

УДК 616.329 – 072.2

Скажухина Т.В., Цепелев В.Л., Сепп А.В., Степанов А.В.

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 КЛЕТКАМИ ПИЩЕВОДНОЙ СТЕНКИ У БОЛЬНЫХ С РУБЦОВЫМИ СТРИКТУРАМИ, ПОЛУЧАВШИХ ЭНДОСКОПИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ИОНИЗИРОВАННОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМОЙ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. Целью исследования явилась оценка экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (ММР-2) в биоптатах пищевода у пациентов с рубцовыми эзофагеальными стриктурами в процессе эндоскопического лечения с использованием ионизированной аргоновой плазмы. Иммуногистохимическим методом проведено исследование динамики экспрессии ММР-2 в биоптатах пищевода у пациентов с эзофагеальными сужениями до, во время и после применяемого лечения. У больных с эзофагеальными стриктурами на фоне хронического эзофагита отмечается значительное повышение уровня экспрессии ММР-2 клетками воспаления (макрофагами и нейтрофилами). После аргоноплазменной реканализации выявлен усиленный синтез ММР-2 фибробластами, что является одним из механизмов дилатирующего эффекта аргоновой плазмы.

Ключевые слова: стеноз пищевода, ионизированная аргоновая плазма, матриксная металлопротеиназа-2.

Skazhutina T.V., Tsepelev V.L., Sepp A.V., Stepanov A.V.

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IN PATIENTS WITH BENIGN CICATRICAL STRICTURES OF ESOPHAGUS RECEIVED ENDOSCOPIC TREATMENT BY USING IONIZED ARGON PLASMA

Summary. The objective of investigation is evaluate the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in biopsies of esophagus in patients with benign cicatricial esophageal strictures during endoscopic treatment by using ionized argon plasma. The investigation of MMP-2 expression in esophageal biopsies was carried out by immunohistochemistry before, during and after our treatment. There is a significant increasing in the level of expression of MMP-2 by inflammatory cells (macrophages and neutrophils) in esophageal biopsies of patients with stricture on the background of chronic esophagitis. After argon plasma recanalization it was revealed increased synthesis of MMP-2 by fibroblasts, which is one of the mechanisms of dilatation effect of argon plasma.

Keywords: structure of esophagus, ionized argon plasma, matrix metalloproteinase-2.

Введение. Проблема рубцовых стриктур пищевода постожоговой и пептической этиологии на протяжении многих лет остается одной из самых актуальных и тяжело разрешаемых для хирургической практики. Эффекты основных дилатирующих методов лечения, таких как бужирование и баллонная дилатация, основаны на механическом травмирующем воздействии на зону эзофагеальной стриктуры. Формирующиеся разрывы рубцовой ткани нередко становятся причиной прогрессирования сужений и развития рестенозов, что значительно усугубляет дальнейшее течение патологического процесса [5].

Нами разработан эндоскопический способ лечения рубцовых стриктур пищевода с использованием ионизированной аргоновой плазмы (ИАП), продемонстрировавший высокую клиническую эффективность и безопасность [4]. Однако механизмы дилатирующего действия ИАП на стенку пищевода в зоне стеноза остаются неизученными. В этом отношении наибольший интерес представляет семейство матриксных металлопротеиназ, участвующих в морфогенезе, резорбции и ремоделировании тканей, а в частности металлопротеиназа-2 (ММР-2), ключевой функцией которой является расщепление IV фракции коллагена, входящего в состав базальных мембран [1, 3, 9].

Цель исследования – оценить динамику экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 в биоптатах пищевода у пациентов с рубцовыми эзофагеальными стриктурами в процессе эндоскопического лечения с использованием ионизированной аргоновой плазмы.

Материалы и методы. В период с 2010 по 2014 год в Краевой клинической больнице г. Читы эндоскопическим способом с применением ионизированной аргоновой плазмы пролечено 52 пациента в возрасте от 17 до 73 лет, средний возраст – $53,2 \pm 17,1$ года. Из них мужчин – 39 (75%), женщин – 13 (25%). Основным этиологическим фактором стеноза пищевода в 35 случаях (67,3%) явился химический ожог; у 17 пациентов (32,7%) сужение сформировалось как следствие длительно текущего пептического рефлюкс-эзофагита. У 15 пациентов сроки формирования посттравматического стеноза составили от 1 до 12 месяцев, у 20 – от года до 26 лет. Временные периоды стенозирования в группе пептических стриктур находились в интервале 5-10 лет (5 пациентов) и более 10 лет (12 человек). Степень сужения пищевода варьировала от 0,1 см до 1,0 см. На долю коротких постожоговых стриктур пришлось 51,5% (18), трубчатых – 8,6% (3), протяженных – 39,9% (14). Пептические сужения в 100% случаях были непротяженными и локализовались в прекардиальной зоне пищевода.

