

## Характеристика експресії MMP-9 і TIMP-1 при різному рівні імуноклітинної інфільтрації печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С

Запорізький державний медичний університет

**Ключові слова:** матриксні металопротеїнази, тканинні інгібітори матриксних металопротеїназ, фіброз, цироз печінки, вірусний гепатит.

Мета дослідження полягала у визначенні клітин-продуцентів і відмінностей в експресії металопротеїнази MMP-9 та її тканинного інгібітора TIMP-1 при фіброзі і цирозі печінки на фоні різної активності хронічного вірусного гепатиту С. Аналіз 20 трепанобіоптатів печінки хворих на вірусний гепатит С показав, що експресія MMP-9 і TIMP-1 відбувається в численних активованих зірчастих клітинах печінки, клітинах Купфера, гепатоцитах, лімфоцитах і зростає при підвищенні рівня імуноклітинної інфільтрації печінки.

### Характеристика экспрессии MMP-9 и TIMP-1 при фиброзе и циррозе печени у больных хроническим вирусным гепатитом С

Ю.А. Шебеко

Целью исследования стало определение клеток-продуцентов и отличий в экспрессии металлопротеиназы MMP-9 и ее тканевого ингибитора TIMP-1 при фиброзе и циррозе печени на фоне различной активности хронического вирусного гепатита С. Анализ 20 трепанобиоптатов печени больных вирусным гепатитом С показал, что экспрессия MMP-9 и TIMP-1 происходит в активированных звездчатых клетках печени, клетках Купфера, гепатоцитах, лимфоцитах и возрастает при повышении иммуноклеточной инфильтрации печени.

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, фиброз, цирроз печени, вирусный гепатит.

**Патология.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 111–113

### Data about MMP-9 and TIMP-1 expression in liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic viral hepatitis C

Yu.A. Shebeko

Research aim was to determine cells-sources and differences of MMP-9 and TIMP-1 expression in liver fibrosis and cirrhosis with different activity of chronic viral hepatitis C. Analysis of 20 biopsies of liver with chronic viral hepatitis C revealed that expression of MMP-9 and TIMP-1 occurs in increased amount of hepatic stellate cells, Kupffer cells, hepatocytes and lymphocytes and enhances at rising of immunocellular infiltration in liver.

**Key words:** matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, liver fibrosis and cirrhosis, viral hepatitis.

**Pathologia.** 2011; 8(2): 111–113

Фіброз печінки, зумовлений хронічним вірусним гепатитом С (ХВГС), розвивається в результаті поєднання тривалого імуноклітинно-деструктивного процесу, неефективної регенерації і, головне, посиленої продукції активованими зірчастими клітинами печінки (ЗКП) колагенів та інших компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ) з подальшим їх надмірним накопиченням, що в результаті призводить до порушення нормальної архітекtonіки печінки і розвитку цирозу [8,9]. Важливу роль у регуляції фіброгенезу і фібролізу в печінці при ХВГС відіграє родина Zn-залежних ендопептидаз-матриксних металопротеїназ (MMP) та їх тканинних інгібіторів (TIMP) [1,4,7], що забезпечують підтримку гомеостазу позаклітинного матриксу печінки і в нормі [10,17]. Хронічне ушкодження печінки при ХВГС провокує збільшення експресії MMP і TIMP активованими ЗКП [1,4,18]. Відомо, що інші клітини також можуть бути джерелом експресії MMP та їх інгібіторів при ХВГС [5,7]. Вагомий вплив на еволюцію фіброзу печінки при її хронічних захворюваннях здійснюють желатиназа А (MMP-2), желатиназа В (MMP-9) і стромелізин (MMP-3) [17,18], що забезпечують деградацію компонентів ПКМ (колагену, фібронектину, ламініну, еластину тощо), і їх

тканинні інгібітори TIMP-1 і TIMP-2, що пригнічують процес фібролізу і сприяють прогресії фіброзу [1,18]. Однак складні молекулярно-клітинні механізми регуляції експресії, активації і взаємодії MMP і TIMP та їх вплив на фіброз печінки при ХВГС остаточно не визначені й потребують подальшого вивчення для розробки ефективної терапії з метою запобігання прогресії фіброзу в цироз печінки.

