MATRICES METALOPROTEINĀZES MMP-2 UN MMP-9 ŪDEĻU AKNĀS

MATRIX METALLOPROTEINASES MMP-2 AND MMP-9 IN THE MINK LIVER

Valdovska Anda[1], Pilmane Māra[2], Jemeļjanovs Aleksandrs[1]
LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra", Latvija[1], Rīgas Stradiņa Universitātes Medicīnas fakultātes Anatomijas un antropoloģijas institūts, Latvija[2]
Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine "Sigra", LUA agency, Latvia[1], Institute of Anatomy and Anthropology, Faculty of Medicine, Riga Stradins University, Latvia[2]
sigra@lis.lv, pilmane@latnet.lv

ABSTRACT

The degree of liver inflammation is important in animals with chronic diseases. Controversary data still exist regarding the role of matrix metalloproteinases (MMPs) as valid markers of liver fibrosis. Aim: to assess liver MMP-2 and MMP-9 as markers of fibrosis and inflammation in minks with systemic mycoses. Materials and methods: The liver tissue from 10 minks at age of 7 months were fixed in 12% formalin solution and embedded in paraffin. The inflammation in the liver were determined by staining of slides with hematoxylin and eosin, Kupffer cells – by Perls, but MMP-2 and MMP-9 - by immunohistochemistry (IMH) methods. The appearance of IMH results was evaluated by semiquantitative method in accordance to 4 grades: negative; (+) few positive cells seen in the visual field; (+ +) moderate number of positive cells seen in the visual field and (+ + +) abundance of positive cells seen in the visual. The inflammation cells in the liver were counted and results were expressed as mean ± SD. Results: Morphological research of mink liver demonstrated inflammation with infiltration of macrophages, neutrophil leukocytes and lymphocytes. In tissue, incidence of appearance of MMP-9 was higher in minks with moderate number of inflammatory cells and MMP-9 expression in liver than in minks with abundance of inflammatory cells and MMP-9 containing cells, and in animals with commonly indistinct infiltration of liver with inflammatory cells and few MMP-9 containing cells. However, expression of MMP-2 was similar in all animals investigated by us. Conclusion: From liver tissue MMPs, MMP - 9, but not MMP-2, might be used as markers of disease (inflammation) activity.
KEY WORDS: matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, liver, mink.

IEVADS

Mikroskopisko sēņu izraisītās dzīvnieku saslimšanas jeb mikozes (mikopātijas) šobrīd pasaulē uzskata par vienu no būtiskākajām veterinārmedicīnas aktualitātēm (Спесивцева, 1964; Кузнецов, 2001). Mikožu patogēnais process izraisa audu bojājumus (McGee et al., 1992), galvenokārt, distrofiskas pārmaiņas aknās, uroģenitālās un elpošanas sistēmas iekaisumus (Кузнецов, 2001). Latvijā veikti pētījumi (Valdovska u.c., 2006) par mikroskopisko sēņu klātbūtni ūdeļu parenhimatozajos orgānos, kas korelē ar doto orgānu smagām morfoloģiskām pārmaiņām. Celulārais, bioķīmiskais un molekulārais mehānisms, kas rada traucējumus hepatocītos, ir cēlonis gandrīz visām aknu slimībām (Sokol, 2002).

Aknu zvaigžņveida šūnas (HSC) atbild par līdzsvara pārmaiņām starp aknu fibroģenēzi un fibrolīzi (Wu and Zern, 2000). HSC normāli ir nekustīgas un producē nedaudz ekstracelulārās matrices (ECM) komponentus, piemēram, laminīnu un IV tipa kolagēnu (Rubin and Farber, 1999; Wu and Zern, 2000). Līdzko HSC ir pakļautas hepatocītu un aktivēto Kupfera šūnu šķīstošiem faktoriem, tās zaudē savu lipīdu sastāvu (retinilpalmitātu) un notiek aktivācijas process, kas izraisa liela daudzuma ECM sastāvdaļu producēšanu. Pēc aktivācijas HSC proliferē un hronisku slimību gadījumos to daudzums palielinās (Wu and Zern, 2000; Sokol, 2002).