Эндоскопическое лечение рубцовых стриктур пищевода проводили с использованием видеогастроскопов «Olimpus» различного диаметра (0,6см, 0,9см, 1,2см) и аргоноплазменного коагулятора фирмы «Martin» с набором APC-зондов. Методика заключается в бесконтактном воздействии на стенозированный участок пищевода ионизированной аргоновой плазмой в режиме монополярной спрей-коагуляции с мощностью переменного тока 25Вт и скоростью подачи аргона 1 л/мин, длительность воздействия составляет 5-6 секунд. Одновременно в проекции стенозированного участка создавали переменное магнитное поле частотой 50 Гц и магнитной индукцией 30 мТл. Для расширения стриктуры проводили от 3 до 5 воздействий ионизированной аргоновой плазмой за один сеанс. Для достижения стабильного эффекта сеансы лечения назначали ежедневно в течение 5-10 дней до восстановления пассажа пищи по пищеводу [4, 8].

До начала процедур, на 5-е сутки и по прошествии 14-и суток с момента окончания лечения выполняли биопсию стандартным методом. Иммуногистохимическое исследование выполняли с использованием парафиновых срезов биоптатов стенки пищевода биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с мышинными моноклональными антителами к матриксной металлопротеиназе-2 (MMP-2), и фактору роста фибробластов (TGF β R1), производства Santa Cruz biotechnology (США). После проведения процедур гистологической проводки материала и изготовления полутонких гистологических срезов, последние адгезировали на предметных стеклах, имеющих поли-L-лизинное покрытие. Депарафинизирование срезов выполняли в 1,2-диметилбензоле. Для демаскировки антигенов проводили двукратную обработку в микроволновой печи при мощности излучателя 450 Вт в течение 15 минут с интервалом в 4 минуты между процедурами для охлаждения. В дальнейшем срезы инкубировали с первичными антителами в разведениях 1:450 на протяжении 30 минут при температуре 36⁰С. В качестве вторичных антител применяли рекомендованную производителем систему Polyvalent HRP DAB (Spring Bioscienc, США), использующую для визуализации в качестве хромогена 3,3-диаминобензида тетрагидрохлорид. Последующая докраска срезов, в частности ядер клеток, осуществлялась водным раствором гематоксилина Гаррисона. Использовались рекомендованные контрольные срезы тканей плаценты человека в качестве позитивного контроля. Окрашенные срезы тканей заключали в синтетическую монтирующую среду Bio-Maunt (Bio-Optica, Италия). Для определения базального уровня экспрессии MMP-2 использовали биопсионный материал стенки пищевода пяти условно здоровых лиц. Величину экспрессии искомого антигена в срезе для всех продуцирующих клеток определяли отдельно: при 400-кратном увеличении производили подсчет целевых клеточных элементов в 100 случайно выбранных полях зрения. В каждом поле количественную оценку экспрессии проводили в баллах по следующей шкале: отрицательный уровень – если позитивных клеток было менее 10% в поле зрения; 1 балл – при наличии 10-25% клеток; 2 балла – 25-50% клеток; 3 балла – 50-75% клеток; 4 балла – в случае окрашивания более 75% клеток [2].

Статистическую обработку полученного материала осуществляли с использованием пакета программ «Statistica 10.0». При описании выборки представлено как М (среднее значение) \pm SD (стандартное отклонение). Для определения различий в группах непараметриче-

