Казеко Л.А.¹, Захарова В.А.¹, Субботко И.Л.², Бенеш Ю.Д.³

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Медицинский центр Минского тракторного завода, Минск, Беларусь

³ 11-я городская клиническая стоматологическая поликлиника, Минск, Беларусь

Kazeko L.¹, Zakharava V.¹, Subbotka I.², Benesh J.³

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Minsk Tractor Works Healthcare Center, Minsk, Belarus

³ 11th City Clinical Dental Clinic, Minsk, Belarus

Экспрессия тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 в здоровой слизистой оболочке полости рта

Expression of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-2 in Healthy Oral Mucosa

Резюме

Цель. Оценить характер экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 (ТИМП-2) в биоптатах здоровой слизистой оболочки полости рта.

Материалы и методы. Забор биопсийного материала был выполнен у 30 пациентов. Биоптаты здоровой слизистой оболочки были получены во время дентальной имплантации.

Результаты. Эпителиальная и стромальная экспрессия ТИМП-2 наблюдалась во всех проанализированных случаях. Умеренная экспрессия преобладала в эпителии, низкая экспрессия – в строме.

Заключение. Здоровая слизистая оболочка полости рта характеризуется низкой и умеренной экспрессией ТИМП-2.

Ключевые слова: тканевый ингибитор матричных металлопротеиназ-2, экспрессия, слизистая оболочка полости рта, воспаление.

Abstract

Purpose. To evaluate features of the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (TIMP-2) in biopsies of healthy oral mucosa.

Methods. Sampling of biopsy material was performed in 30 patients. Biopsies of healthy oral mucosa were obtained during the dental implantation procedure.

Results. Epithelial and stromal expression of TIMP-2 was observed in all analyzed cases. Moderate expression prevailed in the epithelium, low expression in the stroma.

Conclusion. Healthy oral mucosa is characterized by low and moderate expression of TIMP-2.

Keywords: tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2, expression, oral mucosa, inflammation.

■ ВВЕДЕНИЕ

Матричные металлопротеиназы (ММП) ответственны за широкий спектр протеолитических реакций. В физиологических условиях ММП участвуют во многих процессах, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию, апоптоз и ангиогенез клеток. При онкопатологии ММП также регулируют инвазивный рост и метастазирование. Трудно переоценить их роль при воспалительных процессах слизистой оболочки и тканей периодонта. ММП играют фундаментальную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса. Экспрессия ММП в тканях регулируется скоростью их синтеза и содержанием их главных эндогенных ингибиторов – тканевых ингибиторов матричных металлопротеиназ (ТИМП). Изучение характера экспрессии ТИМП и их взаиморегуляции с ММП представляется перспективным направлением исследований в стоматологии.

В физиологических условиях матричные металлопротеиназы секретируются из клетки в незначительном количестве. На посттрансляционном уровне выделяют два основных пути регуляции активности ММП: протеолитическая активация неактивных ферментов (про-ММП) и взаимодействие с эндогенными ингибиторами. Протеолитическая активность ММП контролируется их эндогенными ингибиторами. Тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ – это белки, существующие в организме, специфически ингибирующие матричные металлопротеиназы и таким образом поддерживающие баланс между деструкцией и формированием матрикса. Первая известная биологическая функция ТИМП, которая привела к их открытию, это ингибирование коллагеназы. В настоящее время известно 25 ММП, они пронумерованы последовательно от 1 до 28 (ММП-4, -5 и -6 отсутствуют). ММП можно разделить на подгруппы в соответствии с их первичными субстратами.

При взаимодействии с ММП ТИМП образуют нековалентный стехиометрический комплекс в пропорции 1 к 1. Почти все ММП могут быть ингибированы всеми известными ТИМП (-1, -2, -3, -4), хотя имеются различия в аффинности связывания (Olson et al., 1997) [1]. Несмотря на ингибирование матричных металлопротеиназ, некоторые исследования показали, что ТИМП-2 также участвует в активации про-ММП-2. ТИМП-2 был впервые обнаружен при разработке техники обратной зимографии. De Clerck et al., 1989 [2], выделили этот белок из бычьей эндотелиальной клеточной культуры. N-концевой участок ТИМП-2 первым связывается с активным участком мембраносвязанного МТ1-ММП (ММП-14). Гемопексин-подобный домен секретируемого про-ММП-2 впоследствии связывается с С-концевой областью комплексного ТИМП-2 (Zhao et al., 2004) [3]. Установлено, что ТИМП-1 и ТИМП-2 проявляют митогенную активность для широкого спектра клеток. ТИМП-2 также стимулирует митоз фибробластоподобных клеток пульпы и фибробластов десны, а также лейкоцитов и эпителиальных клеток (Nayakawa et al., 1994) [4]. Однако ТИМП также способны и подавлять клеточный рост. Сверхэкспрессия ТИМП-2 подавляет рост клеток опухоли, ее инвазивный рост и метастазирование *in vivo* (Imren et al., 1996) [5]. M. Sutinen et al., 1998, установили, что уровень экспрессии ТИМП-2 был отрицательным при всех изученных метастазах рака и лимфатических узлов [6].

