

Моніторинг матриксних металопротеїназ 2 і 9 в травматичних ранах допоміжного апарату ока

О. В. Петренко¹, д-р мед. наук, професор; М. М. Дранко^{1,2}, лікар-офтальмолог, аспірант;
В. В. Корнієнко³, канд. мед. наук, Л. В. Грицай², канд. мед. наук

¹ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика;
Київ (Україна)

² Сумська обласна клінічна лікарня
Суми (Україна)

² Сумський державний університет,
Медичний інститут
Суми (Україна)

E-mail: drankoma@ukr.net

Актуальність. Матриксні металопротеїнази 2 і 9 (ММП-2 і ММП-9) – це ензими, які приймають участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах, включаючи запалення та ангіогенез, що є основою в ремоделюванні та репарації тканин. Тривале запалення та повільне загоєння травматичних ран призводить до формування післяопераційних рубцевих деформацій. Моніторинг активності досліджуваних ферментів може бути біомаркером загоєння посттравматичних ран допоміжного апарату ока (ДАО).

Мета. Дослідити вміст ММП-2 і ММП-9 в посттравматичних ранах допоміжного апарату ока, їх рівень в тканинах в залежності від давності травми.

Матеріал та методи. Обстежено 60 пацієнтів з травматичними ранами ДАО різної давності (від одної години до трьох тижнів з моменту травми). Біопсію тканин брали під час хірургічної обробки ран з послідовним заморожуванням. Дві групи дослідження: контрольна (здорові тканини, отримані в результаті проведення блефаропластики) та основна (травмовані тканини). Рівні ММП-2 та ММП-9 оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА). Після зчитування поглинання кожної мікродунки на спектрофотометрі Thermo Scientific Multiskan FC з використанням довжини хвилі 450 нм, розраховували середні значення поглинання для кожного з повторюваних стандартів та зразків. Результати обох груп порівнювали відносно оптичної щільності у відповідності до постановки експерименту за давністю травми.

Результати. Встановлено підвищення рівня ММП-2 і ММП-9 у біоматеріалах з травматичних ран відносно контрольних зразків. За допомогою ІФА-систем виявлено, що пік експресії ММП-2 припадає на третю добу з моменту травми, перевищуючи показники контрольних зразків на 85%. З 7-ї і до 15-ї доби відмічається спад ММП-2 до показників близьких рівня першої доби (перевищує на 15%). З 15-ї до 21-ї доби знову спостерігається підвищення рівня ММП-2 на 35%. Показники експресії ММП-9 значно вищі, ніж у ММП-2. Пік активності ММП-9 припадає на четверту добу, перевищуючи показники контрольних зразків на 155%. З четвертої по сьому добу визначається спад показників, які перевищують вихідні на 85%. З 8-ї до 15-ї доби спостерігається знову їх експресія до 100% від контрольних показників, а потім знову йде поступовий спад до 21-ї доби.

Висновки. Дослідження матриксних металопротеїназ 2 і 9 в травматичних ранах допоміжного апарату ока різної давності показало, що пік експресії ММП-2 припадає на третю добу з моменту травми, а ММП-9 – на четверту. Зниження рівня обох ензимів відмічається на сьому добу з послідовними коливаннями. До 21-ї доби рівень ММП-2 та ММП-9 досягає контрольних показників.

Ключові слова:

матриксні металопротеїнази 2 і 9, травматичні рани, загоєння ран, допоміжний апарат ока, імуноферментний аналіз

Актуальність. Загоєння травматичних ран допоміжного апарату ока (ДАО) – це складний механізм з множинними процесами, які гармонійно поєднуються для структурного та функціонального відновлення травмованої тканини. Інфіковані та хронічні рани, які супроводжуються тривалим запаленням та повільним загоєнням, є тяжким клінічним ускладненням, оскільки такі рани завершуються дефектною реепітелізацією і небажаним формуванням післяопераційного рубця [1]. Матриксні металопротеїнази (ММП) є основними ферментами ремоделювання та репарації тканин,

