

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 1 И 13 КАК МАРКЕРЫ ДЕСТРУКТИВНО-ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПРОЦЕССА СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТЕОАРТРОЗЕ

С. А. Демкин¹, Д. А. Маланин¹, Л. Н. Рогова¹, Г. Л. Снигур¹, Н. В. Григорьева¹, К. В. Байдова²

¹Волгоградский государственный медицинский университет,

²Волгоградский медицинский научный центр

В представленном исследовании изучена динамика активности MMP-1 и MMP-13 гиалинового хряща у крыс с экспериментальным остеоартрозом коленного сустава с последующим сопоставлением полученных данных с морфометрическими параметрами.

Ключевые слова: остеоартроз, гиалиновый хрящ, металлопротеиназа.

METALLOPROTEINASES 1 AND 13 AS MARKERS OF DESTRUCTIVE AND PROLIFERATIVE PROCESSES IN THE ARTICULAR CARTILAGE IN EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS

S. A. Demkin¹, D. A. Malanin¹, L. N. Rogova¹, G. L. Snigur¹, N. V. Grigorieva¹, K. V. Baydova²

¹ Volgograd State Medical University,

² Volgograd Medical Research Center

The present study investigated the dynamics of the activity of MMP-1 and MMP-13 hyaline cartilage in rats with experimental osteoarthritis of the knee which was followed by a comparative analysis of the data with morphometric parameters.

Key words: osteoarthritis, hyaline cartilage, metalloproteinase.

Матриксные металлопротеиназы (ММР), относящиеся к семейству цинковых металлопротеиназ, участвуют в обмене белков межклеточного матрикса. Ведущая роль в процессе физиологического ремоделирования гиалинового хряща сустава отведена металлопротеиназам, относящимся к классу коллагеназ (ММР-1, ММР-13 и др.) [1].

В норме металлопротеиназы секретируются фибробластами, хондроцитами, эпителиальными клетками, макрофагами в очень малых количествах в неактивном состоянии. Важной особенностью металлопротеиназ является их способность к индукции под действием различных факторов. Регуляция активности коллагеназ осуществляется цитокинами, факторами роста, различными химическими соединениями (липополисахариды бактериального происхождения и др.), факторами, влияющими на мембрану клетки. Активность ММР подавляется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМР), а также гормонами (глюкокортикостероиды и т. п.) [2].

ММР-1 способна расщеплять три интерстициальных коллагена — типы I, II, III, которые существенно отличаются друг от друга. Более того, этот фермент гидролизует минорные коллагены типов VII и X, а также желатинины разных коллагенов, белки соединительнотканного матрикса: энтактин, аггрикан и, кроме того, казеин, α 2-макрोगлобулин и синтетические субстраты, которые по своей последовательности соответствуют гидролизуемой области в коллагене и α 2-макрोगлобулине [4].

Ранее считалось, что главная роль в деструкции матрикса принадлежит ММР-1, затем была установле-

на и важная роль ММР-13, которая разрушает коллаген II типа, стромелизин и др. [6—9].

Известно, что в механизмах активизации металлопротеиназ значимую роль отводят сигнальным белкам S100A8 и A9. В результате, активируются NF- κ B рецепторы синовиальных фибробластов, что определяет высвобождение многих цитокинов, таких как ИЛ-6, ИЛ-10, GM-CSF, IL-8 и хемоаттрактант моноцитов, который, в свою очередь, играет значимую роль в активации металлопротеиназ и обуславливает их высокую активность при остеоартрозе [6—9].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить удельное число и интенсивность экспрессии MMP-1 и MMP-13 в гиалиновом хряще коленного сустава, сопоставить показатели активности протеиназ с морфометрическими параметрами суставного гиалинового хряща у крыс с экспериментальным остеоартрозом через 1 месяц с момента моделирования.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 20 половозрелых крысах линии Wistar, массой (250 ± 2,2) г.

