

Сычугов Г.В.¹, Казачков Е.Л.¹, Азизова Т.В.², Теплякова О.В.²
Ревина В.С.²

DOI 10.25694/URMJ.2019.10.17

Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы в очагах пневмофиброза у работников плутониевого производства

1 – ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск; 2 – ФГУП «Южно-Уральский институт биофизики» Федерального медико-биологического агентства, г. Озерск, Челябинская область

Sychugov G.V., Kazachkov E.L., Azizova T.V., Teplyakova O.V., Revina V.S.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pneumofoci of pulmonary fibrosis at in workers of a plutonium manufactureproduction facility

Резюме

Цель работы - изучение роли системы матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в патогенезе легочного фиброза, развившегося в исходе хронических воспалительных заболеваний легких у лиц, подвергшихся профессиональному облучению. Изучены морфологические особенности пневмофиброза на аутопсийном материале 69 работников ядерного предприятия ПО «Маяк», с учетом суммарной поглощенной дозы внутреннего альфа-облучения и продолжительности облучения. Обнаружен повышенный уровень матриксных металлопротеиназ (MMP-2 и MMP-9) и их ингибиторов (TIMP-1 и TIMP-2) в очагах пневмофиброза у лиц, подвергавшихся длительное время радиационному профессиональному хроническому облучению.

Ключевые слова: легочный фиброз, матриксные металлопротеиназы, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, профессиональное облучение

Summary

The purpose of this work was to perform – research theThe purpose of the study was to investigate a role of the system of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pathogenesis of inflammatory pulmonary fibrosis induced by chronic lung inflammation in workers with individuals occupationally exposureexposed to ionizing radiation. We investigated morphological characteristics of lung fibrosis based on using autopsy material taken from 69 Mayak Production Association workers taking into account total absorbed dose from internal alpha-radiation and duration of irradiation exposureinto account. Elevated lLevels of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) were found to be increaseddetected in foci of pneumo pulmonary fibrosis in individuals occupationally persons exposed to long-term radiation exposureover prolonged periods.

Key words: pulmonary fibrosis, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, occupational exposure to ionizing radiation

Введение

В медицинской литературе описано множество случаев развития острого радиационного пневмонита (ОРП) после различных событий, сопровождающихся общим или локальным облучением грудной клетки. Как правило, в течение последующего года очаги ОРП замещаются разрастаниями позднего постлучевого фиброза, развивающегося в межальвеолярных перегородках, перимальвеолярной ткани и по ходу стромально-сосудистого каркаса легочной ткани [1]. При этом выявлена зависимость в развитии ОРП и его трансформации в постлучевой фиброз от суммарной поглощенной дозы излучения и про-

должительности облучения [2,3].

Регулярное медицинское наблюдение работников ПО «Маяк» (более 70 лет) с обязательными ежегодными комплексными обследованиями позволило создать регистр зарегистрированных случаев плутониевого пневмофиброза (ППФ) [4 – 87]. В то же время, среди работников ПО «Маяк» регулярно регистрировались случаи пневмофиброза, вызванного наличием хронического неспецифического воспалительного процесса в легочной ткани или декомпенсированной сердечно-сосудистой патологии. При этом во время медицинского обследования не обнаруживалось выраженных клинико-функцио-

нальных и рентгенологических изменений легких характерных для ОРП и ППФ. Молекулярно-биологические аспекты морфогенеза пневмофиброза, в том числе ППФ, до настоящего времени изучены недостаточно. Однако, ведущая роль на современном этапе исследований, отводится матриксным металлопротеиназам (ММП), а также их ингибиторам (ТИМР). Доказана роль ММП-ТИМР в процессах неоангиогенеза, регуляции фибриллогенеза и процессов клеточного обновления [89].

Цель исследования – изучение роли ММП-ТИМР в патогенезе легочного фиброза, развившегося в исходе хронических воспалительных заболеваний легких у лиц, подвергшихся профессиональному облучению с учетом суммарной поглощенной дозы внутреннего альфа-облучения и продолжительности облучения.