Количество ТИМП и ММП в десневой жидкости также меняется при патологии периодонта. При хроническом периодонтите ММП-1, -8 и -9 и уровни ТИМП-1 повышены (Ingman et al., 1996) [7]. Разрушение костной ткани и связочного аппарата зуба при периодонтите отражает относительную сверхэкспрессию ММП по отношению к ТИМП. Подавление же экспрессии ММП или повышенная экспрессия ТИМП могут уменьшить скорость и степень деструкции тканей периодонта.

В доступной для изучения литературе существуют противоречивые данные по уровню экспрессии ТИМП-2 в здоровой слизистой оболочке полости рта. Согласно исследованию M. Sutinen et al., 1998, в биоптатах здоровой слизистой оболочки щеки отсутствовала экспрессия ТИМП-2 [6]. Q. Liu, Z. Yang, 2020, наблюдали слабовыраженную экспрессию ТИМП-2 в здоровой слизистой оболочке полости рта кролика, характеризующуюся легким желтым окрашиванием в собственной пластинке слизистой оболочки [8]. Shrestha B. et al., 2016, указывали на отсутствие экспрессии ММП-2 и ТИМП-2 в здоровой слизистой оболочке полости рта [9]. Soell M. et al., 2002, напротив, установили повышение экспрессии ТИМП на здоровых участках слизистой, что соответствует гипотезе о том, что разрушение тканей является результатом дисбаланса ММП и ТИМП из-за увеличения уровней ММП и снижения уровня ТИМП [10].

Помимо способности ингибировать коллагенолитическую активность ММП, совокупность результатов исследований экспрессии ТИМП при различных физиологических и патологических состояниях предполагает, что ТИМП являются многофункциональными белками, регулирующими пролиферацию клеток, апоптоз, ангиогенез и активацию про-ММП. Следовательно, данные об иммунореактивности ТИМП-2 могут быть использованы в качестве биомаркера патологических состояний.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить характер экспрессии тканевого ингибитора матричных металлопротеиназ-2 (ТИМП-2) в биоптатах здоровой слизистой оболочки полости рта.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор биопсийного материала был выполнен у 30 соматически здоровых пациентов (24 женщины, 6 мужчин), средний возраст составил $51,7 \pm 12,84$ года. Средний возраст мужчин составил $49,47 \pm 14,89$ года, женщин – $50,55 \pm 13,97$ года. Биоптаты здоровой слизистой оболочки были получены во время дентальной имплантации. У каждого пациента было получено предварительное согласие на медицинское вмешательство.

Для морфометрического анализа выполняли сканирование препаратов, окрашенных с использованием иммуногистохимического метода, с применением цифрового слайд-сканера MoticEasyScan с последующим программным анализом изображений с использованием Aperio Image Scope v12.4.0.5043. 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). Для анализа исследуемых групп по характеру экспрессии

Рис. 1. Результат иммуногистохимического исследования (А) и последующего преобразования изображения в программе Aperio Image Scope (В), где 1 – экспрессия ТИМП-2 в эпителии, 2 – экспрессия ТИМП-2 в строме

Fig. 1. The result of an immunohistochemical study (A) and subsequent image transformation in the Aperio Image Scope program (B), where 1 is the expression of TIMP-2 in the epithelium, 2 is the expression of TIMP-2 in the stroma

