

DOI: 10.26693/jmbs06.03.128

УДК 616.132.2-002-092.9:577.152.34:576.53

Трясак Н. С., Козлова Ю. В.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК АКТИВНОСТІ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2 та -9 В ГОМОГЕНАТІ МІОКАРДА ЗІ ЗМІНАМИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ СТІНКИ ВІНЦЕВИХ АРТЕРІЙ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, Україна

В складний багатофакторний процес утворення атеросклеротичної бляшки активно залучаються матриксні металопротеїнази, які відіграють провідну роль в деградації компонентів екстрацелюлярного матриксу та збільшенні міграційної активності клітинних елементів стінки судин. Не зважаючи на низку наукових досліджень, існує необхідність визначення достовірних біохімічних маркерів розвитку атеросклеротичних уражень.

Метою дослідження було вивчення взаємозв'язку між активністю ММП-2 та ММП-9 в гомогенаті серцевого м'яза та змінами клітинного складу стінки в'язцевих судин при експериментальному атеросклерозі.

Матеріал та методи. Експеримент проводився на 76 нелінійних щурах обох статей, які були розподілені на 3 групи: Ia – контрольна (n=20) – тварини, яким вводили внутрішньошкірно 0,1 мл 0,9 % розчину натрію хлориду; Ib – група порівняння (n=20) – тварини, яким вводили неповний ад'ювант Фрейнда у дозі 0,1 мл внутрішньошкірно та II – експериментальна група (n=36), які були одноразово імунізовані нативними ліпопротеїнами низької щільності людини в дозі 200 мкг, розведеними в 0,1 мл неповного ад'юванта Фрейнда. Термін експерименту складав 20 тижнів. Забір матеріалу проводили, починаючи із 4-го тижня після введення препарату. З в'язцевих артерій та прилеглого міокарда виготовляли мікропрепарати за загальноприйнятою методикою, які забарвлювали гематоксилином та еозином, за методами Ван-Гізон, Малорі і суданом III. Для виявлення активності ММП-2 та ММП-9 використовували метод прямої ензимиміаграфії.

Результати та висновки. Встановлено, що динаміка активності ММП-2 протягом експерименту мала лінійний характер, збільшуючись з 109,11±1,23 % на 12-му тижні до 127,32±0,99 % на 20-му тижні та супроводжувала виражені порушення гістоструктури стінки в'язцевих артерій. Посилення активності ММП-2 співпадало зі збільшенням кількості лейкоцитів та макрофагів, в тому числі і пінистих клітин.

Активність ММП-9 досягала найбільших значень 98,24±0,82 % на 8-му тижні з наступним зменшенням до вихідного рівня 86,26±0,54 % на макси-

мальних термінах експерименту та асоціювалась з розвитком ранніх атеросклеротичних уражень.

Ключові слова: атеросклероз, в'язцеві судини, матриксні металопротеїнази, щури.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом НДР «Гістологічні аспекти взаємодії дендритних клітин із мікрооточенням у складі внутрішніх органів в умовах експериментального моделювання патологічних станів», № державної реєстрації 0113U006627.

Вступ. Серцево-судинні хвороби, які вважаються провідними причинами захворюваності та смертності у всіх розвинених країнах, є об'єктами досліджень науковців різних напрямків, які мають однакову мету: краще розуміння хвороби та факторів ризику, які можуть призвести до захворювання, рання діагностика та лікування, зменшення ускладнень та, як наслідок, покращення здоров'я населення [1]. Атеросклероз, в свою чергу, являє собою хронічне прогресуюче захворювання стінки артерій, що супроводжується не лише порушенням метаболізму ліпідів, а і запальною реакцією із залученням імунокомпетентних клітин, серед яких ключову роль відіграють лімфоцити, моноцити та макрофаги [2, 3]. Існують дані, що саме ці клітини є джерелом синтезу матриксних металопротеїназ (ММП), в тому числі ММП-2 та ММП-9, які активно залучаються в процеси ремоделювання судин при ішемічній хворобі серця [4]. Вони відносяться до підсімейства желатинази і мають властивості викликати деградацію компонентів екстрацелюлярного матриксу, що в поєднанні з посиленою міграцією клітинних елементів в інтиму артерій, вважають основою атерогенезу [5]. Саме тому зростання в плазмі крові рівня ММП-2 та ММП-9 можна використовувати у якості маркера формування атеросклеротичної бляшки [6, 7].