Материалы и методы

Исследование проведено на секционном материале 69 работников ядерного предприятия ПО «Маяк». Материал исследования составили 2 группы тканевых образцов легкого (парафиновые блоки). В 1-ую группу вошли 34 случая с пневмофиброзом в исходе хронических воспалительных заболеваний легких (ПФХЗЛ); во 2-ую группу – 35 случаев без легочной патологии (БЛП), идентифицированные на основе медико-дозиметрической базы данных «Клиника» [10].

С целью проведения обзорной микроскопии материала образцы ткани легкого окрашивали гематоксилином и эозином. Для определения соединительнотканного каркаса легочной стромы и очагов пневмофиброза парафиновые срезы окрашивали по методу ван Гизона (выявление общего объема фиброза); по Гомори (на ретикулиновый каркас легочной стромы), по Вейгерту (на эластические волокна).

Проводили углубленное морфологическое изучение аутопсийного материала с применением метода иммуногистохимии (ИГХ). Для иммунного окрашивания использовали пероксидазный метод с полимерной системой детекции (Histofine® Simple Stain MAX PO MULTI, Япония). Срезы инкубировали с моноклональными и поликлональными антителами к ММП-2, ММП-9 (Eritomics, USA), ТИМР-1, ТИМР-2 (Abbotec, USA) во влажной камере 60 мин при температуре 37°C.

Для количественной оценки результатов ИГХ-реакции получали микрофотографии образцов ткани с помощью системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из микроскопа «Carl Zeiss Axioskop 40», цифровой камеры «Jenoptik ProgRes CT3», персонального компьютера на базе Intel® Core™ i7, программного обеспечения «ProgRes CapturePro 2.5». Из фотографии исключали поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты.

Фотосъемку проводили при увеличении 200 (окуляр 10, объектив 20) и 400 (окуляр 10, объектив 40) с полным закрытием апертурной диафрагмы, при поднятом конденсоре, время экспозиции 12 мс, размер изображения 2048x1536 пикселей, графический формат изображения BMP. Дальнейшее количественное исследование прово-

дили с помощью программы компьютерного анализа изображений «Морфология 5.1» (ВидеоТест, Россия). При этом рассчитывали относительную плотность изучаемых структур по отношению к общей площади исследуемого кадра при длине волны 450 нм по методике М.Ю. Смирновой и соавт. [119].

Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» с расчетом медианы и верхнего и нижнего квартилей. Равенство выборочных средних проверяли по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми принимали критерии при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Средний возраст начала работы в условиях контакта с альфа-активными аэрозолями у мужчин составил $28,38 \pm 7,17$ лет (диапазон 18,0 – 50,0), у женщин – $26,79 \pm 5,09$ лет (диапазон 20,0 – 46,0). У преобладающего большинства работников продолжительность работы в контакте с альфа-активными аэрозолями до момента установления диагноза составляла более 10 лет. Диагноз ПФХЗЛ был установлен у работников при жизни и подтвержден на аутопсии.

В образцах 1 группы фокусы пневмофиброза преимущественно определялись по ходу бронхов и сосудов. Во всех случаях в препаратах в областях фиброза выявлялся полиморфноклеточный воспалительный инфильтрат разной степени выраженности. Состав инфильтрата был представлен макрофагами, лимфоцитами, плазмочитами, полиморфноядерными нейтрофилами. ММП-2 и ММП-9 экспрессировались в цитоплазме клеток, преимущественно макрофагов и нейтрофилов, а также в эндотелии сосудов и фибробластических элементов стромы (рис. 1 — *рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала — прим. ред.*). В тканевых образцах 2 группы металлопротеиназы выявлялись только в макрофагах периваскулярной и перибронхиальной стромы (рис. 2). Уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9 в первой группе значительно превалировал над экспрессией во 2 группе (в 1,7 и 4 раза соответственно) (таблица 1).

ТИМР-1 и ТИМР-2 при ИГХ-исследовании выявлялись также в цитоплазме клеток воспалительного инфильтрата стромы, эндотелиальных клетках и фибробластических элементах стромы в образцах первой группы. В тканевых образцах второй группы ТИМР-1 и ТИМР-2 экспрессировались только в цитоплазме макрофагов. Содержание ингибиторов металлопротеиназ в образцах первой группы превалировало над образцами второй группы, без статистической значимости различий (таблица 1).

Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 по своему биологическому действию являются желатиназами и имеют точкой приложения своего воздействия коллаген IV типа и денатурированный коллаген [98]. В литературе отводится большая роль воздействию ММП в развитии пневмосклероза различного генеза, в том числе при системных заболе-

Таблица 1. Содержание матриксных металлопротеиназ и тканевых ингибиторов металлопротеиназ в очагах пневмофиброза и легочной ткани работников ядерного предприятия ПО «Маяк» (в объемных процентах от общего объема образца, об%)

Показатель	Обозначение	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
1 группа					
Число наблюдений	n	34	32	20	20
Медиана	Me	0,837	0,993	0,639	0,661
Ниж.квартиль	QL	0,484	0,585	0,432	0,376
Верх.квартиль	QU	1,762	1,467	1,754	1,160
2 группа					
Число наблюдений	n	35	33	20	20
Медиана	Me	1,413	4,109	1,886	0,878
Ниж.квартиль	QL	0,527	3,16	0,875	0,806
Верх.квартиль	QU	3,4	6,859	3,254	1,050
U-критерий		p=0,044	p<0,001	p=0,103	p=0,22

ваниях соединительной ткани, наследственных синдромах, экспериментальном пневмофиброзе и др. [120,113]. Их протеолитическая активность в основном связана с деградацией компонентов экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). Новые данные показывают, что помимо ремоделирования ЭЦМ, MMP играют ключевую роль в воспалении, клеточной пролиферации и повреждении сосудов. Следовательно, избыток MMP может способствовать воспалительной реакции и приводить к активации фибробластов, что приводит к ускорению фиброза [124].

Активность MMP обычно ингибируется эндогенными тканевыми ингибиторами металлопротеиназ, которые также играют важную роль в поддержании мезенхимального гомеостаза. При этом, опубликованные данные о функциональной роли TIMP-1 в фиброгенезе неоднозначны, хотя преобладают данные, подтверждающие профибротическую функцию TIMP-1 [135]. Кроме того, TIMP-1 оказывает антиапоптотическое действие также в лимфоцитах и эпителиальных клетках, а сверхэкспрессия TIMP-1 в клетках рака молочной железы способствует VEGF-опосредованному ангиогенезу. [146, 175]. Как антиапоптотический, так и проангиогенный эффекты часто рассматриваются как механизмы развития опухоли.

Наши результаты согласуются с предыдущими исследованиями, показывающими повышенные уровни MMP в легочной ткани при предопухоловой и опухолевой патологии легких у лиц, длительное время подвергавшихся воздействию радиационного облучения [8].

Заключение

В развитии поствоспалительного пневмофиброза важную роль играет нарушение баланса между экспрессией матриксных металлопротеиназ и их ингиби-

торов. Относительно высокий уровень MMP в очагах пневмофиброза у лиц, подвергавшихся длительное время радиационному профессиональному внутреннему альфа-облучению, может способствовать разрушению белков экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран и ремоделированию соединительной ткани легких. Кроме того, в результате деградации матрикса под действием MMP, образуются биологически активные соединения, которые влияют на дифференцировку и пролиферацию клеток. Таким образом, нельзя исключить влияние дисбаланса в системе матриксных металлопротеиназ на развитие неопластических процессов в легочной ткани.

Таким образом, наше исследование может предоставить дополнительные данные, касающиеся экспрессии MMP в легочной ткани и их значимости в качестве потенциального гистологического биомаркера с диагностической и прогностической ценностью.■

Сычугов Г.В. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, главный врач ГБУЗ ЧОПАБ, г. Челябинск; *Казачков Е.Л.* – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; *Азизова Т.В.* – к.м.н., зав. клиническим отделом ЮУрИБФ, г. Озерск; *Ревина В.С.* - научный сотрудник ЮУрИБФ, г. Озерск. Автор, ответственный за переписку, - Казачков Е.Л., 454 052, Челябинск, а/я 6132, тел. 8(351)232-01-45, e-mail: doktorkel@narod.ru

