

Особенности экспрессии тканевых ингибиторов металлопротеиназ-1, -2 при патологии периодонта

Казеко Л. А.¹, Захарова В. А.¹, Бенеш Ю. Д.², Черствый Е. Д.¹

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «11-я городская клиническая стоматологическая поликлиника», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Нарушение регуляции активности матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов играет важную роль в развитии и прогрессировании воспаления периодонта. Проанализирован биопсийный материал десен 67 пациентов. Экспрессия TIMP1 и TIMP2 как в эпителии, так и в строме выявлялась у пациентов с различными формами периодонтита. Увеличение экспрессии TIMP1 и TIMP2 с нарушением регуляции экспрессии MMPs подтверждает значение TIMPs в патогенезе воспаления в тканях периодонта и может объяснить медленно прогрессирующее и агрессивное течение с выраженной деструкцией периодонтальных тканей.

Ключевые слова: периодонтит, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ, иммуногистохимия, экспрессия.

Введение. Повышенная экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММП) при болезнях периодонта имеет неоспоримые доказательства и считается одной из причин воспалительно-деструктивных изменений в тканях периодонта. В физиологических условиях матриксные металлопротеиназы секретируются из клетки в очень незначительном количестве. Экспрессия ММП в тканях регулируется



скоростью их синтеза и содержанием их главных эндогенных ингибиторов — тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМР). ТИМР — белки, подавляющие активность ММР и играющие важную роль в их регуляции, эффективно контролирующая расщепление компонентов внеклеточного матрикса, вовлеченных в различные биологические и патологические процессы [1].

ТИМР объединены в семейство, состоящее из четырех гомогенных ферментов с приблизительно сопоставимым потенциалом. В последовательности генов четырех ТИМР не выявлено большого сходства, что говорит об уникальной биологической роли каждого из них. ТИМР связываются с активным центром ММР в соотношении 1:1, блокируя доступ к субстрату и снижают активность ММР [1, 2].

Как правило, все ТИМР способны ингибировать все известные ММР. Они не специфичны для каждого типа ММР, хотя наблюдается определенная предпочтительность связывания. Например, ТИМР1 является сильным ингибитором многих ММР, за исключением некоторых мембранных ММР, включая ММР14, 15, 16, 19 и 24 [3]. ТИМР1 и ТИМР3 ассоциируются с латентным или про-ММР9, в то время как ТИМР2, 3 и 4 способны взаимодействовать с про-ММР2 [4].

Все известные ТИМР состоят из двух, связанных между собой шестью дисульфидными связями доменов: маленького С-концевого и большого N-концевого. Последний, который представляет собой остаток Cys, связывается с активным Zn²⁺-связывающим центром ММР в эквимольном соотношении, вследствие чего и наблюдается ингибирование. С-концевой домен задействован в активации про ММР [1].

В здоровых тканях периодонта уровни ТИМР обычно выше, чем при воспалительно-деструктивных процессах. При выраженных клинических признаках периодонтита концентрация активных ММР высокая. В десневой жидкости и в собственных тканях десны уровни ММР1, ММР2, ММР3 и ММР9 значительно повышены, тогда как ТИМР1 и ТИМР2 значительно снижены [5]. Бактериальное воспаление ведет к каскаду экспрессии и активации ММР различными типами клеток, что способствует деградации внеклеточного матрикса. Считается, что дисбаланс между ММР и ТИМР вызывает деградацию внеклеточного матрикса, базальной мембраны и альвеолярной кости и таким образом инициирует болезни периодонта [6]. Хотя основной функцией ТИМР является ингибирование ММР, они могут принимать участие в транспортировке и стабилизации ММР. Увеличение экспрессии ММР и снижение уровней ТИМР инициируют деградацию коллагена в соединительной ткани и альвеолярной кости. Возможно, избыточное количество продуктов распада коллагена в десневой жидкости и слюне может быть использовано для прогнозирования потери альвеолярной кости при периодонтите [6]. В некоторых случаях появление ММР и ТИМР в биологических жидкостях, таких как слюна, десневая жидкость или сыворотка крови, дает дополнительную информацию о прогрессировании заболевания.