В ряді досліджень доведено, що ММП-9 ініціює неоваскуляризацію, проліферацію, міграцію пінистих клітин та гладких міоцитів, що сприяє розщепленню базальних мембран артерій і розриву покривки бляшки [8, 9].

Протилежні результати демонструють Galis Z. S. et al. [10], які встановили, що при збільшенні активності ММП-2 розвиваються більш виразні атеросклеротичні ураження зі значною

макрофагальною інфільтрацією. Аналіз даних досліджень, виконаних Шляхто Є. В. зі співавт., свідчив, що в умовах експериментального запалення в атеросклеротичній бляшці мишей рівень ММП-9 знижувався [11].

Вищенаведені дані підтверджують неоднозначність ролі ММП-2 та ММП-9 в атерогенезі, що потребує додаткового вивчення.

Метою даного дослідження було вивчення взаємозв'язку між активністю ММП-2 та ММП-9 в гомогенаті серцевого м'яза та змінами клітинного складу стінки вільцевих судин при експериментальному атеросклерозі.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проводились на 76 нелінійних щурах, які були розподілені на 3 групи: Ia – контрольна (n=20) – тварини, яким вводили внутрішньошкірно 0,1 мл 0,9 % розчину натрію хлориду; Ib – група порівняння (n=20) – тварини, яким вводили неповний ад'ювант Фрейнда у дозі 0,1 мл внутрішньошкірно та II – експериментальна група (n=36), які були імунізовані нативними ліпопротеїнами низької щільності (нЛПНЩ) людини, розведеними неповним ад'ювантом Фрейнда.

Для відтворення атеросклеротичного пошкодження стінки вільцевих артерій щурів застосовували відпрацьовану модель [12], згідно якої нЛПНЩ людини («ProSpec», США) вводили щурам внутрішньошкірно одноразово в дозі 200 мкг, розведених в 0,1 мл неповного ад'юванта Фрейнда («Vecton Dickinson», США), незалежно від ваги.

Термін експерименту становив 20 тижнів. Забір матеріалу проводили, починаючи із 4-го тижня після введення препарату. Евтаназію дослідних тварин проводили шляхом введення тіопенталу натрію. Утримання тварин та експериментальне дослідження проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447- IV від 21.02.2006 р.).

З вільцевих артерій та прилеглого міокарда виготовляли мікропрепарати за загально прийнятою методикою, які забарвлювали гематоксиліном та еозином, за методами Ван-Гізон, Малорі і суданом III. Для виявлення активності ММП-2 та ММП-9 використовували метод прямої ензим-зимографії [13]. Для дослідження отримували гомогенат тканин вільцевої судини з невеликою ділянкою прилеглого міокарда шляхом розтирання їх зі скляним піском в холодному 0,025 М трис-буфері (pH=7,2) у співвідношенні 1:4 із подальшим центрифугуванням протягом 5 хвилин при 8000 об/хв. Отриманий супернатант, який містив фракції розчинних білків

серцевого м'яза, використовували для подальших досліджень.

Наступним етапом було проведення вертикального електрофорезу дослідних зразків в 7,5 % поліакриламідному гелі з 0,1 % додецилсульфатом натрію і додаванням 1 % желатину. В лунки гелю вносили по 20 мкл експериментальних та контрольних зразків, розведених в забуференому 0,9 % розчині NaCl у співвідношенні 1:2. Контрольний зразок готували шляхом змішування 10 однакових об'ємів (по 50 мкл) зразків фракцій розчинних білків серцевого м'яза, отриманих у контрольній групі.