вышеназванных маркеров с использованием программы Aperio Image Score 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 (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% процентиля – IQR) и 95% доверительного интервалов, максимального и минимального значения. Для оценки характера распределения полученных данных использовался критерий Шапиро – Уилка (W). Парное сравнение независимых выборок осуществляли с использованием непараметрических методов с определением критерия Манна – Уитни (U-критерий). Уровень статистической значимости устанавливался $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуногистохимическое обнаружение тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы-2 характеризуется гомогенным цитоплазматическим и мембранным окрашиванием эпителия десны, фибробластов, лейкоцитов, гистиоцитов и эндотелиоцитов в коричневый цвет различной интенсивности. В результате исследования эпителиальная и стромальная экспрессия ТИМП-2 наблюдалась во всех проанализированных случаях (рис. 1). Площадь и интенсивность эпителиальной экспрессии характеризовалась как умеренная, стромальная экспрессия была низкой. Также не выявлено зависимости в уровне экспрессии ТИМП-2 от пола пациента (рис. 2). Результаты иммуногистохимического окрашивания биоптатов и их последующий программный анализ изображения представлены на рис. 1.

Рис. 2. Апостериорные (парные) сравнения показателя позитивности групп женщин (0) и мужчин (1) с использованием U-критерия Манна – Уитни ($U_e = 17\ 512$, $p = 0,291$; $U_s = 20\ 302$, $p = 0,812$)

Fig. 2. A posteriori (pairwise) indicators of positivity comparing groups of women (0) and men (1) using the Mann – Whitney U-test ($U_P = 17\ 512$, $P = 0.291$; $U_A = 20\ 302$, $P = 0.812$)

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Умеренная экспрессия ТИМП-2 в здоровой слизистой оболочке полости рта свидетельствует об его участии в регуляции физиологических процессов. Баланс ММП и ТИМП имеет решающее значение для разрушения матрицы соединительной ткани как при физиологических, так и при патологических состояниях. Обнаружение закономерностей экспрессии матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов и установление механизмов их взаиморегуляции открывает новые диагностические и терапевтические возможности использования данных протеаз в качестве биомаркеров патологических процессов в слизистой оболочке полости рта.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Казеко Л.А., Захарова В.А.; сбор и обработка материала – Казеко Л.А., Захарова В.А., Бенеш Ю.Д.; написание текста – Казеко Л.А., Захарова В.А., Бенеш Ю.Д.; редактирование – Казеко Л.А., Захарова В.А.

Authors' contribution: concept and design of the study – Kazeko L., Zakharava V.; collection and processing of material – Kazeko L., Zakharava V., Benesh J.; text writing – Kazeko L., Zakharava V., Benesh J.; editing – Kazeko L., Zakharava V.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Olson M.W., Gervasi D.C., Mobashery S. (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem*, vol. 272, pp. 29975–29983. doi: 10.1074/jbc.272.47.29975
2. De Clerck Y.A., Yean T.-D., Ratzkin B.J. (1989) Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, vol. 264, no 29, pp. 17445–53. doi: 10.1016/S0021-9258(18)71515-9
3. Zhao H., Bernardo M.M., Osenkowski P. (2004) Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, vol. 279, no 10, pp. 8592–601. doi: 10.1074/jbc.M308708200.
4. Hayakawa T., Yamashita K., Ohuchi E. (1994) Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, vol. 107, pt 9, pp. 2373–9.
5. Imren S., Kohn D.B., Shimada H. (1996) Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion. *Cancer Res*, vol. 56, no 13, pp. 2891–5.
6. Sutinen M., Kainulainen T., Hurskainen T. (1998) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *British Journal of Cancer*, vol. 77, no 12, pp. 2239–2245.
7. Ingman T., Tervahartiala T., Ding Y. (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, vol. 23, no 12, pp. 1127–32. doi: 10.1111/j.1600-051x.1996.tb01814.x.
8. Liu Q., Yang Z., Ma N. (2020) MMP-2 and TIMP-2 expression, quantitative analysis and biomechanical changes in scar hypertrophy after autologous free transplantation of rabbit oral mucosa and scrotal skin. *Saudi J Biol Sci*, vol. 27, no 11, pp. 3046–3059. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.07.031
9. Shrestha B., Bajracharya D., Byatnal A.A. (2016) May High MMP-2 and TIMP-2 Expressions Increase or Decrease the Aggressivity of Oral Cancer? *Pathology & Oncology Research*, vol. 23, no 1, pp. 197–206. doi:10.1007/s12253-016-0149-3
10. Soell M., Elkaim R., Tenenbaum H. (2002) Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res*, vol. 81, no 3, pp. 174–178.

Подана/Submitted: 27.10.2021

Принята/Accepted: 25.11.2021

Контакты/Contacts: 1kaf.terstom@gmail.com