оскільки вони сприяють міграції фібробластів і клітин ендотелію в строму, приймають участь в активації чи, навпаки, деактивації факторів росту клітин, біологічно активних молекул, регулюють клітинне зростання та апоптоз, що в кінцевому результаті забезпечує баланс між синтезом та деградацією колагену [2,6,8]. В нормальних фізіологічних умовах рівень матриксних металопротеїназ та їх активність строго контролюються

багатьма факторами. Матриксні металопротеїнази 2 і 9 – це желатинази, які руйнують аморфний колаген і фібронектин [2,3,4]. Розуміння ролі MMP-2 і MMP-9 в процесі загоєння ран ДАО, дослідження їх експресії в травматичних ранах, пошуки шляхів регуляції складної взаємодії цих ензимів з молекулами екстрацелюлярного матриксу здатні відкрити нові можливості в лікуванні інфікованих і хронічних ран, які часто призводять до функціонально-косметичних та рубцевих ускладнень.

Аналіз доступної наукової літератури показав, що металопротеїнази при раневому процесі допоміжного апарату ока в офтальмології висвітлено фрагментарно, оскільки основна увага при дослідженні травматичних пошкоджень органа зору приділяється безпосередньо очному яблуку (передньому відрізу ока, оптичним середовищам, оболонкам очного яблука, зоровому нерву). Це спонукало нас до дослідження даної теми.

Мета роботи

Дослідити вміст MMP-2 і MMP-9 в посттравматичних ранах ДАО, їх рівень в тканинах в залежності від давності травми.

Матеріал і методи

Обстежено 60 пацієнтів з травматичними пошкодженнями ДАО різної давності (від 1 години до трьох тижнів з моменту травми), які зверталися до кабінету невідкладної допомоги відділення мікрохірургії ока КНП СОР «Сумська обласна клінічна лікарня». За категоріями відбирали хворих з травматичними інфікованими або гнійними ранами; за характером пошкодження: різані, колоті, забиті, рвані, рубані, розчавлені, укушені, вогнепальні, змішані; за основним причинним фактором: механічні (травматичні), хімічні, термічні, трофічні. Пацієнтам проводили обстеження та лікування згідно стандартів надання медичної допомоги. Дослідження проводили з виконанням заходів щодо забезпечення безпеки та здоров'я пацієнтів, дотримання їх прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності із принципами Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та відповідних законів України. Процедура біопсії травмованих тканин у даних осіб відповідала нормативам етичного комітету (рішення експертів комісії з питань етики НМАПО ім. П.Л. Шупика, Протокол засідання №1 від 09.01.2020р.). Біопсію тканин брали під час хірургічної обробки травматичних ран з послідовним заморожуванням. Формували дві групи дослідження: контрольну (здорові тканини, отримані в результаті проведення блефаропластики) та основну (травмовані тканини).

Зразки травмованих тканин ДАО (100 мг) промивали у натрій-фосфатному буфері (Phosphate buffered saline, PBS), потім гомогенізували в 1 мл PBS і зберігали протягом ночі при -20°C . Після двох циклів заморожування-розморожування для розриву клітинних мембран гомогенати центрифугували протягом 5 хвилин при 5000 об/хв. Надосадкову рідину збирали та

досліджували. Визначення значень MMP-2 і MMP-9 проводилося на базі Центру колективного користування науковим обладнанням Медичного інституту Сумського державного університету. Відповідно до інструкцій виробника, рівні MMP-2 (E-EL-H1445, Human MMP-2, Elabscience Biotechnology Co., Ltd) та MMP-9 (BMS2016/2 Human MMP-9, Affymetrix eBioscience, Bender MedSystems GmbH) оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА). Після зчитування поглинання кожної мікролуки на спектрофотометрі Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США) з використанням довжини хвилі 450 нм, розраховували середні значення поглинання для кожного з повторюваних стандартів та зразків. Щоб визначити концентрацію MMP-2 та MMP-9 (нг/мл) для кожного зразка, ми створили стандартну криву, використовуючи комп'ютерне програмне забезпечення (Skanlt 4.1 для мікропланшетних зчитувачів), здатне генерувати п'ятипараметричну логістичну (5-PL) криву. Чутливість методу становила 0,47 нг/мл для MMP-2 та 0,05 нг/мл для MMP-9. Результати обох груп порівнювали відносно оптичної щільності у відповідності до постановки експерименту за давністю травми.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення SPSS версії 8.0 (SPSS Inc., Чикаго, Іллінойс, США). Результати виражалися як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення. Для визначення рівня значущості використовували односторонній дисперсійний аналіз ($p < 0,05$ визначали як значущий).

