

УДК 616.092.9

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2 И 9 В СТЕНКЕ АОРТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ

Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Гончар Е.Ю.

*ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Владивосток, e-mail: zaharchuknat@mail.ru*

Изучено содержание матриксных металлопротеиназ 2 и 9 в условиях экспериментального моделирования табакокурения. Исследование проведено на 10 крысах-самцах линии Vistar, разделенных на две группы. Контрольная группа животных дышала атмосферным воздухом, а экспериментальную группу ежедневно обкуривали табачным дымом в ингаляционной камере в течение 6 месяцев согласно протоколу Н. Zheng и колл. После декапитации животных изготавливались гистологические препараты аорты. Исследованы архитектура стенки аорты и экспрессия матриксной металлопротеиназы-2 (ММР-2) и металлопротеиназы-9 (ММР-9). Для оценки активности данных маркеров использован метод иммунопероксидазной реакции с моно- и поликлональными антителами против ММР-2, ММР-9, также использованы вторичные антитела, меченые пероксидазой хрена. Количественную оценку ферментативной активности определяли, измеряя плотность преципитата гистохимической реакции. У животных экспериментальной группы установлено изменение архитектуры аортальной стенки, а именно утолщение внутренней эластической мембраны, истончение средней оболочки, уменьшении количества рядов гладкомышечных клеток, дезорганизация эластических и коллагеновых волокон. Установлено повышение экспрессии ММР-2 и ММР-9 в интиме и меди аорты, что может являться одним из факторов соединительно-тканного ремоделирования аортальной стенки при табакокурении.

Ключевые слова: табакокурение, металлопротеиназы, аорта, сосудистое ремоделирование, крысы

THE EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 IN AORTIC WALL IN EXPERIMENTAL SMOKING

Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Gonchar E.Y.

Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: zaharchuknat@mail.ru

The expression of metalloproteinase-2 (MMP-2) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in aortic wall of rats in the experimental smoking was investigated. The investigation included 10 Vistar male rats, divided into two groups. The first group was breathing ambient air, and the second group was breathing tobacco smoke for 6 months. The localization and expression of MMP-2 and MMP-9 in the aortic wall were analyzed by immunohistochemistry method with immunoperoxidase mono- and polyclonal antibodies against MMP-2 and MMP-9. The density of precipitation in cross sections of aortic wall was measured in units of optical density. There was detected remodeling of aortic wall in smoking with a thickening of intima elastic membrane, thinning of media, reduction of the smooth muscle cells, disorganization the elastic and collagenic fibers. There was also detected increasing expression of MMP-2 and MMP-9. The results may reflected the level participation matrix metalloproteinases during of reorganization in aortic wall in smoking.

Keywords: smoking, metalloproteinases, aorta, remodelling, rats

Курение табака наряду с артериальной гипертензией и дислипидемией входит в тройку лидеров факторов риска, связанных с возникновением хронических неинфекционных заболеваний человека. Курение вносит свой вклад в развитие 71% случаев рака легких, 42% хронических болезней легких и 10% сердечно-сосудистых заболеваний. Наиболее изученным компонентом табачного дыма является никотин, реализующий свои эффекты через никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (НАХР). Экспрессия некоторых подтипов НАХР установлена в эндотелиоцитах сосудов и направлена на синтез, транспортировку и метаболизм ацетилхолина [8]. Предполагается, что эндотелиальный пул НАХР обеспечивает участие никотина в ангиогенезе, эффекты которого зависят

от продолжительности его воздействия и могут иметь разнонаправленный характер [4]. Помимо никотина прочие компоненты табачного дыма, в частности нитрозамины, фенолы, альдегиды, кетоны, высокоактивные свободные радикалы, способны нарушать клеточную структуру и процессы межклеточного сигналинга за счет усиления процессов апоптоза, стимуляции перекисного окисления липидов в клеточной мембране, поломки нитей ДНК и РНК, нарушения дыхательной митохондриальной цепи [2].

Целью нашего исследования явилось изучение влияния табачного дыма на структурную реорганизацию аорты и экспрессию матриксных металлопротеиназ ММР-2 и ММР-9 в её стенке в условиях моделирования хронического табакокурения.

Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели нами была воспроизведена экспериментальная модель длительного табакокурения *in vivo* у крыс в соответствии с протоколом Н. Zheng и колл. [5]. Материалом исследования послужили 10 крыс-самцов линии Вистар 8-ми недельного возраста, разделенные произвольно на 2 группы. Контрольная группа (4 крысы) дышала атмосферным воздухом, а животных экспериментальной группы (6 крыс) обкуривали табачным дымом в специальной камере для ингаляций в течение 1 часа утром и 1 часа днем ежедневно в течение 6 месяцев. Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 года и ее пересмотренным вариантом от 2008 года. Через 6 месяцев после ингаляции табачного дыма животных фиксировали и анестезировали путем внутривентриального введения рометара (Xylazinum, «Spora», Praha) в концентрации 5,5 мг/кг. Затем производилась декапитация животных и изготавливались гистологические препараты аорты, часть из которых была окрашена гематоксилином и эозином для изучения архитектоники аортальной стенки. Для оценки локализации и экспрессии матриксных металлопротеиназы-2 (ММР-2) и металлопротеиназы-9 (ММР-9) использовался непрямой иммуногистохимический метод. Была проведена иммунопероксидазная реакция с моно- и поликлональными антителами против ММР-2, ММР-9, а в качестве вторичных антител использованы антитела, меченные пероксидазой хрена. Количественную оценку степени экспрессии ММР-2 и ММР-9 проводили путем измерения суммарной плотности преципитата иммуногистохимической реакции, результат

выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Гистологические препараты аорты просматривали в световом микроскопе AxioScore A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICe3 (Carl Zeiss, Германия). Обработку результатов осуществляли с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и Image J. Достоверность различий между группами (при $p < 0,05$) оценивали с помощью коэффициента Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Гистологически стенка аорты состоит из трех слоев: внутренней оболочки (интимы), средней оболочки и адвентиции. Средняя оболочка противостоит давлению в аорте и является самым прочным компонентом аортальной стенки. В норме, согласно концепции ламеллярной единицы средней оболочки аорты, предложенной Wolinsky и Glagov, стенка аорты представлена параллельно расположенными эластическими пластинами и соединяющими их эластическими волокнами, а также коллагеновыми волокнами I и III типов и протеогликанами, заполняющими пространство между пластинами.

Нами обнаружено, что при длительном табакокурении архитектоника стенки аорты имеет выраженное отличие от группы контроля (рис. 1).

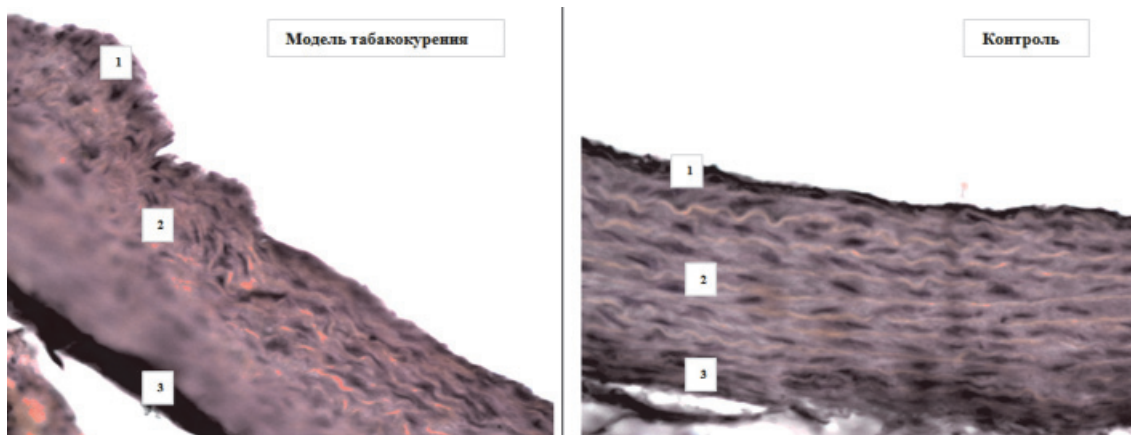


Рис. 1. Реорганизация стенки аорты при табакокурении: 1 – внутренняя оболочка (интима); 2 – средняя оболочка; 3 – адвентиция; окраска гематоксилином и эозином, ув.х20

При этом отмечается утолщение внутренней эластической мембраны, истончение средней оболочки, уменьшение количества рядов гладкомышечных клеток, дезорганизация эластических и коллагеновых волокон в стенке аорты.

Согласно J.L. Ashworth, С. Johnson, S. Oikonomidi одну из ведущих ролей

в ремоделировании аорты среди других протеолитических инструментов играют матриксные металлопротеиназы (ММПs). Это единственные протеолитические ферменты, которые способны денатурировать фибриллярные коллагены и поддерживать баланс в составе экстрацеллюлярного матрикса [1, 6, 9].