Разрушение периодонтальной связки и альвеолярной кости при периодонтите отражает относительную сверхэкспрессию ММР по отношению к ТИМР. Резорбция тканей может быть уменьшена, если этот баланс будет восстановлен. Ингибирование экспрессии или активности ММР или увеличение экспрессии ТИМР может уменьшить разрушение тканей при периодонтите.

В исследовании D. M. Isaza-Guzma, с соавт. (2011) установлено, что тяжесть периодонтита связана с высокими уровнями фактической активности металлопротеиназ, включая ММР9 и ММР8, а также доминирующей экспрессией ММР9 над ТИМР1 в слюне. В этом исследовании выявлена статистически достоверная корреляция между уровнями биомаркеров (ММР9, ТИМР1 и соотношение ММР9/ТИМР1) и клиническими параметрами. Также установлено, что ММР8 может активироваться другими ММР и ингибироваться ТИМР1 и ТИМР2 [7].

Так, A. Fenol с соавт. (2014) предположил о возможности использования ТИМР1 в качестве маркера для выявления риска периодонтита, а также для прогнозирования активности воспалительно-деструктивных процессов в тканях периодонта.

Цель работы — установление особенностей экспрессии ТИМР1 и ТИМР2 при различных формах периодонтита путем морфометрической оценки характера их экспрессии в биопсийном материале десны.

Материалы и методы. Объектом исследования явился биопсийный материал десен 67 пациентов с различным характером течения периодонтита: быстро прогрессирующим (БПП, *n* = 19), хроническим простым (ХПП, *n* = 10) и хроническим сложным (при наличии окклюзионной травмы) (ХСП, *n* = 38) на базах 1-й кафедры терапевтической стоматологии и кафедры патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет». Критериями включения в исследование явились клиничко-рентгенологические признаки деструкции периодонтита и возраст пациентов для быстро прогрессирующего периодонтита от 18 до 35 лет, для хронического (простого и сложного)

периодонтита 36–60 лет. Проведено клинико-инструментальное обследование и лечение пациентов с патологией периодонта, включенных в исследование, с получением у каждого из пациентов информированного согласия.

Иммуногистохимический метод. Гистологические срезы с парафиновых блоков толщиной 2,5 мкм депарафинировались в ксилоле и обезжировались в спиртах возрастающей концентрации. Отработаны протоколы иммуногистохимического (ИГХ) выявления TIMPs (таблицы 1, 2).

Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов, окрашенных с использованием ИГХМ, с применением цифрового слайд-сканера Motic EasyScan с последующим программным анализом изображений с использованием Aperio ImageScope v12.4.0.5043.

Таблица 1 — Реактивы, использованные для проведения ИГХМ

Первичное антитело	Происхождение антител	Демаскировочный буфер, pH	Разведение	Время экспозиции хромогена	Позитивный контроль
TIMP1	rabbit	pH 9,0 125° 2'30"	1:50	4 мин	Предстательная железа
TIMP2	mouse	pH 9,0 125° 2'30"	1:800	5 мин	Почки

Таблица 2 — Характер экспрессии TIMP1 и TIMP2 в биопсийном материале десен при различных формах патологии периодонта

Первичное антитело	Характер экспрессии
TIMP1	Гомогенное цитоплазматическое и мембранное окрашивание эпителия десны, фибробластов, лейкоцитов/гистиоцитов в коричневый цвет различной интенсивности
TIMP2	Гомогенное цитоплазматическое и мембранное окрашивание эпителия десны, фибробластов, лейкоцитов/гистиоцитов и эндотелиоцитов в коричневый цвет различной интенсивности