#### Мета роботи

Визначити клітини-джерела й відмінності експресії MMP-9 і TIMP-1 при різному рівні імуноклітинної інфільтрації печінки у хворих на ХВГС.

#### Матеріали і методи дослідження

Проведено комплексне гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне дослідження трепанобіоптатів печінки 20 хворих на ХВГС віком від 16 до 64 років. У якості умовного контролю взято 5 трепанобіоптатів нормальної печінки без вірусного гепатиту С. Тканину печінки фіксували в забуференому 10% формаліні, заливали у парафін, на ротаційному мікростомі НМ 3600 (Німеччина) робили серійні гістологічні зрізи завтовшки 3–4 мкм. Виразність імуноклітинної інфільтрації, як показник гістологічної

активності ХВГС, оцінювали в зрізах тканини печінки, забарвлених гематоксилином і еозином, за кількістю вогнищ імуноклітинного кілінгу і перипортальних імуноклітинних «ступінчастих некрозів» та інтенсивністю імуноклітинної інфільтрації портальних трактів. Ступінь фіброзу визначали в зрізах печінки, забарвлених за Ван Гізон і трихром-Масон, згідно напівкількісним системам градації фіброзу METAVIR [16] і V. Desmet зі співавт. [3]. У фіксованих парафінових зрізах печінки визначали експресію MMP-9 і TIMP-1 непряним імунопероксидазним методом з використанням моноклональних антитіл до MMP-9 і TIMP-1 і системи візуалізації DAKO En Vision+ з діамінбензидином (Данія).

### Результати та їх обговорення

Згідно градації фіброзу за METAVIR і V. Desmet зі співавт. в гістологічних зрізах печінки, забарвлених за Ван Гізон і трихром-Масон, слабкий фіброз (F1) виявлено у 4 хворих, помірний фіброз (F2) встановлено в 6 випадках, у 4 пацієнтів визначався тяжкий фіброз (F3), у 3 хворих діагностовано неповний септальний цироз (F3–F4) і в 3 випадках виявлявся сформований мікронодулярний цироз печінки (F4). В групі контролю фіброз печінки відсутній (F0). У гістологічних зрізах печінки, забарвлених гематоксилином та еозином, ХВГС зі слабкою імуноклітинною інфільтрацією виявлено у 7 хворих, помірною інфільтрацією – у 7 хворих, виражена інфільтрація – у 6 хворих. Слабка імуноклітинна інфільтрація визначалась у хворих на ХВГС переважно зі слабким і помірним фіброзом (F1–F2), у 2 хворих зі стабільним старим тяжким фіброзом (F3) і 1 хворого зі сформованим цирозом печінки (F4) без прогресії. Помірна імуноклітинна інфільтрація визначалась у прогресуючих випадках помірного-тяжкого фіброзу (F2 і F3), виражена – при прогресуючих тяжкому фіброзі й цирозі печінки (F3 і F4).

Імуногістохімічне дослідження виявило певні особливості й відмінності експресії MMP-9 і TIMP-1 в нормальній печінці і при ХВГС різної активності з різним ступенем фіброзу і цирозом. MMP-9 (желатиназа В) руйнує такі компоненти ПКМ, як колагени IV, V, VII, X, XIV типів, желатин, еластин, фібронектин тощо. Відомо, що в нормі основним джерелом MMP-9 в печінці є тканинні макрофаги печінки (клітини Купфера) [13] і зірчасті клітини печінки (перисинусоїдальні клітини Іто) – головні продуценти компонентів ПКМ, в яких фермент секретується переважно у проензимній формі про-MMP-9 (прожелатиназа В) і надалі активується плазміном або стромелізином (MMP-3) [17]. Виявлено слабку, у вигляді дифузних скупчень дрібних коричневих гранул, цитоплазматичну експресію MMP-9 у поодиноких більш крупних клітинах Купфера і подовжених з відростками перисинусоїдальних клітинах Іто в тканині нормальної печінки.