Нами изучена локализация и экспрессия матриксных металлопротеиназы-2 (ММР-2) и металлопротеиназы-9 (ММР-9) в стенке аорты при длительном воздействии табачного дыма. Данные ММРs относятся к коллагеназам IV типа или желатиназам А и Б, участвующим в деградации эластина. Физиологическая роль ММР-2 заключается в ингибировании процесса ангиогенеза в опухолях. В то же время она вместе с ММР-9 участвует в деградации коллагена IV типа,

главного компонента базальных мембран, а также может разрушать другие типы коллагенов (V, VII и X), эластин и фибронектин.

Согласно полученным результатам, комплексы ММР-2 и ММР-9 были локализованы в интиме и меди аортальной стенки, при этом их экспрессия у крыс-курительщиков оказалась достоверно выше, чем в контроле (соответственно $77,42 \pm 3,1$ ЕОП и $83,61 \pm 5,6$ ЕОП; в группе контроля $62,13 \pm 3,1$ ЕОП; при $p < 0,05$) (рис. 2).

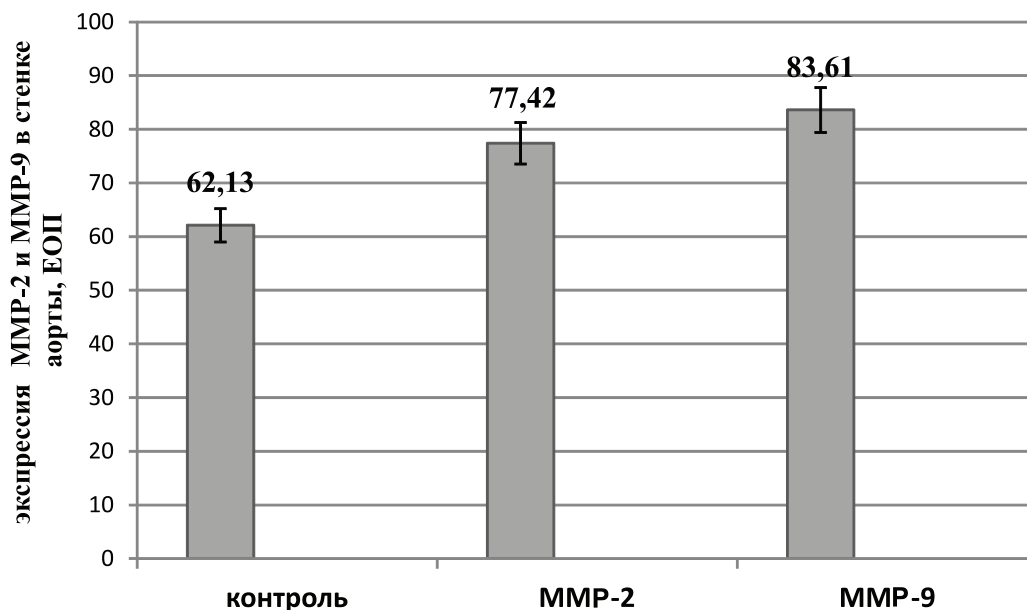


Рис. 2. Экспрессия ММР-2 и ММР-9 в стенке аорты при воздействии табачного дыма

Полученные результаты могут свидетельствовать об участии ММР-2 и ММР-9 в ремоделировании аортальной стенки. Предполагают, что ММР-1,-8,-13,-14 и катепсин К являются ответственными протеазами на первом этапе деградации коллагена, а ММР-2 и ММР-9 – на дальнейших этапах. Creemers и др. продемонстрировали в своих работах, что активность ММР-2 увеличивается одновременно с темпом деградации коллагена [3]. Kerkvliet и др. подтвердили эти результаты и показали, что ММР-2 играет важную роль в разрушении коллагена I, II, IV, V типов [7]. Sung и др. показали, что ММР-9 ответственен приблизительно за 39% ремоделирования коллагена *in vitro* в культуре гладкомышечных клеток аорты у мышей [10]. Эти результаты говорят о том, что ММР-2 и ММР-9 – важные регуляторы соединительно тканного матрикса аорты.