При работе с лабораторными животными соблюдаются требования, изложенные в правилах лабораторной практики (GLP), «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), приказе МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977.

Лабораторные животные были распределены на 2 группы по 10 животных в каждой (контрольная и экспериментальная) (табл. 1).

В экспериментальной группе 1 (контрольной) животным внутрисуставно вводили 0,5 мл 0,9%-й раствор NaCl.

В экспериментальной группе 2 моделировали остеоартроз путем внутрисуставного введения 10%-й суспензии стерильного талька в том же объеме [3].

Таблица 1

Характеристика экспериментальных групп животных

Порода животных	Линия Wistar	
Возраст животных	половозрелые	
Масса животных	250 ± 2,2 г	
Группы	Вводимый препарат	10%-я суспензия стерильного талька
	Экспериментальная № 1	0,9%-й раствор NaCl
Экспериментальная № 2	—	0,5 мл однократно

Все манипуляции у животных выполнялись после применения препарата «Рометар» по методике, описанной фирмой-производителем.

Через 1 месяц после проведения манипуляций животных выводили из эксперимента путем введения смертельной дозы «Рометара», вычленили левую бедренную кость для дальнейшего морфологического исследования.

Хрящевую ткань с субхондральными отделами кости и синовиальной оболочкой фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 часов (Newell K. J., et al., 2001). Проводили бескислотную декальцинацию в растворе ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия) в стандартной концентрации. После полного удаления из костной ткани минерального компонента выполняли стандартную гистологическую проводку по спиртам возрастающих концентраций и препарат заключали в парафин. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори для качественной оценки структуры матрикса гиалинового хряща (Киясов А. П., 2001; Коржевский Д. Э., 2005).

Для выявления экспрессии матриксных металлопротеиназ использовали первичные поликлональные антитела к MMP-1 (ABclonal, Китай) и MMP-13 (Almabion, Россия).

Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии с протоколами фирм производителей антител с использованием систем детекции «UltraVision» (LabVision, Великобритания) и хромогена — диаминобензидином, используя протокол высокотемпературной демаскировки антигенов в мини-автоклаве Pascal (DakoCytomation, Дания) (Kumar G. L., et al., 2009). Достоверность полученных результа-

тов контролировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител.

Характер иммуногистохимической реакции оценивали визуально в баллах с учетом интенсивности окраски (рис. 1) или определяли удельное количество позитивно окрашенных клеток стандартизированными методами морфометрии в иммуногистохимии с помощью системы анализа изображений (Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004; Dabbs D. J., 2010).

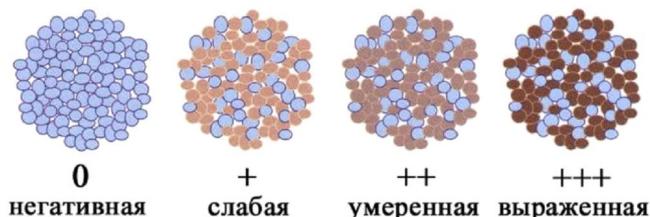


Рис. 1. Визуально-аналоговая шкала для оценки интенсивности иммуногистохимической реакции по Allred D. C., et al. (1998)

Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием комплекса, включающего микроскоп «Axio Scope» (Carl Zeiss, Германия) и цифровую фотокамеру «Power Shot» (Canon, Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Россия). Для оценки морфологических показателей определяли толщину суставного хряща (L, мкм) и объемную долю хондроцитов по отношению к матриксу (ОД, %).