Після електрофорезу гелі промивали 4 рази по 15 хвилин у розчині 2,5 % Тритону X-100, а потім інкубували при температурі 37 °C протягом 2 діб в 0,025 М трис-буфері (pH=7,5), що містив 5 мМ CaCl₂, 0,9 % розчин NaCl, 0,05 % NaN₃. Для візуалізації отриманих результатів гелі забарвлювали розчином Кумасі діамантовим синім G250 впродовж 10-12 годин, після чого відмивали сумішшю 50 % етанолу та 7 % оцтової кислоти. Дія ММП проявлялася як прозорі зони лізису на синьому фоні, при цьому ступінь знебарвлення був пропорційним їх активності.

Отримані зимограми сканували та проводили подальший кількісний розрахунок активності ММП-2 та ММП-9 за допомогою програми Sorbfil Videodensitometer 2.0, розраховуючи відсоток їх активності відносно контрольного зразка, в якому активність цих ферментів була прийнята за 100 %.

Оцінку гістологічних зрізів проводили під світловим мікроскопом Axio Scope.A1 («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Німеччина). Гістологічні препарати фотографували цифровою фотокамерою Canon EOS 1200D (Китай) з використанням програмного забезпечення TourView 3.2. ver. 3.5. Підрахунок клітин здійснювали на умовній одиниці площі, яка дорівнювала 1500 мкм² [14].

Отримані показники статистично обробляли з використанням програмного пакету STATISTICA 6.1. Результати представлено як (M±m), де M – середнє значення показника, m – стандартна похибка. Достовірними вважали результати при p<0,05. Встановлення достовірності відмінностей ознак проводили за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. При морфологічному дослідженні на 4-му тижні експерименту виявлено, що інтима артерій експериментальної групи тварин представлена у вигляді моношару клітин полігональної форми, розташованих на базальній мембрані. Внутрішня еластична мембрана мала правильний звивистий контур. В медії артерій кількома рядами розташовувались гладкі міоцити, що мали косопоздовжній напрямок по відношенню до еластичних волокон.

Адвентиція була представлена пухкою волокнистою сполучною тканиною. За гістоструктурою вільцеві судини експериментальних тварин мали подібну будову з відповідними артеріями щурів груп контролю та порівняння.

Водночас зі структурними характеристиками шарів стінки вільцевих судин також оцінювали кількісні параметри клітинного складу (табл. 1). Особливо це стосувалося клітин сполучної тканини, які, за припущенням, повинні були активно залу-

чатися у відповідь тканини на антигенне навантаження.

На 4-му тижні експерименту не виявили достовірних змін між показниками кількості мастоцитів, лейкоцитів та макрофагів у трьох досліджуваних групах. Крім того, оцінка зимограм вказувала на те, що показники ферментативної активності ММП-2 та ММП-9 в гомогенаті міокарда імунізованих тварин на даному етапі експерименту також були подібними до групи Ia та Ib (рис. 1).

Таблиця 1 – Кількісна характеристика клітинного складу стінки вільцевих артерій щурів, (M±m)

Показник	Групи спостереження											
	Ia/тижні (n=20)				Ib/тижні (n=20)				II/тижні (n=36)			
	4 (n=5)	8 (n=5)	12 (n=5)	20 (n=5)	4 (n=5)	8 (n=5)	12 (n=5)	20 (n=5)	4 (n=8)	8 (n=8)	12 (n=10)	20 (n=10)
Кількість мастоцитів, шт	2,92±0,03	3,01±0,04	3,02±0,04	3,09±0,02	2,92±0,05	3,19±0,06	3,18±0,05	3,08±0,02	2,93±0,04	5,73±0,11*	11,31±0,47*	6,39±0,08*
Кількість лейкоцитів, шт	5,85±0,03	5,78±0,10	5,81±0,09	5,84±0,08	5,92±0,05	5,64±0,12	5,92±0,12	5,97±0,12	5,86±0,08	9,65±0,14*	19,19±0,41*	39,37±1,10*
Кількість макрофагів, шт	4,37±0,08	4,62±0,05	4,47±0,08	4,65±0,02	4,58±0,06	4,61±0,06	4,60±0,10	4,60±0,03	4,63±0,06	6,85±0,09*	14,36±0,37*	8,84±0,06*
Кількість пінистих клітин, шт	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4,73±0,30*	5,30±0,10*

Примітка: n – кількість тварин, * – p<0,05 по відношенню до групи I.