В рамках программного анализа изображений проводилось выделение 6 случайных непересекающихся полей зрения (цифровое увеличение $\times 20$), с анализом ИГХ окрашивания отдельно в стромальном и эпителиальном компоненте десны (по 3 поля зрения). В процессе программного анализа экспрессии TIMP1, TIMP2 в ткани десны интенсивность коричневой окраски (продуктов реакции ДАБ-хромогена) измерялась Aperio ImageScope автоматически и разделялась на 3 уровня интенсивности и негативную реакцию. Результат программной оценки показателей позитивности и доли пикселей с высокой и умеренной экспрессией имел прямую взаимосвязь, а интенсивности экспрессии — обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки.

Для анализа исследуемых групп по характеру экспрессии названных выше маркеров с использованием программы Aperio ImageScope рассчитывались следующие параметры для каждого маркера: *позитивность* (Positivity — отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей $\times 100\%$), *общий индекс интенсивности ИГХ реакции* (TIMPs INDEX — отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей).

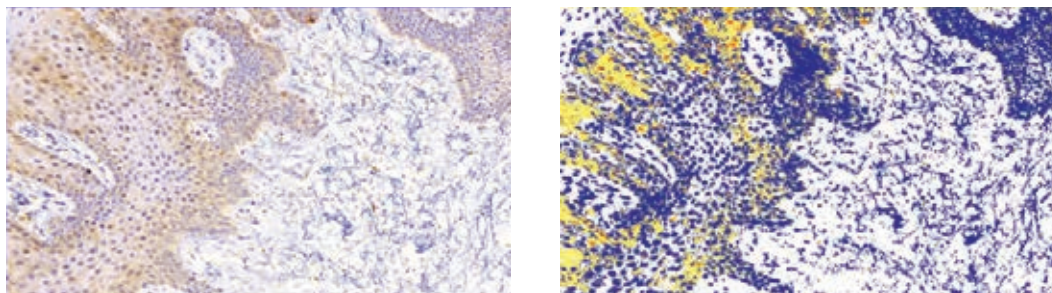
Статистический анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 с вычислением медианы (Me), интерквартильного (25 % и 75 % процентилей — IQR) и 95%-го доверительного интервалов, максимального и минимального значения. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро — Уилка (W). Парное сравнение независимых выборок по количественным признакам осуществляли с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определением критерия Манна — Уитни (U-критерий). Уровень статистической значимости устанавливался $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В рамках морфологического исследования биопсийного материала десен пациентов с различными формами периодонтита статистически значимых различий между исследуемыми группами по оцениваемым признакам альтеративных изменений эпителия и собственной пластинки десны, состоянию коллагеновых волокон, наличию кровоизлияний, выраженности воспалительной инфильтрации выявлено не было.

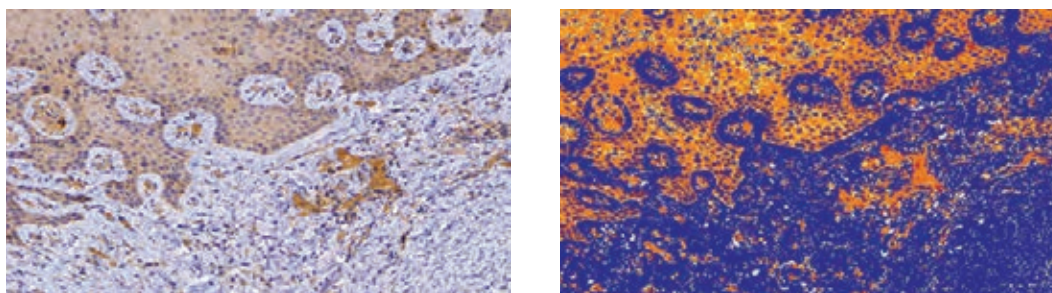
Экспрессия TIMP1 выявлялась с вариабельной интенсивностью как в эпителии, так и строме десны в группе контроля и при различных формах периодонтита (рисунок 1).