Основним блокаторм MMP-9 є специфічний інгібітор TIMP-1 [11], що в нормі продукується ЗКП [17] і відіграє важливу роль у прогресії фіброзу печінки. При імуногістохімічному дослідженні нормальної печінки виявлялась слабо виражена цитоплазматична експресія TIMP-1 у вигляді світло-коричневих дрібних гранул у поодиноких перисинусоїдальних клітинах Іто або була відсутня вза-

галі. Мізерна кількість чи відсутність MMP-9 і TIMP-1 у клітинах-продуцентах у досліджуваному матеріалі здорової тканини печінки свідчить про збалансований стан ПКМ, відсутність запально-деструктивних процесів і активацію фіброзу в печінці.

Імуногістохімічне дослідження наявності й локалізації MMP-9 у трепанобіоптатах печінки виявило значне збільшення MMP-9-позитивних клітин Купфера і ЗКП у хворих на ХВГС. Фіброгенез на фоні ХВГС зумовлений активацією ЗКП-резидентів, міофібробластів портальних трактів, колагенпродукуючих міофібробластів, трансформованих з гемопоетичних стовбурових клітин-мігрантів, а також з епітелію дрібних жовчних холангіол і гепатоцитів у результаті епітеліально-мезенхімального переходу, які в сукупності під впливом стимулюючих цитокінів, таких як IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF тощо, стають додатковим джерелом посиленої продукції MMP-9 [7,14]. У порівнянні з нормою, визначалась більш виражена, у вигляді щільних темно-коричневих скупчень дрібних гранул, цитоплазматична експресія MMP-9 у крупних тканинних макрофагах печінки і подовжених відростчатих перисинусоїдальних клітинах Іто, а також у численних гепатоцитах у вигляді дрібних окремих коричневих гранул. Визначалась MMP-9-позитивна цитоплазматична реакція в окремих клітинах імуноклітинних інфільтратів портальних трактів, «ступінчастих некрозів», у внутрішньодолькових вогнищах імуноклітинного кілінгу гепатоцитів. За даними інших авторів, лімфоцити також можуть бути додатковими продуцентами MMP-9 при ХВГС [14]. Збільшення експресії MMP-9 при ХВГС підтверджено іншими дослідженнями [6].

Встановлено, що виразність експресії MMP-9 і кількість MMP-9-позитивних клітин залежали від інтенсивності імуноклітинної інфільтрації в печінці при ХВГС і зростали при підвищенні її рівня. Не виявлено прямої залежності між експресією MMP-9 і ступенем фіброзу печінки. Так, у випадках прогресуючого помірного фіброзу F2 або прогресуючого тяжкого фіброзу-цирозу печінки (F3–F4) на фоні вираженої імуноклітинної інфільтрації визначалась значна експресія MMP-9 (рис. 1, кольор. вкладка 3), водночас як при слабкому фіброзі F1, так і при тяжкому старому фіброзі F3 або стабільному сформованому цирозі печінки F4 на фоні слабкої імуноклітинної інфільтрації експресія MMP-9 була незначною (рис. 2, кольор. вкладка 3). За даними Giannelli et al., експресія та активність MMP-9 знижувалась у хворих на ХВГС, що позитивно відповідали на терапію  $\alpha$ -інтерфероном ( $\alpha$ -IFN) і рибавірином, і залишалась незмінною у інтактних до цих препаратів хворих [12], що також свідчить про прямий зв'язок між експресією MMP-9 і активністю ХВГС. Достеменно не відома роль металопротеїназу у регуляції імунної відповіді при ХВГС. Однак, враховуючи, що HCV-інфекція посилює генну експресію та активність металопротеїназу, можна допустити, що вони відіграють певну роль в імунній відповіді при ХВГС шляхом впливу на родину CXCR3 хемокінів. Так, у відповідь на стимуляцію  $\alpha$ -IFN і  $\alpha$ -TNF, гепатоцити, ЗКП, ендотелій синусоїдів виділяють найбільш важливі в патогенезі ХВГС хемокіни CXCR3 (CXCL9 [2], CXCL10 і CXCL11 [15]). При HCV-інфекції збільшена у