Результати

MMP-2 і MMP-9 – це желатинази, які приймають участь у багатьох фізіологічних та патологічних процесах, включаючи запалення та ангіогенез. При раневому процесі активність даних ферментів залежить від термінів травми.

В результаті дослідження встановлено достовірне підвищення рівня MMP-2 і MMP-9 у біоматеріалах з травматичних ран відносно контрольних зразків. За допомогою ІФА-систем виявлено, що пік експресії MMP-2 припадає на третю добу з моменту травми, перевищуючи показники контрольних зразків на 85%. З 7-ї і до 15-ї доби відмічається спад MMP-2 до показників близьких рівня першої доби (перевищує на 15%). З 15-ї до 21-ї доби знову спостерігається підвищення рівня MMP-2 на 35%, що, можливо, пов'язано з процесами проліферації. Показники експресії MMP-9 значно вищі, ніж у MMP-2. Пік активності MMP-9 припадає на четверту добу, перевищуючи показники контрольних зразків на 155%. З четвертої по сьому добу визначається спад показників, які перевищують контрольні на 85%. З 8-ї до 15-ї доби спостерігається знову експресія до 100% від контрольних показників, а потім знову йде поступовий спад до 21-ї доби. Дані коливання можна пояснити клітинним складом посттравматичних ран, оскільки відомо, що ензими MMP-2 і MMP-9 секретуються нейтрофілами, фібробластами і макрофа-

гами. Далі самі желатинази регулюють загоснення рани через вплив на запалення, перебудову позаклітинного матрикса та реепітелізацію. Було встановлено, що середньогрупові показники металопротеїназ-2 та -9 змінюються в динаміці спостереження залежно від терміну після травми (рис. 1). Показники експресії ММП-9 значно вищі, ніж у ММП-2, і достовірно перевищують рівні ММП-2 на 1 день та 2 тижні після ушкодження ($p < 0,01$). Пік експресії обох металопротеїназ припадає на ранній посттравматичний період та перевищував у 2,5 рази для ММП-9 та майже у 1,5 рази для ММП-2 контрольні показники на 1 добу спостереження. Зниження рівня експресії на 1 тиждень змінювалося повторним достовірним ($p < 0,01$) збільшенням концентрації ММП-9 в досліджуваних зразках до 100% від контрольних показників на другому тижні. Проте рівень ММП-2 зберігався підвищеним протягом 1 тижня (пік експресії) та зменшувався майже до рівня контрольних зразків вже на другому тижні після травми. Таким чином, поступовий спад концентрації до однакового рівня обох металопротеїназ відбувався до 3 тижня спостереження.

Обговорення

Динаміка концентрацій металопротеїназ у тканинах ока після пошкодження свідчить про можливу їх участь у процесі ранового загоснення як маркера активності запалення та деградації екстрацелюлярного матрикса в результаті пошкодження тканин [4, 5]. Відомо, що ММП-2 разом з ММП-9 приймають участь у деградації колагену 4 типу як основного компоненту базальної мембрани. ММП-2 також здатна руйнувати еластин та фібронектин, модулюючи функції різних білків та регулюючи таким чином рівень запалення, викликаючи вазоконстрикцію залежно від концентрації її у тканинах [7]. Коливання рівней металопротеїназ можна пояснити клітинним складом посттравматичних ран, оскільки ензими ММП-2 і ММП-9 секретуються нейтрофілами, фібробластами і макрофагами. Далі самі желатинази регулюють загоснення рани через вплив на запалення, перебудову позаклітинного матриксу та реепітелізацію [8]. Незважаючи на причетність до рівня запалення та ушкодження тканин, підвищені рівні ММП-2 та ММП-9 прискорюють ремоделювання тканин. Почерговість активації металопротеїназ свідчить про реакцію тканин ока на ушкодження та вмикання патогенних механізмів (ММП-9), а також адаптаційно-приспосувальну реакцію щодо пригнічення локального запалення на фоні деградації екстрацелюлярного матриксу (ММП-9) [6].