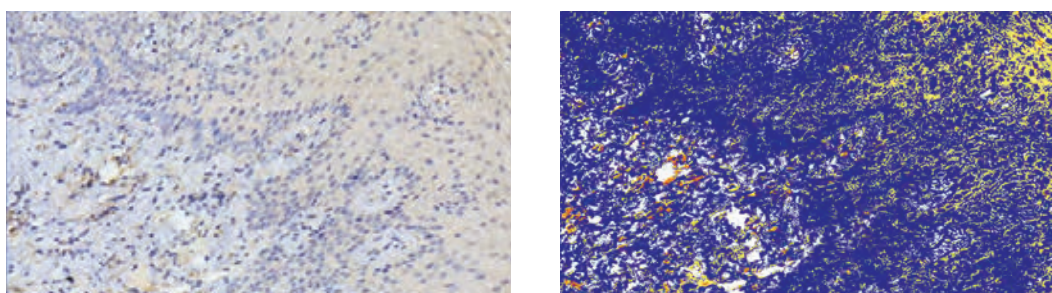
Контроль



БПП



ХПП



ХСП

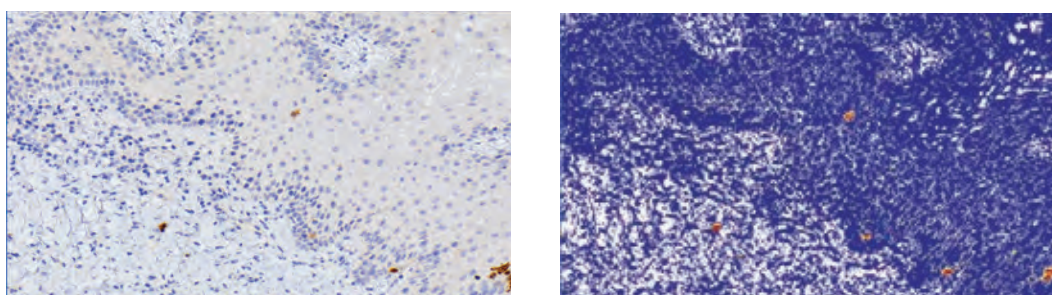


Рисунок 1 — Характер экспрессии TIMP1 в биопсийном материале десен группы контроля и пациентов с различными формами периодонтита (Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP1, ×200 (хромоген — DAB, контрооокрашивание гематоксилином Майера) и результат работы алгоритма «positive pixel count» программы AperioImageScope.)

Согласно результатам дисперсионного анализа выявлены статистически значимо более высокие уровни экспрессии TIMP1 в группах пациентов с различными формами периодонтита по сравнению с группой контроля. При этом имела место тенденция к повышению и площади и интенсивности как эпителиальной, так и стромальной экспрессии TIMP1 в направлении от предимплантационных биопсий (контроль) к ХПП с наибольшей экспрессией данного маркера в группах БПП и ХСП, которые в свою очередь не имели статистически значимых различий по изученным параметрам. Выявленные тенденции подтверждаются результатами парного сравнения групп с использованием критерия Манна – Уитни (таблица 3).

Таблица 3 — Параметры экспрессии TIMP1 в биопсийном материале десен при различных формах патологии периодонта