кількості й за активністю MMP-9 активно руйнує й інактивує CXCL9, CXCL10 та CXCL11, що призводить до зменшення кількості CXCR3-позитивних Т-лімфоцитів і, в такий спосіб, значно послаблює імунну відповідь і пригнічує Т-лімфоцитарну ланку імуноклітинного запалення [14]. Такий вплив MMP-9 може сприяти розвитку специфічної імунної толерантності до HCV-інфекції та прогресії фіброзу печінки в цироз на фоні ХВГС.

Імуногістохімічне дослідження тканин печінки хворих на ХВГС виявило значне збільшення експресії TIMP-1 у порівнянні з нормою. Зростання рівня TIMP-1 у декілька разів при активації фіброгенезу підтверджено іншими дослідженнями [17]. За даними Lichtinghagen R et al., HCV-інфекція стимулює посилену експресію м-РНК TIMP-1 [6]. Основними продуцентами TIMP-1, як і MMP-9, визначено активовані ЗКП [7,9,17]. Однак додатковими джерелами, особливо на ранніх стадіях хронічного ушкодження печінки, можуть бути гепатоцити й клітини Купфера [7]. Виявлено зростання експресії TIMP-1 при збільшенні імуноклітинної інфільтрації в печінці при ХВГС. Спостерігали виражену, у вигляді щільних коричневих дрібнозернистих скупчень, цитоплазматичну експресію TIMP-1 в активованих ЗКП, клітинах Купфера і менш виражену експресію в гепатоцитах. Також визначали позитивну експресію в лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів портальних трактів (рис. 3, 4, кольор. вкладка 3), «ступінчастих некрозів» і вогнищ імуноклітинного килінгу гепатоцитів, що свідчить не тільки про опосередкований вплив, але й про вірогідну пряму участь лімфоцитів у зростанні TIMP-1. Експресія TIMP-1 регулюється декількома запальними цитокінами: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  [7]. Вірогідно, цим частково пояснюється виявлена нами слабка експресія TIMP-1 на ранніх стадіях фіброзу або при вже розвинутому тяжкому фіброзі F3 на фоні мінімальної активності ХВГС. Недостатня кількість і низька активність TIMP-1 звільняє блоковані металопротеїнази й у такий спосіб сприяє уповільненню і стабілізації фіброзу або навіть його регресії, а також посилює проліферацію гепатоцитів [7].

#### Висновки

1. У тканині нормальної здорової печінки при збалансованому стані ПКМ й за відсутності активації фіброгенезу основними клітинами-продуцентами MMP-9 є поодинокі клітини Купфера і ЗКП, а головним джерелом TIMP-1 – ЗКП.

2. При активному перебігу ХВГС значно зростає експресія MMP-9 і TIMP-1 численними активованими ЗКП і активованими макрофагами Купфера, гепатоцитами й лімфоцитами.

3. Експресія MMP-9 і TIMP-1 у печінці у хворих на ХВГС зростає при підвищенні рівня імуноклітинної інфільтрації печінки.