Висновки

Дослідження активності матриксних металопротеїназ 2 і 9 в ранах пацієнтів з травматичними пошкодженнями ДАО різної давності показало, що пік експресії ММП-2 припадає на третю добу з моменту травми, а ММП-9 – на четверту. Зниження рівня обох ензимів відмічається на сьому добу з наступними коливаннями. До 21-ї доби рівень ММП-2 та ММП-9 дося-

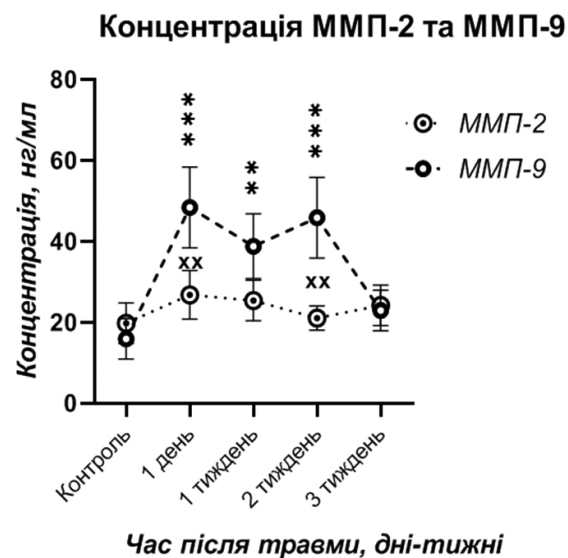


Рис. 1. Концентрація ММП-2 та ММП-9 у тканинах ока в різні терміни після травматичних пошкоджень допоміжного апарату ока.

Примітки. * – позначає достовірну різницю між дослідними зразками та контролем (** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$); x – вказує на достовірні відмінності між рівнями металопротеїназ-2 та 9 (xx – $p < 0,01$).

гає контрольних показників. Коливання рівней металопротеїназ можна пояснити клітинним складом тканин травматичних ран. Підвищення рівня ММП-2 і ММП-9 свідчить про активацію процесів неоангіогенезу, що може бути обумовлено зсувом проангіогенної рівноваги на фоні тривалого запального процесу. Також підвищення даних ензимів може бути маркером процесів ремоделювання позаклітинного матриксу, що являється показником запалення в травматичних ранах. Розуміння патологічних явищ, пов'язаних з ММП-2 та ММП-9 під час загоснення ран, може стати можливістю для регуляції репарації та виявлення нових медикаментозних методів лікування інфікованих ран та ран, які тривало не загоюються.

Література

1. Петренко О. В. Особливості клініки та лікування післятравматичних дефектів допоміжного апарату ока / О. В. Петренко // Архів офтальмології України. – 2015. – Т. 3, № 2. – С. 38-43.
2. Петренко О. М. Моніторинг перебігу ранового процесу у гнійних ранах / О. М. Петренко, Б. Г. Безродний, А. О. Тихомиров // Хірургія України. – 2014. – № 2. – С. 65-69.
3. Петренко О. М. Зміни активності матриксних металопротеїназ у хронічних ранах м'яких тканин у хворих на цукровий діабет при застосуванні вакуумної терапії / О. М. Петренко, А. О. Тихомиров, О. В. Петренко // Клінічна хірургія. – 2016. – № 6. – С. 58-60.
4. Соколов В.А., Лихванцева В.Г., Леванова О.Н. и др. Экспрессия матриксных металлопротеиназ в слезе и полиморфизм гена фактора комплемента H (CFH) у боль-

- ных первичной открытоугольной глаукомой // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, № 5. – С.547-556.
5. **Chamanga E.** Effectively managing wound exudates / E. Chamanga // Br. J. Commun. Nurs. – 2015. – Suppl. Wound Care: S8, S10.
 6. **Le N.T.** The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation // Front Biosci. – 2007. – Vol.12. – P.1475-1487.
 7. **Nagase H., Visse R., Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs // Cardiovascular Research. – 2006. – Vol.69. – №3. – P. 562-573.
 8. **Rohani M. G.** Matrix remodeling by MMPs during wound repair / M.G. Rohani, W. C. Parks // Matrix Biol. – 2015. – Vol. 44-46. – P. 113-121.