Показатель	Контроль	БПП	ХПП	ХСП
Эпителиальная / стромальная позитивность TIMP1 — Positivity				
Me [IQR]	32 [8:57] / 5 [3:7]	84 [55:97] / 15 [6:44]	61 [38:82] / 4,5 [3:11,5]	83 [61:95] / 16 [8:31]
БПП	$U = 596$ $p < 0,001^*$ / $U = 8068$ $p < 0,001^*$	—	—	—
ХПП	$U = 1291$ $p < 0,001^*$ / $U = 2210$ $p = 0,48$	$U = 2546$ $p < 0,001^*$ / $U = 2075$ $p < 0,001^*$	—	—
ХСП	$U = 7032$ $p < 0,001^*$ / $U = 7205$ $p < 0,001^*$	$U = 39943$ $p = 0,72$ / $U = 36103$ $p = 0,4$	$U = 3434$ $p < 0,001^*$ / $U = 2243$ $p < 0,001^*$	—
Эпителиальная / стромальная интенсивность TIMP1 — INDEX				
Me [IQR]	207 [205:211] / 201 [198:203]	188 [147:208] / 191 [169:199]	201 [185:210] / 197 [190:202]	185 [167:202] / 186 [177:196,5]
БПП	$U = 8818$ $p < 0,001^*$ / $U = 7692$ $p < 0,001^*$	—	—	—
ХПП	$U = 1662$ $p < 0,001^*$ / $U = 1387$ $p < 0,001^*$	$U = 2867$ $p = 0,005^*$ / $U = 2680$ $p = 0,003^*$	—	—
ХСП	$U = 7095$ $p < 0,001^*$ / $U = 6668$ $p < 0,001^*$	$U = 39206$ $p = 0,5$ / $U = 36132$ $p = 0,69$	$U = 3278$ $p < 0,001^*$ / $U = 2519$ $p < 0,001^*$	—

* Различия достоверны при $p < 0,001$.

Экспрессия TIMP2 выявлялась с вариабельной интенсивностью в эпителии десны, фибробластах, клетках воспалительного инфильтрата и эндотелиоцитах при различных формах периодонтита (рисунок 2).

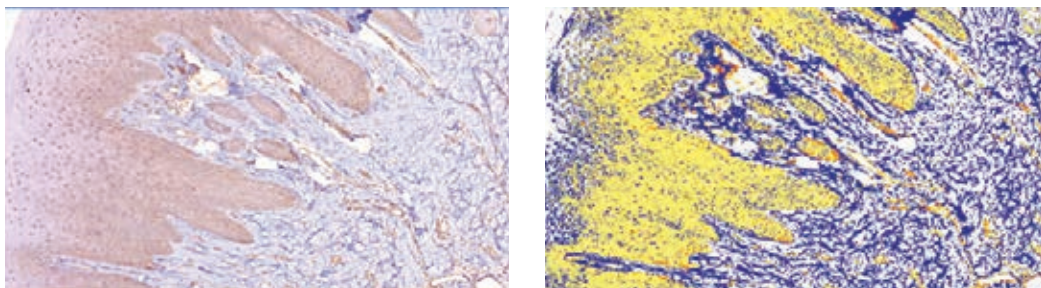
При этом площадь и интенсивность эпителиальной экспрессии TIMP2 была наименьшей в группе контроля и значимо повышалась в направлении ХСП, БПП, с наибольшими параметрами при ХПП. Похожая тенденция наблюдалась и в отношении стромальной экспрессии TIMP2 с наименьшими параметрами в группе предимплантационных биопсий (контроль), значимым повышением площади и интенсивности экспрессии TIMP2 в группах БПП и ХСП (которые по изученным параметрам не имели статистически значимых различий) и наибольшими параметрами в группе ХПП, что подтверждается результатами парного сравнения групп (таблица 4).

Таблица 4 — Параметры экспрессии TIMP2 в биопсийном материале десен при различных формах патологии периодонта