#### Література

1. *Bataller R.* Liver fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115 (2). – P. 209–218.
2. Carboxyterminal Cleavage of the Chemokines MIG and IP-10 by Gelatinase B and Neutrophil Collagenase / P.E. Van den Steen, S.J. Husson, P. Proost [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 310. – P. 889–896.
3. Classification of chronic hepatitis diagnosis, grading and staging / V.J. Desmet, M. Gerber, J.H. Hoofnagle [et al.] // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 19. – P. 1513–1520.
4. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thioacetamide-induced chronic liver injury / S.Y. Park, H.W. Shin, K.B. Lee [et al.] // *J. Korean Med Sci.* – 2010. – Vol. 25. – P. 570–576.
5. Differential role of p38 in IL-1 $\alpha$  induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line / H.S. Lee, L.H. Miao, C.H. Chen [et al.] // *J. Biomed Sci.* – 2003. – Vol. 10. – P. 757–765.
6. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis / R. Lichtinghagen, M.J. Bahr, M. Wehmeier [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 2003. – Vol. 105. – P. 373–382.
7. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies / S. Hemmann, J. Graf, M. Roderfeld [et al.] // *J Hepatol.* – 2007. – Vol. 45 (5). – P. 955–975.
8. *Friedman S.L.* Liver fibrosis – from bench to bedside / S.L. Friedman // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38. – P. 38–53.
9. *Friedman S.L.* Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury / S.L. Friedman // *J. Of Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275 (4). – P. 2247–2250.
10. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver / León M. Garcíade, I. Montfort, E. Tello Montes [et al.] // *Exp and Mol Path.* – 2006. – Vol. 80 (1). – P. 97–108.
11. *Iredale J.P.* Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis / J.P. Iredale // *Int J Biochem Cell Biol.* – 1997. – Vol. 29. – P. 43–54.
12. Interferon and Cytokine Research / F. Marinosci, C. Bergamini, E. Fransvea [et al.] // *Gastroenterol. J.* – 2005. – Vol. 25. – P. 453–458.
13. Kupffer cell-derived 95 kDa type IV collagenase/gelatinase B: Characterisation and expression in cultured cells / P.J. Winwood, D. Schuppan, J.P. Iredale [et al.] // *Hepatology.* – 1995. – Vol. 22. – P. 304–315.
14. Matrix Metalloproteinases (MMPs) In Chronic Hepatitis C Infection [Електронний ресурс] // *Conatus Pharmaceuticals.* – 2009. – Режим доступу: <http://www.conatuspharma.com/liverfacts/chronic-hcv.htm>.
15. Matrix Metalloproteinase Processing of CXCL11/I-TAC Results in Loss of Chemoattractant Activity and Altered Glycosaminoglycan Binding / J.H. Cox, R.A. Dean, C.R. Roberts [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283 (28). – P. 19389–19399.
16. METAVIR. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group // *Hepatology.* – 1994. – Vol. 20. – P. 15–20.
17. *Michael J.P.* Arthur. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis // *J Physiol Gastr. Liver Physiol.* – 2000. – Vol. 279 (2). – P. 245–249.
18. *Parsons C.J.* Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis / C.J. Parsons, M. Takashima, R.A. Rippe // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2007. – Vol. 22 (1). – P. 79–84.

#### Відомості про автора:

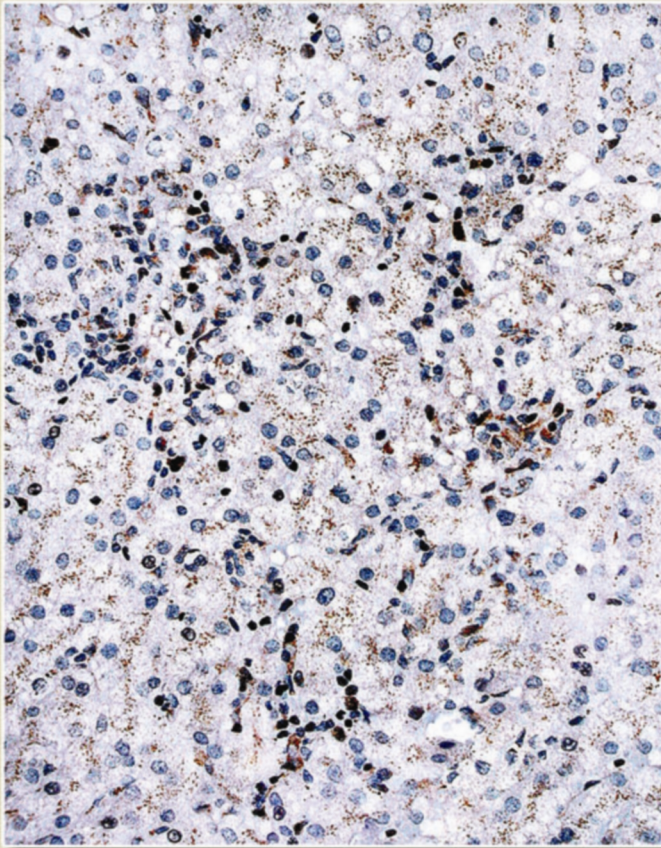
Шебеко Ю.О., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини з основами права ЗДМУ.