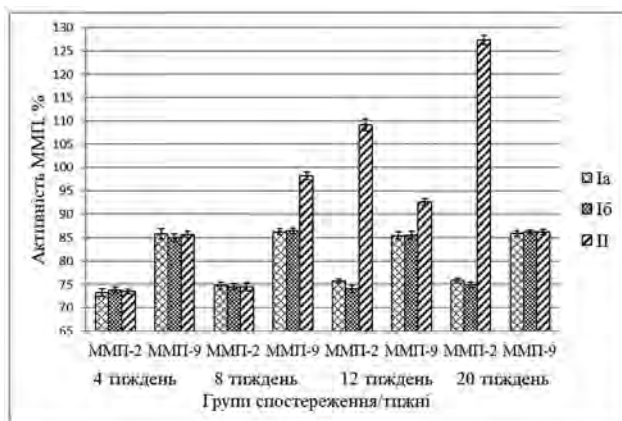


Рис. 1. Динаміка активності ММП-2 та ММП-9 в гомогенаті міокарда щурів при експериментальному атеросклерозі

На 8-му тижні від початку експерименту будова стінки вільцевої артерії експериментальних тварин характеризувалась явищами посиленої адгезії моноцитів та нейтрофільних гранулоцитів до морфологічно інтактного ендотелію. Мастоцити одночасно виявлялись як між ендотелієм та внутрішньою еластичною мембраною, так і в адвентиції, в ділянках біля vasa vasorum, де їх кількість була майже у 2 рази більшою (10,8±0,15, p<0,05) в порівнянні з інтимою (5,73±0,11, p<0,05).

Антигенне навантаження щурів II групи викликало збільшення кількості мастоцитів у 2 та 1,8 рази, порівняно з 4-м тижнем експерименту та тваринами групи I відповідно (p<0,05). Крім мастоцитів, статистично вагомо зростала кількість лейкоцитів у стінці вільцевих артерій – у 1,6 рази, порівняно з попереднім терміном дослідження, та у 1,7 рази порівняно з I групою. Макрофаги у 1,5 рази перевищували за кількістю відповідний показник на 4-му тижні та у групі I (p<0,05).

У цей період дослідження при аналізі зимограм вперше спостерігали виразні зміни ферментативної активності ММП-9 у імунізованих тварин, рівень якої зростав до 98,24±0,82 %, тобто на 14,6 %, порівняно з 4-м тижнем, в той час, як в I групі тварин цей показник знаходився на сталому рівні (p<0,05).

Вважаємо, це відбувається з метою полегшення міграції клітин з просвіту судин вглиб стінки, що узгоджується з результатами інших науковців [5,9]. У той же час, активність ММП-2 експериментальної групи тварин знаходилась на рівні, близькому до активності в I групі, і складала 74,55±0,86 % та 74,73±0,79 % відповідно (p<0,05).

При дослідженні зразків тканини серця на 12-му тижні експерименту, вперше спостерігалась

поява ліпідних крапель, які прилягали до внутрішньої еластичної мембрани. Форма контуру ендотелію змінювалась із звивистої на більш пряму, в окремих місцях виявлялась ендотеліальна денудация. Внутрішня еластична мембрана в деяких ділянках важко ідентифікувалась. Дезорганізація колагенових волокон виявлялась у вигляді їх розволокнення та фрагментації. Мали місце чітко виражені набухання та деструкція еластичних волокон.