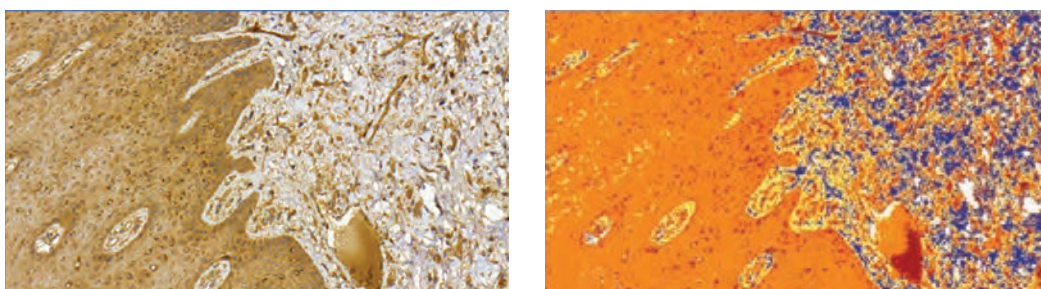
Показатель	Контроль	БПП	ХПП	ХСП
Эпителиальная / стромальная позитивность TIMP2 — Positivity				
Me [IQR]	70 [35:87,5] / 15 [10:22]	98 [69,5:100] / 29,5 [10:57]	99 [96:100] / 42,5 [28,5:58,5]	94 [50:99] / 28,5 [9:53,5]
БПП	$U = 12593$ $p < 0,001^*$ / $U = 15236$ $p < 0,001^*$	—	—	—
ХПП	$U = 1400$ $p < 0,001^*$ / $U = 1440$ $p < 0,001^*$	$U = 10706$ $p < 0,001^*$ / $U = 7838$ $p < 0,001^*$	—	—
ХСП	$U = 25172$ $p < 0,001^*$ / $U = 25891$ $p < 0,001^*$	$U = 61372$ $p = 0,004^*$ / $U = 61855$ $p = 0,35$	$U = 14294$ $p < 0,001^*$ / $U = 11713$ $p < 0,001^*$	—
Эпителиальная / стромальная интенсивность TIMP2 — INDEX				
Me [IQR]	196 [188:202] / 193 [189:195]	151 [127:203] / 180 [167:198]	130 [118:141] / 5 [166:184]	143 [120:170] / 171 [161:179]
БПП	$U = 13184$ $p < 0,001^*$ / $U = 15498$ $p < 0,001^*$	—	—	—
ХПП	$U = 798$ $p < 0,001^*$ / $U = 1895$ $p < 0,001^*$	$U = 8009$ $p < 0,001^*$ / $U = 8443$ $p = 0,002^*$	—	—
ХСП	$U = 9462$ $p < 0,001^*$ / $U = 9433$ $p < 0,001^*$	$U = 56491$ $p < 0,001^*$ / $U = 45931$ $p < 0,001^*$	$U = 17738$ $p < 0,001^*$ / $U = 15175$ $p = 0,13$	—

* Различия достоверны при $p < 0,001$.

