зменшенням кількості активованих ПЗК або про повне заміщення паренхіми залози зрілою сполучною тканиною. При хронічному панкреатиті з імуноклітинною інфільтрацією виявлено збільшення експресії MMP-9. Визначалась помірна дифузна та дрібногранулярна цитоплазматична експресія MMP-9 не тільки у ПЗК, але й у макрофагах у вогнищах імуноклітинних інфільтратів. При дослідженні експресії TIMP-1 визначено, що, на відміну від норми, у хворих цієї групи відбувалось незначне збільшення слабкої фокальної дрібногранулярної цитоплазматичної експресії TIMP-1 у поодиноких ПЗК зон фіброзу та в макрофагах імуноклітинних інфільтратів. Відомо, що при хронічному панкреатиті підвищення продукції TIMP-1 панкреатичними зірчастими клітинами сприяє фіброзу шляхом запобігання деградації колагену, тому його експресія виявляється обмежено в ділянках наявного фіброзу [10].

Висновки

1. У підшлунковій залозі без панкреатичного фіброзу визначається слабка експресія MMP-9 окремими периацinarними ПЗК, ацинарними клітинами та епітеліальними протоковими клітинами, а також слабка експресія TIMP-1 окремими ПЗК, що морфологічно віддзеркалює збалансований стан ПМК.

2. При хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті з фіброзом підшлункової залози експресія MMP-9 визначається у значній кількості панкреатичних зірчастих клітин, у нечисленних ацинарних клітинах і в епітеліальних клітинах протоків, а також у макрофагах імуноклітинних інфільтратів; експресія TIMP-1 виявляється в зонах фіброзу в панкреатичних зірчастих клітинах і макрофагах імуноклітинних інфільтратів.

3. У хворих на хронічний фіброзно-індуративний панкреатит з перидуктальним та інтерлобулярним фіброзом залози визначається помірна (у 72% хворих) та слабка (у 28% пацієнтів) дифузна цитоплазматична експресія MMP-9 у периацinarних ПЗК, ацинарних і епітеліальних протокових клітинах, а також слабка експресія у поодиноких зірчастих клітинах зон фіброзу (у 58%

хворих). У 100% пацієнтів з фіброзом та імуноклітинною інфільтрацією строми виявляється помірна дифузна та дрібногранулярна цитоплазматична експресія MMP-9 у периацinarних зірчастих клітинах, клітинах епітелію протоків, ацинарних і ендотеліальних клітинах і в макрофагах імуноклітинних інфільтратів. У пацієнтів з цирозоподібним панкреатичним фіброзом ПЗ визначається помірна (у 60% хворих) і виразна (у 40% пацієнтів) експресія MMP-9 ацинарними, епітеліальними протоковими та периацinarними зірчастими клітинами ПЗ, а також помірна цитоплазматична експресія ПЗК в осередках фіброзу.

4. При хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті з фіброзом підшлункової залози визначається слабка дрібногранулярна цитоплазматична експресія TIMP-1 у поодиноких зірчастих клітинах у 40% хворих з цирозоподібним фіброзом ПЗ, а також у макрофагах імуноклітинних інфільтратів у 20% хворих з фіброзом та імуноклітинною інфільтрацією строми підшлункової залози. В інших випадках експресія TIMP-1 у ПЗ негативна.

Список літератури

1. Casini A. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis / Casini A., Galli A., Pignatola P., et al. // *J Pathol.* – 2000. – №192. – P. 81–89.
2. Vogelmann R. Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF- β 1 transgenic mouse model / Vogelmann R., Ruf D., Wagner M., et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2001. – №280. – P. 164–172.
3. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function / Jaster R. // *Mol. Cancer.* – 2004. – Vol. 3. – P. 26–32.
4. Benyon R.C. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells / Benyon R.C., Arthur M.J.P. // *Semin Liver Dis.* – 2001. – №21. – P. 373–384.
5. Leco K.J. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues / Leco K.J., et al. // *FEBS Letters.* – 1997. – Vol. 401. – P. 213–217.
6. McCawley L.J. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! / McCawley L.J., Matrisian L.M. // *Curr Opin. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 534–546.
7. Phillips P. A. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover / Phillips P. A., McCarroll J.A., Park S., et al. // *Gut.* – 2003. – №52 (2). – P. 275–282.
8. Michalski Ch. W. Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis / Michalski Ch.W., Gorbachevski A., Erkan M.J. // *Transl Med.* – 2007. – Vol. 5. – P. 63–70.
9. Apte M.V. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis / Apte M.V., et al. // *Gut.* – 1999. – Vol. 44. – P. 534–541.
10. Shek F.W.-T. Expression of Transforming Growth Factor- β 1 by Pancreatic Stellate Cells and Its Implications for Matrix Secretion and Turnover in Chronic Pancreatitis / Shek F.W.-T., Benyon R.Ch., Walker F.M. // *Am J Pathol.* – 2002. – Vol. 160(5). – P. 1787–1798.