ские критерии Манна-Уитни и Уилкоксона (U). Критический уровень значимости принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. Хорошие результаты лечения, сопровождающиеся дилатацией стриктуры до 12 мм и более в сочетании с полным купированием дисфагии, были зарегистрированы в 28 случаях (53,8%). Удовлетворительный результат лечения, характеризующийся дилатацией сужения до 10-11 мм и исчезновением поперхивания, достигнут у 14 пациентов (27%). Неудовлетворительный результат лечения при дилатации стеноза менее 9 мм в сочетании с сохраняющейся периодической или постоянной дисфагией твердой или полужидкой пищей был отмечен у 2 (3,8%) пациентов с короткими посттравматическими сужениями, у 3 (5,7%) – с протяженными посттравматическими стенозами и у 5 (9,6%) больных из группы пептических стриктур. Максимальная эффективность метода выявлена при пептических стриктурах – в 58,5% (10 пациентов из 17) получен хороший результат. При непротяженных посттравматических сужениях хороший результат достигнут в 71,4% (15 пациентов из 21). В 100% случаев отмечена полная эпителизация эрозий слизистой пищевода.

Таблица 1

Экспрессия MMP-2 клетками слизистой пищевода у больных с рубцовыми стриктурами, получавших эндоскопическое лечение с использованием ионизированной аргоновой плазмы (M±SD)

Клетки	Уровень экспрессии MMP-2 (балл)			
	Контроль n=15	До лечения n=15	В процессе лечения n=15	После окончания курса n=15
Нейтрофилы	0,2±0,07	2,2±0,09 p ₁ <0,001*	1,9±0,1 p ₁ <0,001* p ₂ <0,005*	0,8±0,09 p ₁ <0,01* p ₂ <0,001* p ₃ <0,001*
Макрофаги	0,2 ±0,05	1,0±0,08 p ₁ <0,001*	1,1±0,1 p ₁ <0,001* p ₂ >0,05	0,6±0,07 p ₁ <0,005* p ₂ <0,001* p ₃ <0,001*
Эндотелий	0,6±0,1	1,0±0,09 p ₁ >0,05	1,1±0,09 p ₁ >0,05 p ₂ >0,05	0,7±0,07 p ₁ >0,05 p ₂ <0,05* p ₃ <0,005*
Фибробласты	0,1±0,05	1,2±0,07 p ₁ <0,001*	1,6±0,1 p ₁ <0,001* p ₂ <0,001*	0,9±0,07 p ₁ <0,001* p ₂ <0,001* p ₃ <0,001*

p₁ – уровень статистической значимости различий в сравнении с контролем;

p₂ – уровень статистической значимости различий в сравнении с показателями до лечения;

p₃ – уровень статистической значимости различий в сравнении с показателями на пятые сутки лечения.

* – значимые различия.

Оценка стадийной динамики экспрессии MMP-2 целевыми клетками пищеводной стенки (нейтрофилами, макрофагами, эндотелием, фибробластами) продемонстрировала следующие результаты. Максимум продуцирующей активности нейтрофилов наблюдали в исследуемых биоптатах до проведения курса лечения – средний балл экспрессии достиг 2,2±0,09 и в 10 раз превысил показатели контроля (p<0,001). По мере проведения курса отмечали достоверное снижение уровня продукции до 1,9±0,1 (p<0,005). По прошествии 14 суток с момента окончания эндоскопического лечения с использованием ионизированной аргоновой плазмы зафиксировали более чем двукратное снижение показателя относительно первоначального – до 0,8±0,09 (p<0,001). Динамика экспрессии MMP-2 макрофагами и клет-

ками эндотелия в процессе лечения была достаточно однотипна и демонстрировала стабильность показателей до и во время процедур реканализации, однако степень экспрессии макрофагов превышала контрольные показатели в 5 раз ($p < 0,001$). По окончании курса уровень продукции металлопротеиназы-2 клетками эндотелия достиг показателей базальной секреции ($p > 0,05$), степень активности макрофагов снизилась на 40% относительно ее уровня до курса дилатации ($p < 0,005$). В качестве наиболее активных и динамичных продуцентов MMP-2 выступили фибробласты. Резкое увеличение количества клеток в тканях пищевода в зоне стриктуры является характерной морфологической особенностью течения хронического продуктивного постожогового эзофагита [7]. Иммуногистохимически выявлено нахождение подавляющего большинства элементов в активном (пролиферирующем) и интенсивно экспрессирующем MMP-2 состоянии. До лечения и по мере его проведения отмечали достоверное повышение степени экспрессии MMP-2 фибробластами, что отражалось в увеличении значений среднего балла экспрессии с 1,2 (до лечения) до 1,6 (во время процедур) ($p < 0,001$). Однако и по окончании цикла эндоскопического лечения с использованием ионизированной аргонной плазмы наблюдали превышение показателей базальной секреции в 9 раз ($p < 0,001$) (табл. 1).