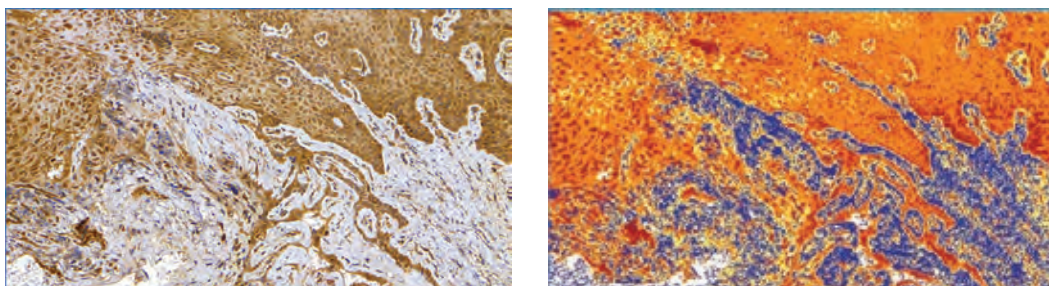
Контроль



БПП



ХПП



ХСП

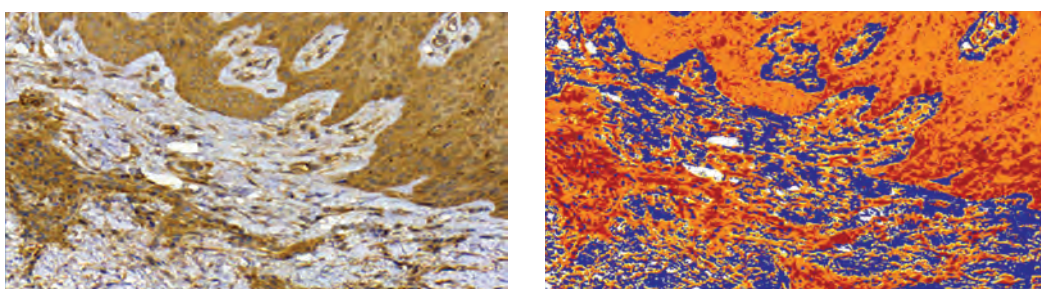


Рисунок 2 — Характер экспрессии TIMP2 в биопсийном материале десен группы контроля и пациентов с различными формами периодонтита (Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP2, $\times 200$ (хромоген — DAB, контролокрашивание гематоксилином Майера) и результат работы алгоритма «positive pixel count» программы AperioImageScope.)

Заключение. Увеличение эпителиальной и стромальной экспрессии TIMP1 и TIMP2 с нарушением регуляции экспрессии MMPs при различных формах периодонтита по сравнению с группой контроля подтверждает значение TIMPs в патогенезе воспаления в ткани периодонта и может объяснить медленно прогрессирующее и агрессивное течение с выраженной деструкцией периодонтальных тканей.

Изучение взаимодействия MMP и TIMP важно не только для своевременной диагностики и прогнозирования заболевания, но и для успешного применения рациональной структурной инженерии TIMP, для разработки вариантов с селективным ингибирующим действием на MMP и другие члены семейства металлопротеиназ.

Литература

1. Григоркевич, О. С. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы / О. С. Григоркевич, Г. В. Мокров, Л. Ю. Косова // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2019. — № 2. — С. 3–16.
2. Gupta, S. P. Quantitative structure activity relationship studies on zinc-containing metalloproteinase inhibitors / S. P. Gupta // Chemical reviews. — 2007. — Vol. 107, № 7. — P. 3042–3087.
3. Kontogiorgis, C. A. Matrix metalloproteinase inhibitors: A review on pharmacophore mapping and (q) sars results / C. A. Kontogiorgis, P. Papaioannou, D. J. Hadjipavlou-Litina // Current Medicinal Chemistry. — 2005. — Vol. 12, № 3. — P. 339–355.
4. The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts / P. W. Staskus [et al.] // J. Biol. Chem. — 1991. — № 266. — P. 449–454.
5. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients / M. Soell [et al.] // J. Dent. Res. — 2002. — Vol. 81, № 3. — P. 174–178.
6. Sorsa, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases / T. Sorsa, L. Tjaderhane, T. Salo // Oral. Dis. — 2004. — Vol. 10, № 6. — P. 311–318.
7. Salivary levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase TIMP-1: a pilot study about the relationship with periodontal status and MMP-9(-1562C/T) gene promoter polymorphism / D. M. Isaza-Guzman [et al.] // Arch. Oral. Biol. — 2011. — Vol. 56, № 4. — P. 401–411.

Features of TIMP1 and TIMP2 expression in periodontal pathology

Kazeko L. A.¹, Zakharava V. A.¹, Benesh Yu. D.², Cherstoy E. D.¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²Health Care Institution «11th City Clinical Dental Polyclinic», Minsk, Republic of Belarus

The dysregulation of the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMP) plays an important role in the development and progression of periodontal inflammation. The gingival biopsies from 67 patients with periodontitis were analyzed. The increase in expression of TIMP1 and 2 with a dysregulation of MMPs expression in different types of periodontitis confirms the importance of TIMPs in the pathogenesis of inflammation in periodontal tissues and may explain the slowly progressive and aggressive course with pronounced destruction of periodontal tissues.

Keywords: periodontitis, tissue inhibitor matrix metalloproteinase, immunohistochemistry, expression.