Aknu zvaigžņveida šūnas nodrošina ekstracelulārās matrices proteīnu sintēzi un tai pašā laikā regulē arī matrices degradāciju (Li and Friedman, 1999). HSC aktivācija atbrīvo matrices metaloproteināzes (MMP) un MMP inhibitorus, piemēram, MMP audu inhibitoru

(TIMP), kurš modulē fibrolīzi (Arthur, 2000). Turklāt MMP aktivāciju izraisa arī Kupfera šūnas (Arthur, 1998).

Matrices metaloproteināzes (MMP) ir ar cinku un kalciju saistīto endopeptidāžu grupa, kas modulē daudzu matrices sastāvdaļu, tai skaitā, fibrillāro un nefibrillāro kolagēnu daudzumu (Arthur, 2000). MMP samazina tādus ekstracelulārās matrices komponentus kā kolagēnu, želatīnu, laminīnu (Arthur, 1998).

Pētījuma mērķis bija MMP-2 un MMP-9 sadalījuma novērtēšana ūdeļu aknās un iegūto datu korelācija ar iekaisumu sistēmisko mikožu gadījumā, jo MMP-2 un MMP-9 ir nozīmīgas bazālo membrānu degradācijā un tiek uzskatītas par vissvarīgākajām matrices metaloproteināzēm aknu fibrozes gaitā.

MATERIĀLS UN METODIKA

Pēc nejaušas atlases principa izvēlējāmies 10 septiņus mēnešus vecas tumši brūnās ūdeles jaundzīvnieku augšanas un kažoka veidošanās (nobriešanas) periodā. Histoloģiskā un imunohistoķīmiskā materiāla izpēte veikta Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta Morfoloģijas laboratorijā.

Iegūto ūdeļu aknu audi histoloģiskai izmeklēšanai fiksēti 12% formalīna šķīdumā. Pēc tam audi tika ieguldināti parafīnā, sagriezti ar mikrotomu un izmantota hematoksilīna un eozīna krāsošana (Aughey and Frye, 2001), Perlsa reakcija (Лилли, 1969) un biotīna – streptavidīna (Эллиниди и др., 2002) imūnhistoķīmiskā metode. Paraugus izskatīja Leica mikroskopā.

Aknu makrofāgu un MMP saturošo šūnu biežums aknu audos tika iedalīts četrās pakāpēs: (-) negatīvs, (+) redzes laukā redzams mazs daudzums šūnu, (++) redzes laukā redzams vidējs daudzums šūnu un (+++) redzes laukā redzams daudz šūnu. Iekaisuma šūnas tika saskaitītas 3 brīvi izvēlētos redzes laukos ap centrālo aknu vēnu 400 X palielinājumā (Willard et al., 1994; Rubin and Farber, 1999; Aughey and Frye, 2001).

Datu apstrādei izmantotas statistikas metodes vidējā lieluma un standartnovirzes aprēķinam (Arhipova un Bāliņa, 1999).

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Aknu iekaisums ir dinamisks process, kas saistīts ar līdzsvara regulācijas izjukšanu starp matrices sintēzi un matrices degradāciju. To nodrošina arī ekstracelulārās matrices proteīnu (MMP un TIMP) uzkrāšanās ar sekojošu audu rekonstrukciju (fibrozes veidošanos) (Arthur, 2000).

Ūdeļu aknu histoloģiskajos paraugos morfoloģiski konstatējām iekaisuma infiltrāciju (1. tabula).

Iekaisums ir sarežģīta reakcija, kurā pakāpeniski iesaistās vairāku veidu šūnas. Desmit dzīvnieku histoloģiskajos paraugos ap aknu centrālo vēnu tika atrasta ļoti izteikta audu infiltrācija ar makrofāgiem, neitrofīliem leikocītiem un limfocītiem, kas liecina, ka ūdeļu aknās vērojams patoloģisks process.