Відбувалось прогресуюче потовщення підендотеліального шару, в порівнянні з попередніми періодами, в якому локалізувались макрофаги у кількості, що у 2,1 рази перевищувала відповідний показник на 8-му тижні експерименту (табл. 1) і аж у 3,2 рази перевищувала показник у I групі тварин ($p < 0,05$). Водночас зростала кількість мастоцитів з $5,73 \pm 0,11$ до $11,31 \pm 0,47$ клітин, тобто майже у 2 рази порівняно з попереднім терміном ($p < 0,05$), частина з них знаходилась у стані дегрануляції. Суттєві відмінності зафіксовано і при аналізі кількості мастоцитів порівняно з I групою тварин у 3,7 рази ($p < 0,05$).

Достовірно вагомим змін зазнавала і кількість лейкоцитів у стінці імунізованих тварин, що збільшилась у 2 рази порівняно з 8-м тижнем. Виявлено зростання вищезгаданого показника у 3,3 рази порівняно з I групою тварин ($p < 0,05$), що за даними літератури свідчить про прогресування атеросклеротичного процесу [2].

Вперше з початку експерименту при фарбуванні суданом III в інтимі артерій поряд з макрофагами зафіксовано появу так званих «пінистих» клітин, загальна кількість яких становила $4,73 \pm 0,30$ клітин на умовну одиницю площі поверхні судини.

Ми вважаємо, що зміна клітинного складу стінки судин пов'язана зі збільшенням їх міграційної активності з крові вглиб стінки через ділянки ендотелію з порушеною цілісністю, а також з причини структурних перебудов інтими, викликаних набряком та зміною локального гомеостазу.

Зміні клітинного складу стінки судин передували зміни активності ММП-2 та ММП-9, які носили різноспрямований характер. Показник активності ММП-2 в групі II на 46,3 % відрізнявся від аналогічного в попередній період дослідження ($p < 0,05$). В цей же час активність ММП-9 знизилась до $92,60 \pm 0,68$ %, тобто на 6,1 %, порівняно з попереднім терміном дослідження.

Стінка вінецьових артерій II групи тварин на 20-му тижні характеризувалася поглибленням змін гістоструктури порівняно із попереднім строком. Насамперед, це проявлялось у вигляді дифузного порушення ендотеліального пласту клітин, що часто асоціювалось з розривом внутрішньої еластичної мембрани. Виявлялось прогресуюче потов-

щення стінки артерій за рахунок зростання кількості пінистих клітин.

При гістологічному дослідженні помічено збільшення чисельності гладких міоцитів у внутрішній оболонці вінецьових артерій, а також їх дегенеративні зміни, які виявлялися у вигляді збільшення ступеня вакуолізації цитоплазми, збільшення ядра за рахунок набухання, його гіпохромії. Розташування гладких міоцитів у складі інтими спостерігалось переважно у зонах порушення внутрішньої еластичної мембрани. Відзначались значні зміни архітектури та відсутність цілісності еластичних й колагенових волокон медії.

Клітинні елементи стінки вінецьових артерій характеризувались дифузним типом розповсюдження: частина їх містилась у підендотеліальному просторі, інша частина спостерігалась у зоні адвентиції.

На максимальних строках експерименту відмічено одночасне зменшення доли мастоцитів та макрофагів у складі вінецьових артерій експериментальної групи тварин. Так, кількість мастоцитів знизилась у 1,8 рази в порівнянні з 12-м тижнем (табл. 1) ($p < 0,05$), що може бути пов'язане з їх дегрануляцією для полегшення міграційної активності клітин, у першу чергу гладких міоцитів.

Кількість макрофагів у 1,6 рази була меншою за аналогічний показник на 12-му тижні ($p < 0,05$), що відображає збільшення процесів диференціювання їх в пінисті клітини, рівень яких на 12 % був більшим за відповідний параметр на попередньому терміні експерименту.

Кількість лейкоцитів у стінці вінецьових артерій імунізованих тварин складала $39,37 \pm 1,10$ клітин на умовну одиницю площі, що значно перевищувала відповідний показник в порівнянні з I групою та попереднім терміном дослідження в 6,7 та в 2,1 рази відповідно ($p < 0,05$).