Подяка: Центру колективного користування науковим обладнанням Медичного інституту Сумського державного університету

Джерело підтримки: Центр колективного користування науковим обладнанням Медичного інституту Сумського державного університету.

Конфлікт інтересів: засвідчуємо, що не маємо жодного реального чи потенційного конфлікту інтересів (фінансового, персонального, професійного чи іншого), який би міг вплинути на нашу думку стосовно предмету чи матеріалів описаних та обговорених в даному рукописі.

Поступила 31.05.2021

Мониторинг матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в травматических ранах вспомогательного аппарата глаза

Петренко О. В., Дранко М. М., Корниенко В. В., Грицай Л. В.

Национальный университет здравоохранения Украины имени П. Л. Шупика; Киев (Украина)

Сумская областная клиническая больница (Сумы, Украина)

Сумской государственной университет, Медицинский институт (Сумы, Украина)

Актуальность. Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 (ММП-2 и ММП-9) – это ферменты, которые принимают участие во многих физиологических и патологических процессах, включая воспаление и ангиогенез, что лежит в основе ремоделирования и репарации тканей. Длительное воспаление и медленное заживление травматических ран приводит к формированию послеоперационных рубцовых деформаций. Результаты мониторинга активности исследуемых ферментов могут быть биомаркером заживления посттравматических ран вспомогательного аппарата глаза (ВАГ).

Цель. Исследовать содержание ММП-2 и ММП-9 в посттравматических ранах вспомогательного аппарата глаза, их уровень в тканях в зависимости от давности травмы.

Материал и методы. Обследовано 60 пациентов с травматическими ранами ВАГ разной давности (от одного часа до трёх недель с момента травмы). Биопсию тканей брали во время хирургической обработки ран с последующим замораживанием. Две группы исследования: контрольная (здоровые ткани, полученные в результате проведения блефаропластики) и основная (травмированные ткани). Уровни ММП-2 и ММП-9 оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). После считывания поглощения каждой микролуны на спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan FC с использованием длины волны 450 нм, рассчитывали средние значения поглощения для каждого из повторяющихся стандартов и образцов. Результаты обеих групп сравнивали относительно

но оптической плотности в соответствии к постановке эксперимента по давности травмы.

Результаты. Установлено повышение уровня ММП-2 и ММП-9 в биоматериалах с травматическими ранами относительно контрольных образцов. С помощью ИФА-систем выявлено, что пик экспрессии ММП-2 отмечается на третьи сутки с момента травмы, превышая показатели контрольных образцов на 85%. С 7-х и до 15-х суток отмечается спад ММП-2 до показателей близких уровня первых суток (превышает на 15%). С 15-х до 21-х суток снова наблюдается повышение уровня ММП-2 на 35%. Показатели экспрессии ММП-9 значительно выше, чем в ММП-2. Пик активности ММП-9 отмечено на четвертые сутки, превышая показатели контрольных образцов на 155%. С четвертых по седьмые сутки наблюдается спад показателей, которые превышают исходные на 85%. С 8-х по 15-е сутки отмечено снова экспрессию до 100% от контрольных показателей, а потом опять идёт постепенный спад до 21-х суток.

Выводы. Исследования матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в травматических ранах вспомогательного аппарата глаза разной давности показало, что пик экспрессии ММП-2 отмечается на третьи сутки с момента травмы, а ММП-9 – на четвертые. Снижение уровня обоих ферментов наблюдается на седьмые сутки с последующими колебаниями. К 21-м суткам уровень ММП-2 и ММП-9 достигает контрольных показателей.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы 2 и 9, травматические раны, заживление ран, вспомогательный аппарат глаза, иммуноферментный анализ