Відомості про авторів:

Туманський В.О., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права, проректор з наукової роботи ЗДМУ.

Коваленко І.С., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

Адреса для листування:

Туманський Валерій Олексійович. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ. Тел.: (061) 233 50 93.

Надійшла в редакцію 21.03.2012 р.

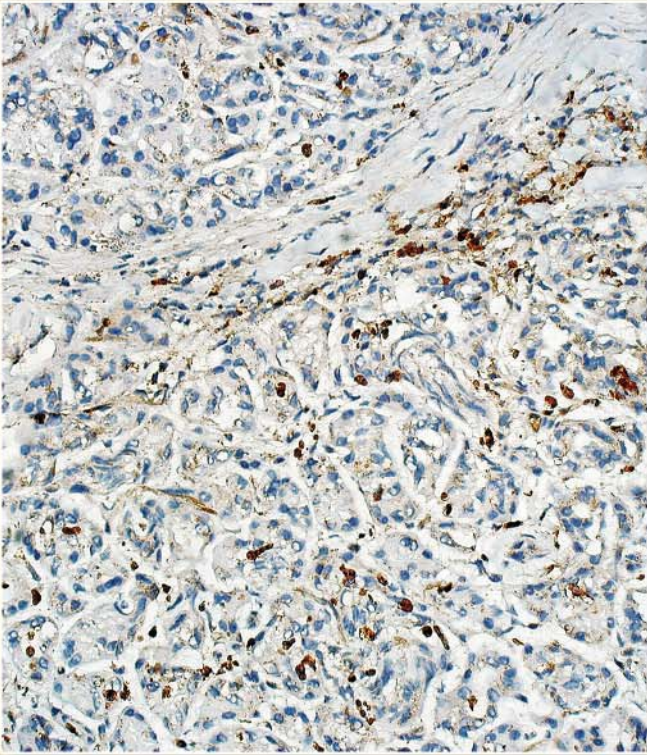


Рис. 1. Експресія MMP-9 в ацинарних клітинах і в периацинарних зірчастих клітинах підшлункової залози. Anti-MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

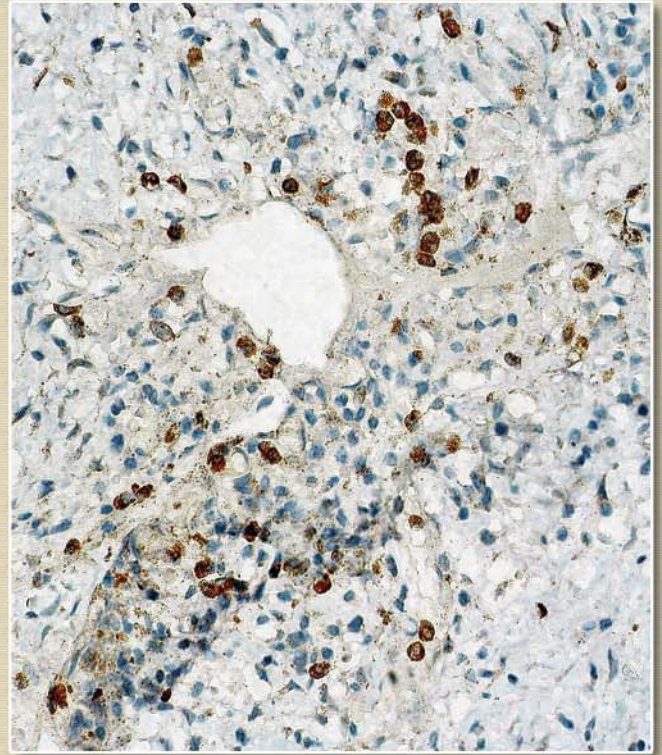


Рис. 2. Дрібногранулярна цитоплазматична експресія MMP-9 у макрофагах імуноклітинних інфільтратів. Anti-MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