Результаты экспериментов обрабатывались методами базисного статистического анализа на ПК с использованием программ «Видео ТестМорфо-4», Excel Microsoft Office (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., USA). Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента, анализ непараметрических количественных признаков — с помощью критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использовали критерии χ^2 и Фишера. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что в контрольной группе животных суставной гиалиновый хрящ имел толщину (330 ± 17,3) мкм и характерное гистологическое строение. Поверхностные хондроциты характеризовались уплощенной формой и располагались поодиночке в хрящевом матриксе. Хондроциты переходной и базальной зон имели округлую форму и располагались в составе изогенных групп рядами, ориентированными перпендикулярно к суставной поверхности. Объемная доля хондроцитов составляла (13,7 ± 1,1) % (табл. 2.).

Таблица 2

Морфометрические параметры суставного гиалинового хряща у крыс контрольной группы и с экспериментальным остеоартрозом

Экспериментальные группы	Толщина, мкм.	Объемная доля хондроцитов, %
Экспериментальная группа № 1	330,0 ± 17,3	13,7 ± 1,1
Экспериментальная группа № 2	121,0 ± 20,4*	1,2 ± 0,6*

*Достоверность различий по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$).

Морфологические признаки дегенеративно-дистрофических процессов не визуализировались (рис. 2а). Иммунохимическая реакция по Маллори выявляла равномерное расположение коллагеновых волокон, отсутствие очагов оссификации (рис. 3а).

При проведении иммуногистохимического исследования удельное число хондроцитов, экспрессирующих MMP-1, составило (38 ± 2,1) %, а MMP-13 — (36 ± 4,2) % на фоне минимальной интенсивности экспрессии изучаемых металлопротеиназ (табл. 3), что соответствует малой скорости обновления компонентов матри-

са в гиалиновом хряще при физиологическом ремоделировании. (рис. 4а, 5а). [6].

После моделирования остеоартроза происходило уменьшение толщины суставного хряща до (121 ± 20,4) мкм, $p < 0,05$ и снижение объемной доли хондроцитов до (1,2 ± 0,6) %, $p < 0,05$. Во всех зонах были отмечены множественные «пустые лакуны» и хондроциты с карриопикнозом, обширные участки деструкции суставной поверхности с разрастанием соединительной ткани, в толще которой определялось гранулематозное воспаление с выраженной гистиомакрофагальной инфильтрацией и гигантскими многоядерными клетками типа инородных тел, полнокровием кровеносных сосудов и неравномерным отеком межклеточного вещества (рис. 2б).

При гистохимическом исследовании в суставном хряще отмечали неравномерность окрашивания коллагеновых волокон с выраженным нарушением тинкториальных свойств матрикса хрящевой ткани. В участках склероза волокна коллагена были окрашены наиболее интенсивно (рис. 3б).

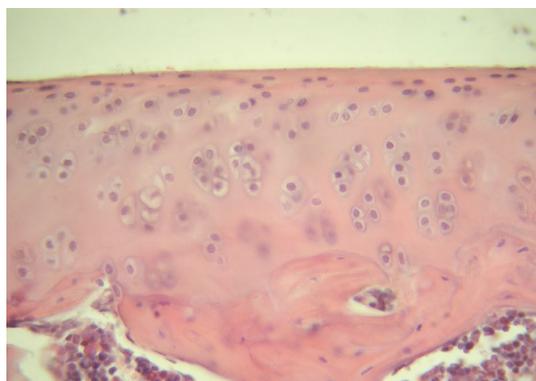
Иммуногистохимически у крыс с экспериментальным остеоартрозом резко возросло удельное число хондроцитов, экспрессирующих MMP-1 до (73 ± 3,2) %, а MMP-13 — до (95 ± 2,1) %, $p < 0,05$ (табл. 3) при одновременном максимальном усилении их экспрессии (рис. 4б, 5б).