Литература:

1. McDonald, S., Rubin, P., Phillips, T.L. et al. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1995. – № 31. – P. 1187–1203.
2. Bentzen, S.M., Skoczylas, J.Z., Bernier, J. Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2000. – № 76. – P. 453–462.
3. Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В., Теплякова О.В., Ревина В.С. Иммуноморфологические особенности пневмофиброза у работников плутониевого производства // *Уральский медицинский журнал.* 2014; 8(122): 71–76.
4. Волкова Л.Г. Пневмосклероз как исход лучевой болезни, вызванной интоксикацией плутония // *Бюл. рад. мед.* – 1961. – № 2 – С. 82–91.
5. Мишачев А.А. К вопросу о профессиональном пневмосклерозе у работников предприятия по переработке плутония-239 // *Бюл. рад. мед.* – 1962. – № 4а – С. 97–100.
6. Никитин В.П. Рентгенодиагностика профессионального плутониевого пневмосклероза // *Бюл. рад. мед.* – 1976. – № 1 – С. 26 – 30.
7. Кошурникова Н.А., Аристов В.П., Лемберг В.К. и др. Некоторые отдаленные последствия поражения плутонием-239 у людей // *Бюл. рад. мед.* – 1978. – № 4 – С. 53–59.
8. Азизова Т.В., Сумина М.В., Беляева З.Д., Григорьева Е.С., Дружинина М.Б., Тепляков И.И. Регистр плутониевого пневмосклероза // *Вопросы радиационной безопасности.* – 2009. – №2ю – С.45 – 54.
9. Сагиндикова Г.Е., Коган Е.А., Сатбаева Э.Б., Парамонова Н.Б. Матриксные металлопротеиназы, их ингибиторы и ангиогенез при различных морфологических вариантах предрака легкого у жителей радиоактивно-загрязненных территорий Семипалатинской области Казахстана // *Арх. патологии.* 2008; 2: 21–5.
10. Azizova T.V., Day R.D., Wald N., Muirhead C.R. et al. The “Clinic” medical-dosimetric database of Mayak Production Association workers: structure, characteristics and prospects of utilization // *Health Phys.* 2008; 94(5): 449–458.
11. Смирнова М.Ю., Джемлиханова Л.Х., Костючек И.Н., Кветной И.М., Нишури Д.А., Пальцев М.А. Количественная иммуногистохимия: оптимизация анализа экспрессии сигнальных молекул в миометрии // *Арх. патологии.* 2010; 4: 51–5.
12. Vafashoar F., Mousavizadeh K., Poormoghim H., Tavasoli A. et al. Gelatinases increase in bleomycin-induced systemic sclerosis mouse model // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2019; 18(2): 182–189.
13. Summer R., Krishna R., Schriener D., Cuevas-Mora K. et al. Matrix metalloproteinase activity in the lung is increased in Hermansky-Pudlak syndrome // *Orphanet J. Rare Dis.* 2019; 14(1): 162.
14. Adamidis K.N., Kopaka M.E., Petraki C., Charitaki E. et al. Glomerular expression of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus in association with activity index and renal function // *Ren Fail.* 2019; 41(1): 229–237.
15. Thiele N.D., Wirth J.W., Steins D., Koop A.C. et al. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice // *Scientific Rep.* 2017; 7: 714.
16. Song T., Dou C., Jia Y., Tu K., Zheng X. TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma // *Oncotarget.* 2015; 6:12061–12079.
17. Yoshiji H. et al. Mammary carcinoma cells overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression // *Int. J. Cancer.* 1998;75:81–87.

Сычугов Г.В., Казачков Е.Л., Азизова Т.В., Ревина В.С.

**Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы в очагах пневмофиброза
у работников плутониевого производства**

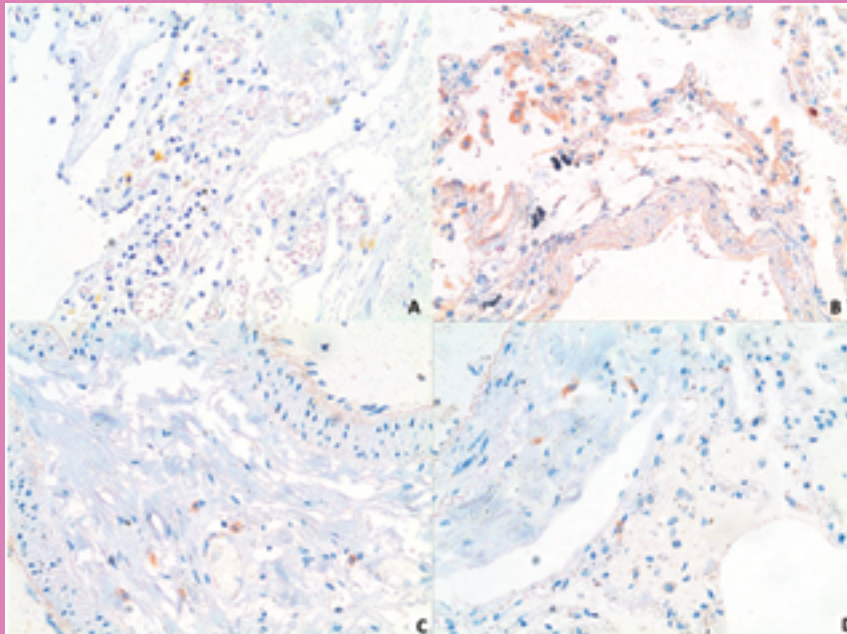


Рис. 1. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и тканевых ингибиторов металлопротеиназ в цитоплазме макрофагов и нейтрофилов, а также в эндотелии сосудов и фибробластических элементах стромы в очагах пневмофиброза в тканевых образцах первой группы. А – MMP-2, В – MMP-9, С – TIMP-1, D – TIMP-2. Иммуногистохимический метод, полимерная тест-система, x400.

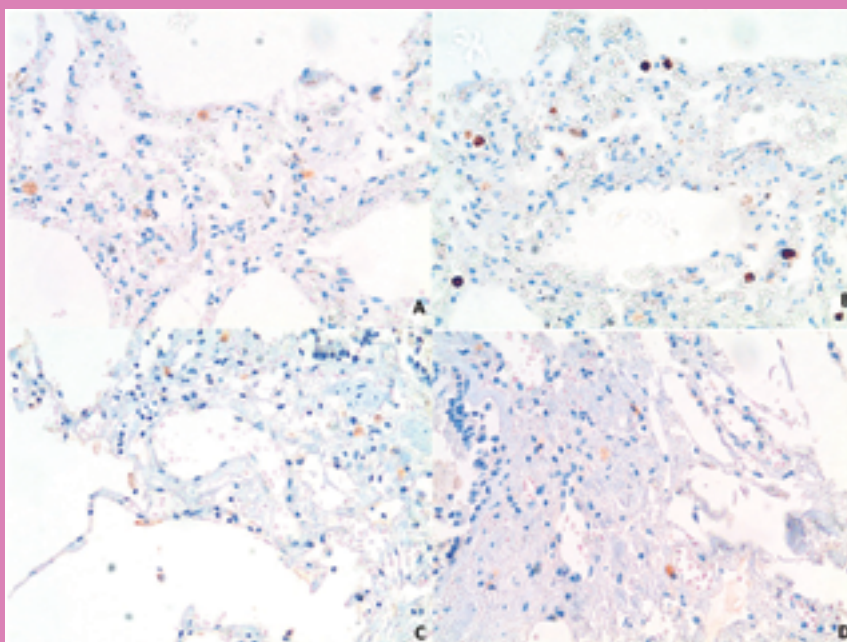


Рис. 2. Экспрессия матриксных металлопротеиназ и тканевых ингибиторов металлопротеиназ в цитоплазме макрофагов и нейтрофилов в периваскулярной и перибронхиальной строме в тканевых образцах второй группы. А – MMP-2, В – MMP-9, С – TIMP-1, D – TIMP-2. Иммуногистохимический метод, полимерная тест-система, x400.