Подобные колебания, с нашей точки зрения, можно объяснить динамикой двух сменяющихся в пищеводной стенке процессов, где локальное воспаление и альтерирующее воздействие MMP-2 выступают в качестве ключевого патофизиологического процесса, а развивающиеся репарация и структурно-функциональное ремоделирование – как отражение стимулированного ионизированной аргонной плазмой переориентирования протеолитического действия фермента в сторону фиброзированного матрикса. Избирательность воздействия MMP-2 в зоне пищеводной стриктуры объясняется функциональной специфичностью и локализацией ее основного продуцента: синтезируемая клетками воспаления в пределах эпителиального пласта желатиназа А агрессивно включалась в поддержание хронического тяжело купируемого эзофагита, уменьшение степени выраженности которого происходило соизмеримо с уменьшением общего пула и продуцирующего вклада нейтрофилов. Стихание воспалительного ответа также объясняли уменьшением выработки провоспалительных цитокинов, обладающих хемотрактантным действием [6, 7]. По мере проведения лечения основная экспрессирующая функция приходилась на клетки стромы поврежденной слизистой и подслизистой пластинок (фибробласты), и основной точкой приложения желатиназы являлся соединительнотканый, фиброзированный матрикс стриктуры из избыточно синтезированного коллагена. Таким образом, динамика секреции матриксной металлопротеиназы-2 клетками пищеводной стенки в зоне рубцовой стриктуры раскрывает механизмы дилатирующего эффекта ионизированной аргонной плазмы.

Заключение. Результатом эндоскопического лечения эзофагеальных стриктур постожоговой и пептической этиологии с использованием ионизированной аргонной плазмы является купирование хронического продуктивного эзофагита в сочетании со структурно-функциональным ремоделированием рубцовой ткани. Ключевым звеном стихания воспалительного ответа выступает снижение количества и синтетической функции клеток воспаления (нейтрофилов и макрофагов) в пределах поврежденного эпителия, а дилатирующего механизма – повышенная экспрессия и синтез MMP-2 собственными клетками пищеводной стенки (фибробластами) в пределах избыточно фиброзированной стромы слизистой и подслизистой пластинок.

Литература

1. Авдеева А.С. Клиническое значение матриксных металлопротеиназ при ревматоидном артрите (обзор литературы и собственные данные) / А.С. Авдеева, Е.Н. Александрова, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2014. – №1. – С. 79-84.
2. Иммуногистохимические методы: руководство / L. Kumar George, Rudbeck Lars; пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – М., 2011. – С. 224.

3. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (Обзор) / Л.Н. Рогова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – №2. – С. 86-89.
4. Пат. № 2491028, Российская Федерация, МПК А61 В 18/04. Способ лечения рубцового стеноза пищевода / Скажутина Т.В., Скажутина Л.Н., Цепелев В.Л., Скажутин В.Г., Степанов А.В., Крюкова В.В., Чугай О.А. заявитель и патентообладатель Читинская государственная медицинская академия. – № 2012123313/14; заявл. 05.06.12 ; опубл. 27.08.13, Бюл. №24. – 3 с.
5. Скажутина Т.В. Внутрисветные дилатирующие методы лечения доброкачественных рубцовых стриктур пищевода / Т.В. Скажутина, В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5; URL: www.science-education.ru/128-22456.
6. Цепелев В.Л. Влияние регуляторных пептидов на продукцию провоспалительных цитокинов [Электронный ресурс] / В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – №2. – С. 147-150. – Режим доступа: <http://www.chitgma.ru/zmv2/journal/2015/2/27.pdf> (24 янв. 2015).
7. Цепелев В.Л. Механизмы действия регуляторных пептидов при иммунодефицитных состояниях и воспалении : автореф. дис. на соискание ученой степени доктора медицинских наук / В.Л. Цепелев. – Чита., 2003. – 40 с.
8. Эндоскопическое лечение рубцовых стенозов пищевода с целью раннего восстановления энтерального питания /Т.В. Скажутина [и др.] //Актуальные вопросы интенсивной терапии. – 2015. – № 32. – С. 28-32.
9. Flannery C. MMPs and ADAMTSs: functional studies // Front Biosci. - 2006. – №11. – P. 529-543.