Mūsu pētīto ūdeļu aknu histoloģiskajos paraugos konstatēti 26,9 % neitrofīlo leikocītu no šūnu kopējā skaita, kas norāda uz intensīvu iekaisuma produktu fagocitozes procesu. To apstiprina arī Kellers (1991) un McGee et al. (1992) dati, jo veselu aknu audos neitrofīlo leikocītu praktiski nav, tie atrodas asinsritē. Šo šūnu infiltrāts veidojas septiska iekaisuma procesa laikā un, pēc McGee et al. (1992) pētījumiem, neitrofīlie leikocīti audos liecina par akūtu iekaisuma procesu.

Noteicām arī aknu pastāvīgo makrofāgu (Kupfera šūnu) skaitu aknu paraugos (vidējais skaits un standartnovirze bija 6,9 ± 1,7). Zināms, ka Kupfera šūnu infiltrācija veidojas vēlākajās iekaisuma fāzēs un raksturo organisma imunitātes spraigumu. Turklāt iekaisušos audos hroniska iekaisuma gadījumā makrofāgi aktivējas (Kellers, 1991).

Pamatojoties uz mūsu pētījumā konstatēto Kupfera un kopējo redzes laikā vērojamo iekaisuma šūnu daudzumu, kā arī MMP saturošo šūnu daudzumu ūdeļu aknās, visi histoloģiskie paraugi tika iedalīti 3 apakšgrupās: 1. (negatīvie), 2. (vidējs iekaisums un maz vai vidēji daudz MMP izdalošo šūnu) un 3. (izteikts iekaisums un daudz MMP izdalošo struktūru) apmēram vienādā gadījumu skaitā (attiecīgi 3, 4 un 3 dzīvnieki).

Pētījuma rezultātā neatradām aknu audu MMP-2 sadalījuma atšķirības iepriekšminētajās apakšgrupās. Tas varētu būt izskaidrojams ar to, ka, lai arī neitrofīlie leikocīti stimulē zvaigžņveida šūnu kolagēna sintēzi, tomēr aktivēts neitrofīls producē arī slāpekļa monoksīdu, kurš, tieši otrādi, var samazināt sākotnējo peroksīda izdali šūnās, bloķējot MMP-2 sekrēciju, un samazina fibrozes veidošanos aknās.

MMP-9 augstāku aktivitāti novērojām 2. apakšgrupai, t.i., dzīvniekiem ar vidēju daudzumu MMP izdalošām struktūrām un vidēji izteiktu iekaisumu. To varētu izskaidrot ar Kupfera šūnu infiltrāciju vēlākajās iekaisuma fāzēs un hroniska iekaisuma radīto pašu šo šūnu stimulāciju (Kellers, 1991). Tas saskan ar Friedman (2003) aprakstīto part to, ka MMP-2 un MMP-9 aktivitāti regulē iekaisuma un imunoloģiskie procesi, jo pirmos signālus aknu zvaigžņveida šūnu aktivācijai saņem parakrīni no apkārtējām šūnām - Kupfera šūnām, hepatocītiem un leikocītiem. Aktivētās HSC sintezē un atbrīvo daudz sekretoro produktu, ieskaitot MMP (Friedman, 2005), īpaši, MMP-9 vai B želatināzi, kas papildus veicina Kupfera šūnu darbību (Friedman, 2003) ar sekojošu ECM degradēšanu, šūnu destruktīvā potenciāla palielināšanos un invazīvo procesu turpmāko attīstību (Соловьева и др., 2001).