Заключение

Очевидно, что курение является одним из триггеров возникновения патологиче-

ского каскада, запускающего необратимые процессы морфофункциональных изменений сосудистого русла. Полученные нами данные свидетельствуют о дезорганизации архитектоники аортальной стенки, что характеризуется диффузным утолщением интимы, истончением средней оболочки и уменьшением рядов гладкомышечных клеток, изменением экстрацеллюлярного матрикса с повышением содержания и дезорганизацией коллагеновых и эластических волокон. Данные изменения можно связать с увеличенной экспрессией матриксных металлопротеиназы-2 и металлопротеиназы-9.

Список литературы

1. Ashworth J.L. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling / J.L. Ashworth, G. Murphy, M.J. Rock, M.J. Sherratt et al. // *Biochem J.* – 1999. – Vol. 340. – P. 171–181.
2. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 48. – P. 749–762.
3. Creemers L.B. Gelatinase a (mmp-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue / Creemers L.B., Jansen I.D.C., Docherty A.J.P.

Reynolds J.J., Beertsen W. and Everts V. // *Matrix Biology*. – 1998. – Vol. 17. – P. 35–46.

4. Heeschen C. Nicotine promotes arteriogenesis / Heeschen C., Weis M., Cooke J.P. // *J Am Coll Cardiol*. – 2003. – Vol. 41. – P. 489–496.

5. Hongao Zheng. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke / Hongao Zheng, Yuening Liu, Tian Huang et al. // *Toxicology Letters*. – 2009. – Vol. 189. – P. 225–234.

6. Johnson C., Galis Z.S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization // *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 54–60.

7. Kerkvliet E.H.M. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase (mmp-2) but not with collagenase / Kerkvliet E.H.M., Docherty A.J.P., Beertsen W. and Everts V. // *Matrix Biology*. – 1999. – Vol. 18. – P. 373–380.

8. Kirkpatrick C.J. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance / Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Unger R.E. et al. // *Jpn J Pharmacol.* – 2001. – Vol. 85. – P. 24–28.

9. Oikonomidi S. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications / Oikonomidi S., Kostikas K., Tsilioni I. et al. // *Cur Med Chem.* – 2009. – Vol. 16. – № 10. – P. 1214–1228.

10. Sung H-J. Matrix metalloproteinase 9 facilitates collagen remodeling and angiogenesis for vascular constructs / Sung H-J, Johnson C.E, Lessner S.M., Magid R., Drury D.N. and Galis Z.S. // *Tissue Engineering*. – 2005. – Vol. 11. – P. 267–276.

References

1. Ashworth J.L. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodeling / J.L. Ashworth, G. Murphy, M.J. Rock, M.J. Sherratt et al. // *Biochem J*. 1999. Vol. 340. pp. 171–181.

2. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 48. pp. 749–762.

3. Creemers L.B. Gelatinase a (mmp-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue / Creemers L.B., Jansen I.D.C., Docherty A.J.P, Reynolds J.J., Beertsen W. and Everts V. // *Matrix Biology*. 1998. Vol. 17. pp. 35–46.

4. Heeschen C. Nicotine promotes arteriogenesis / Heeschen C., Weis M., Cooke J.P. // *J Am Coll Cardiol*. 2003. Vol. 41. pp. 489–496.

5. Hongao Zheng. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke / Hongao Zheng, Yuening Liu, Tian Huang et al. // *Toxicology Letters*. 2009. Vol. 189. pp. 225–234.

6. Johnson C., Galis Z.S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization // *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Vol. 24. pp. 54–60.

7. Kerkvliet E.H.M. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase a (mmp-2) but not with collagenase / Kerkvliet E.H.M., Docherty A.J.P., Beertsen W. and Everts V. // *Matrix Biology*. 1999. Vol. 18. pp. 373–380.

8. Kirkpatrick C.J. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance / Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Unger R.E. et al // *Jpn J Pharmacol.* 2001. Vol. 85. pp. 24–28.

9. Oikonomidi S. Matrix metalloproteinases in respiratory diseases: from pathogenesis to potential clinical implications / Oikonomidi S., Kostikas K., Tsilioni I. et al. // *Cur Med Chem.* 2009. Vol. 16 no. 10. pp. 1214–1228.

10. Sung H-J. Matrix metalloproteinase 9 facilitates collagen remodeling and angiogenesis for vascular constructs / Sung H-J, Johnson C.E, Lessner S.M., Magid R., Drury D.N. and Galis Z.S. // *Tissue Engineering*. 2005. Vol. 11. pp. 267–276.

Рецензенты:

Котельников В.Н., д.м.н., доцент, руководитель учебного военного центра, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток;

Калиниченко С.Г., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 29.12.2014.