#### Адреса для листування:

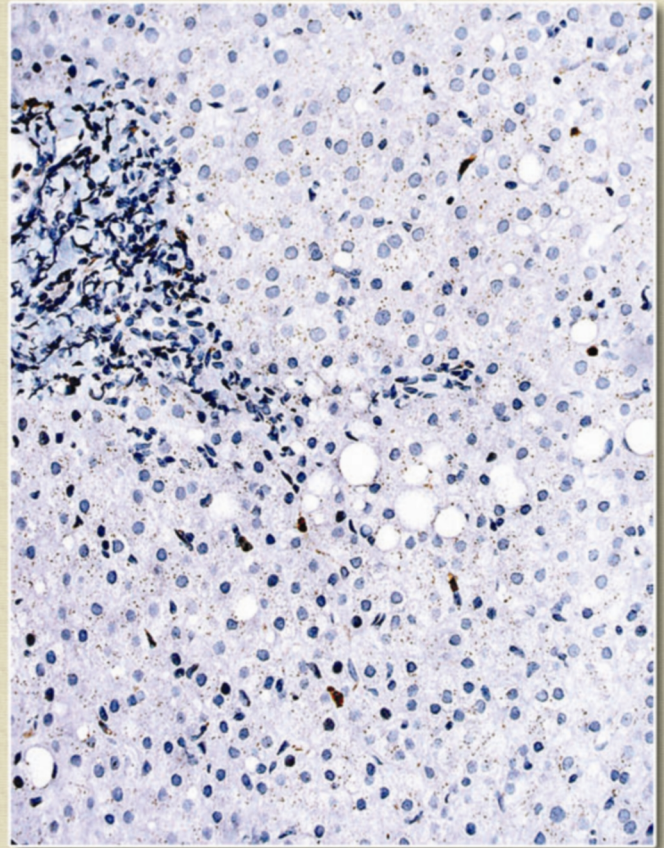
Шебеко Юлія Олександрівна. 69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26, ЗДМУ.

Тел.: (0612) 99 52 04.