1. tabula / Table 1

Vidējais un standartnovirzes šūnu skaits ūdeļu aknās
Mean and standard deviation of cells in the mink liver

No.	Kupfera šūnas / Kupffer cells	Neitrofīlie leikocīti / neutrophil leukocytes	Limfocīti / lymphocytes
1.	4,4 ± 1,52	15 ± 4,6	57 ± 5
2.	6,6 ± 2,07	12,7 ± 4,73	31 ± 4,4
3.	9,8 ± 0,84	31 ± 2	59,3 ± 8,50
4.	11,6 ± 3,65	16,7 ± 6,11	25,7 ± 4,93
5.	20 ± 6,12	13,7 ± 3,78	34,7 ± 11,72
6.		9,3 ± 4,16	25,7 ± 2,52
7.	4,2 ± 2,17	9 ± 2	16,3 ± 4,93
8.		12,7 ± 1,53	18,3 ± 1,53
9.		23,3 ± 4,51	28,7 ± 8,08
10.	6,8 ± 1,48	16,3 ± 4,16	29 ± 3
Kopā grupā /Mean ± SD for the group	9,1 ± 1,80	15,97 ± 1,461	32,57 ± 3,115

SECINĀJUMI

Aknu audu matrices metaloproteināzes (MMP), galvenokārt MMP–9, iespējams izmantot kā iekaisuma aktivitātes marķieri.

LITERATŪRA

1. Arhipova I., Bāliņa S. (1999) *Statistika ar MS Excel ikvienam*. 1.daļa. Datorzinību centrsRīga, 168 lpp.
2. Arthur M.J.P. (1998) Fibrosis and altered matrix degradation. Digestion, 59: 376 – 380.

3. Arthur M.J.P. (2000) Fibrogenesis: Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology*, 279: G245 – G249.
4. Aughey E., Frye F.L. (2001) *Comparative veterinary histology with clinical correlates*. Manson Pub. Ltd, London, pp. 14 – 127.
5. Friedman S.L. (2003) Liver fibrosis – from bench to bedside. Journal of Hepatology, vol. 38 (S1), S38 – S53.
6. Friedman S.L. (2005) Mac the knife? Macrophages – the double-edged sword of hepatic fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.115, 1:29 - 32
7. Kellers R. (1991) *Ievads imunoloģijā un imūnpatoloģijā*. Zvaigzne, Rīga, 317 lpp.
8. Li D., Friedman S.L. (1999) Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects of therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14, 618-633.
9. McGee J. O'D., Isaacson P.G., Wright N.A. (1992) Oxford textbook of pathology. V.1. *Principles of pathology*. Oxford University Press, New York, pp. 321 – 491.
10. Rubin E., Farber J.L. (1999) *Pathology*. 3 ed., Lippincott-Raven, pp. 38 – 444.
11. Sokol R.L. (2002) Liver Cell Injury and Fibrosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 35: S7 – S10.
12. Valdovska A., Jemeļjanovs A., Pilmane M. (2006) Ūdeļu barības mikroskopiskās sēnes un to ietekme uz orgānu morfopatoloģiju. *LLU Raksti*, Nr.16 (311), 40 – 49.
13. Willard M.D., Tvedten H., Turnwald G.H. (1994) *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 2nd ed., W.B.Saunders comp., Philadelphia, pp. 56-57.
14. Wu J., Zern M.A. (2000) Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 35: 665 – 672.
15. Эллиниди В.Н., Аникеева Н.А., Максимова Н.А. (2002) *Практическая иммуногистохимия*. ВЦЭРМ МЧС России, Санкт-Петербург, 20 – 30 с.
16. Кузнецов А.Ф. (2001) *Ветеринарная микология*. Лань, Санкт-Петербург, 410 с.
17. Лилли Р. (1969) *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*. Мир, Москва, 376 с.
18. Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.А., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Ъалаевская Т.О. (2001) Коллагеназы I и IV типов и их эндогенные регуляторы в иммортализованных и трансформированных фибробластах. *Вопросы медицинской химии*, No.1, http://medi.ru/pbmc/8810105.htm - вставной 20.10.2000.
19. Спесивцева Н.А. (1964) *Микозы и микотоксикозы*. Колос, Москва, 3 – 473 с.