Таблица 3

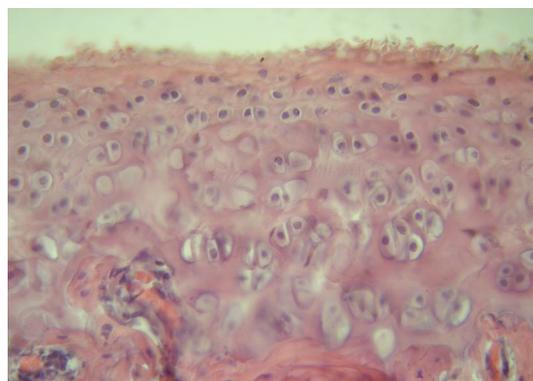
Удельное число иммунопозитивных хондроцитов и интенсивность экспрессии MMP-1 и MMP-13 хондроцитов суставного хряща

Экспериментальные группы	Первичные антитела			
	MMP-1		MMP-13	
	удельное число (%)	интенсивность экспрессии	удельное число (%)	интенсивность экспрессии
Экспериментальная группа № 1	38 ± 2,1	+	36 ± 4,2	+
Экспериментальная группа № 2	73 ± 3,2*	+++*	95 ± 2,1*	+++*

*Достоверность различий по отношению к контрольной группе ($p < 0,05$).

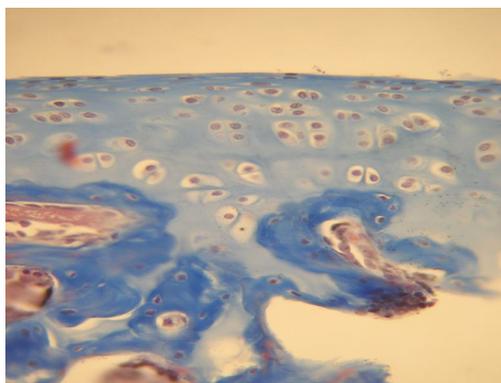


а)
Экспериментальная группа № 1



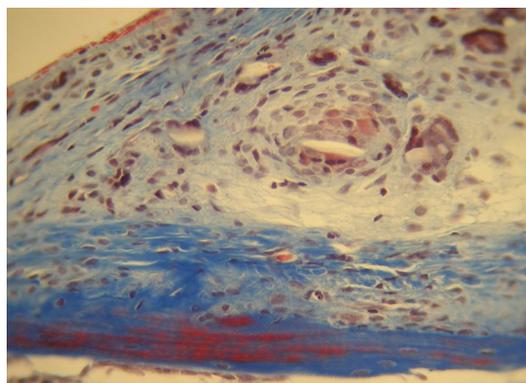
б)
Экспериментальная группа № 2

Рис. 2. Морфология гиалинового хряща у крыс экспериментальных групп (окраска гематоксилином и эозином). Увеличение x 200)



а)

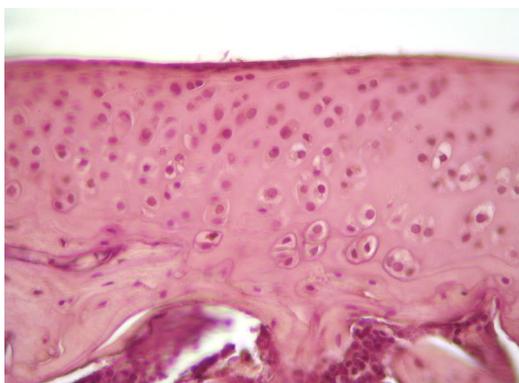
Экспериментальная группа № 1



б)

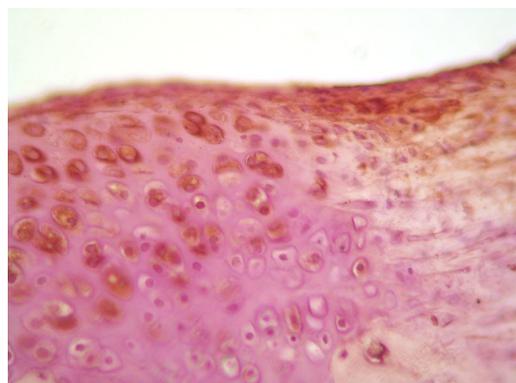
Экспериментальная группа № 2

Рис. 3. Дегенеративно-дистрофические изменения гиалинового хряща у крыс экспериментальных групп (окраска по Маллори. Увеличение x 400)