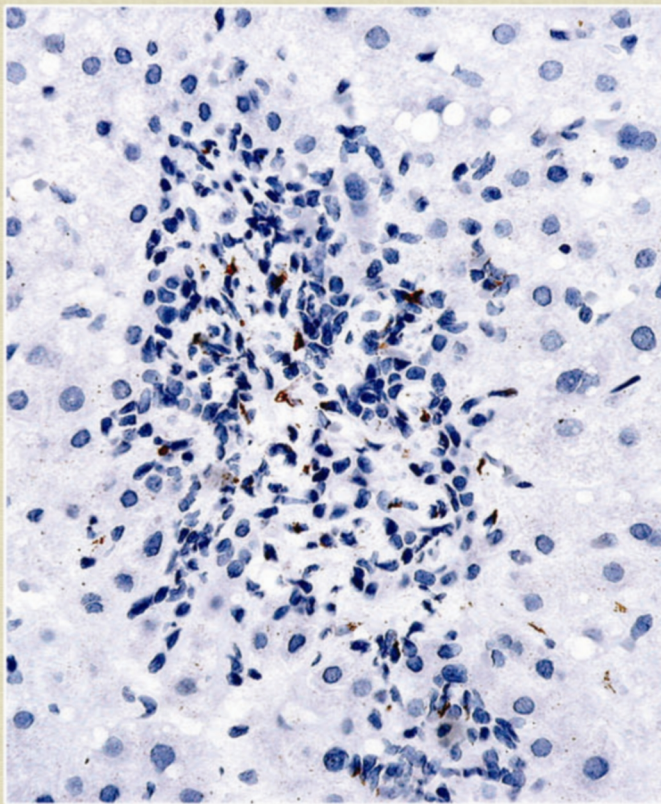
E-mail: [julis.zp@mail.ru](mailto:julis.zp@mail.ru)



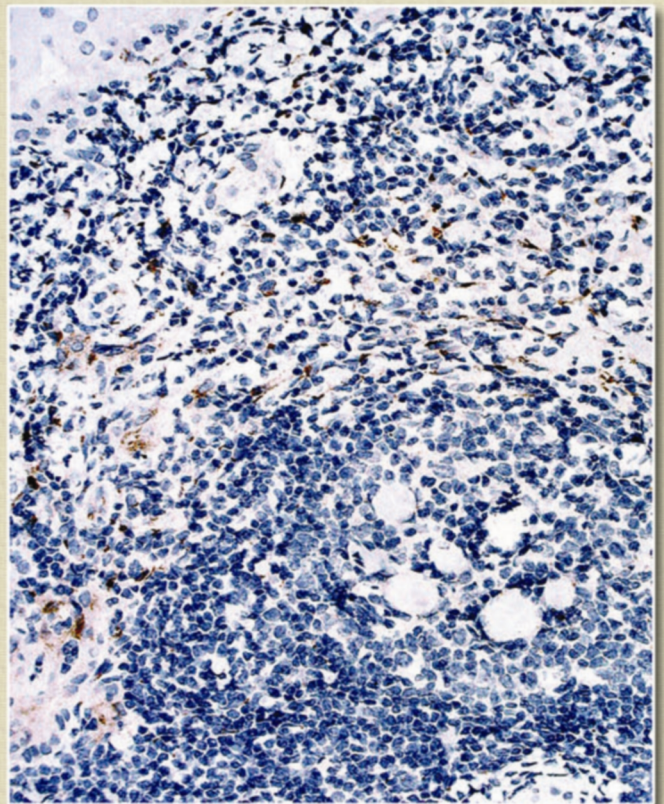
*Рис. 1. Виражена експресія MMP-9 в активованих клітинах Купфера, клітинах Іто, гепатоцитах і лімфоцитах імуноклітинних інфільтратів і вогнищ імуноклітинного клітінгу гепатоцитів на тлі високої активності ХВГС. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.*



*Рис. 2. Слабка експресія MMP-9 в поодиноких активованих клітинах Купфера і клітинах Іто та лімфоцитах імуноклітинного інфільтрату портального тракту на тлі слабо вираженої активності ХВГС. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.*



*Рис. 3. Помірна експресія TIMP-1 у лімфоцитах імуноклітинного інфільтрату в тканині печінки на тлі слабо вираженої активності ХВГС. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 400.*



*Рис. 4. Виражена експресія TIMP-1 у лімфоцитах великого фолікулоподібного імуноклітинного інфільтрату портального тракту на тлі високої активності ХВГС. Система візуалізації DAKO EnVision+ з діамінобензидином. 36. x 200.*

**(Рис. 1–4 до статті Ю.О. Шебеко «Характеристика експресії MMP-9 і TIMP-1 при різному рівні імуноклітинної інфільтрації печінки у хворих на хронічний вірусний гепатит С», с. 111–113)**