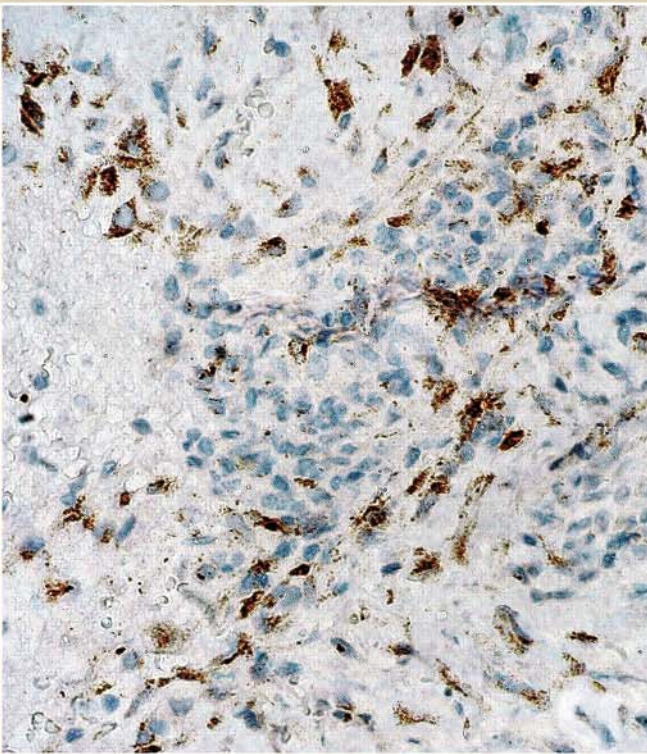


Рис. 3. Дрібногранулярна цитоплазматична експресія TIMP-1 у поодиноких макрофагах імуноклітинних інфільтратів і в зірчастих клітинах ПЗ. Anti-TIMP-1, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

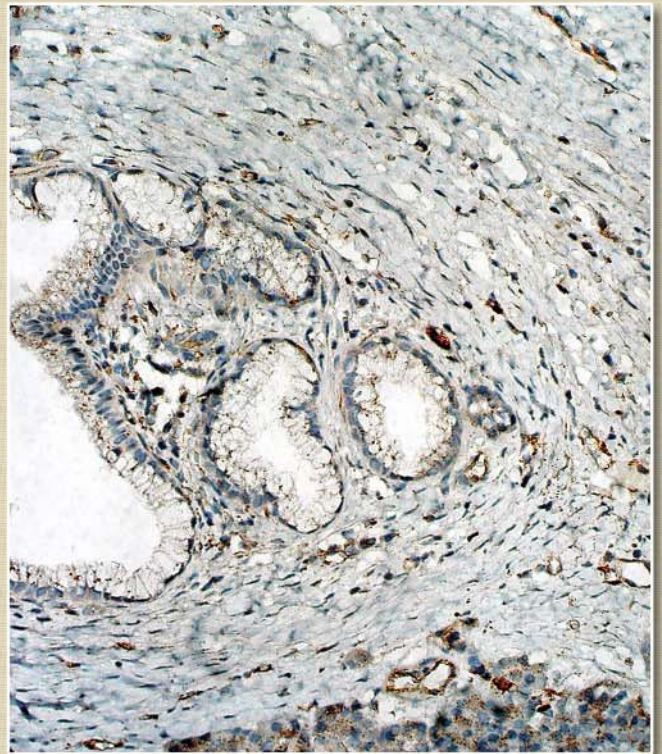


Рис. 4. Слабка експресія MMP-9 ацинарними, епітеліальними протоковими клітинами та поодинокими панкреатичними зірчастими клітинами в зонах панкреатичного фіброзу. Anti-MMP-9, система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 800.

(Рис. 1–4 до статті В.О. Туманського, І.С. Коваленко «Імуногістохімічні особливості експресії матричної металопротеїнази 9 і її тканинного інгібітора TIMP-1 при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті», с. 74–76)