а)

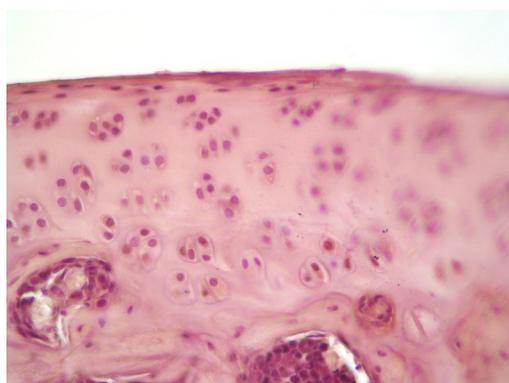
Экспериментальная группа № 1



б)

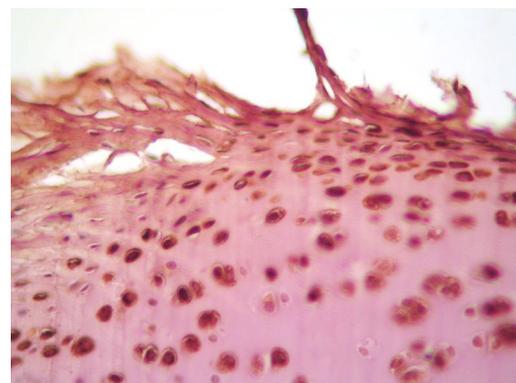
Экспериментальная группа № 2

Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция с антителами к MMP-1 у крыс экспериментальных групп (увеличение x 400)



а)

Экспериментальная группа № 1



б)

Экспериментальная группа № 2

Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция с антителами к MMP-13 у крыс экспериментальных групп (увеличение x 400)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, формирование выраженных дегенеративно-дистрофических процессов в гиалиновом хряще сопровождается резким увеличением удельного числа хондроцитов, экспрессирующих MMP-1 и, особенно, MMP-13 с максимальным усилением интенсивности их экспрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьева Н. И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорганическая химия. — 1998. — Т. 24, № 4. — С. 245—255.
2. Кайлина А. Н., Огородова Л. М., Часовских Ю. П., Кремер Е. Э. Показатели системы матриксных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9, TIMP-1) при ювенильных артритах у детей // Вестник РАМН. — 2013. — № 7. — С. 36—40.

3. Котельников Г. П., Ларцев Ю. В., Махова А. Н. Сравнительная оценка структурных изменений тканей сустава при различных моделях экспериментального артроза // Казанский мед. ж. — 2006. — № 1. — С. 1, С. 31—35.

4. Соловьева Н. И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорганическая химия. — 1998. — № 24. — С. 245—255.

5. Хасигов П. З. Роль металлопротеиназ матрикса в развитии диабетической нефропатии / П. З. Хасигов [и др.] // Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 5. — С. 613—619.

6. Рогова Л. Н., Замечник Т. В., Фастова И. А., Шестернина Н. В. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестник новых медицинских технологий. — 2011. — № (2). — С. 86—89.

7. Anne-Marie Malfait, Christopher B. Little. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis // Malfait and Little Arthritis Research & Therapy. — 2015. — Vol. 17. — P. 225.

8. Lories R. J. Joint homeostasis, restoration, and remodeling in osteoarthritis // Best Pract Res Clin Rheumatol. — 2008. — Vol. 22 (2). — P. 209—220

9. Hedbom E., Hauselmann H. J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation // Cell Mol Life Sci. — 2002. — Vol. 59. — P. 45—53.

Контактная информация

Дёмкин Сергей Анатольевич — врач травматолог-ортопед, Госпиталь ФКУЗ МСЧ МВД России по Волгоградской области, e-mail: smdem@mail.ru