Ця стадія експерименту супроводжувалась максимальними показниками активності ММП-2, яка досягла $127,32 \pm 0,99$ % та була на 68,6 % більшою, порівняно з тваринами групи I ($p < 0,05$), де від початку експерименту не зафіксовано жодних змін у активності цього ферменту. Це додатково підкреслює існування зв'язку між рівнем її активності та ступенем порушення структури серцевих судин при атерогенезі [6,7].

Протилежні зміни зафіксовані в активності ММП-9, а саме: рівень її активності знизився до показника контрольної групи тварин ($p < 0,05$), що пов'язуємо зі зменшенням функціональної активності певних клітин, зокрема макрофагів.

Висновки. Відхилення активності ММП-2 та ММП-9 у ділянках атеросклеротичного ураження відображали ступінь дегградації компонентів позаклітинного матриксу: динаміка активності ММП-2

протягом експерименту мала лінійний характер, збільшуючись з 109,11±1,23 % на 12-му тижні до 127,32±0,99 % на 20-му тижні.

Активність ММП-9 досягала найбільших значень 98,24±0,82 % на 8-му тижні з наступним зменшенням до вихідного рівня 86,26±0,54 % на максимальних термінах експерименту.

Зростання активності ММП-9 вказувало на розвиток ранніх атеросклеротичних уражень на відміну від девіації активності ММП-2, які супрово-

джували значні структурні перебудови стінки вільцевих артерій.

Посилення активності ММП-2 співпадало зі збільшенням кількості лейкоцитів та макрофагів, в тому числі і пінистих клітин.

Перспективи подальших досліджень. Планується імуногістохімічний аналіз експресії обох матриксних металопротеїназ різними клітинними елементами серцевого м'яза.

References

1. Rahman MS, Woollard K. Atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1003: 121-44. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_7
2. Pende A, Artom N, Bertolotto M, Montecucco F, Dallegri F. Role of neutrophils in atherogenesis: an update. *European Journal of Clinical Investigation.* 2016 Feb 2; 46(3): 252–63. doi: 10.1111/eci.12566
3. Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Orekhov AN. Macrophages and their contribution to the development of atherosclerosis. *Results Probl Cell Differ.* 2017; 62: 273-98. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_11
4. Ruddy JM, Ikonomidis JS, Jones JA. Multidimensional contribution of matrix metalloproteinases to atherosclerotic plaque vulnerability: multiple mechanisms of inhibition to promote stability. *J Vasc Res.* 2016; 53: 1-16. doi: 10.1159/000446703
5. Sapa-Wojciechowska A, Rak-Pasikowska A, Pormańczuk K, Czapla B. Extracellular Matrix Remodeling Factors as Markers of Carotid Artery Atherosclerosis. *Cardiology Research and Practice.* 2020 Aug 12; Article ID 9036157, 11 pages. doi: 10.1155/2020/9036157
6. Markelova EV, Zdor VV, Romanchuk AL, Birko ON. Matriksnye metalloproteinazi i ih vzaimosvjaz' s sistemoj citokinov, diagnosticheskij i prognosticheskij potencial [Matrix metalloproteinases and their relationship with the cytokine system, diagnostic and prognostic potential]. *Immunopatologija, Allergologija, Infektologija.* 2016; 2: 11-22. [Russian]
7. Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-) Apob (100/100) mouse. *Int J Mol Med.* 2011 Aug; 28(2): 247-53. doi: 10.3892/ijmm.2011.693
8. Park J, Choi H, Abekura F, Lim HS, Im JH. Avenanthramide C Suppresses Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Migration Through the MAPK/NF-κB Signaling Pathway in TNF-α-Activated HASMC Cells. *Front Pharmacol.* 2021 Mar 25; 12: 621854. doi: 10.3389/fphar.2021.621854
9. Sabry M, Mostafa S, Rashed L, Abdelgwad M, Kamar S, Estaphan S. Matrix metalloproteinase 9 a potential major player connecting atherosclerosis and osteoporosis in high fat diet fed rats. *PLoS One.* 2021 Feb 11; 16(2): e0244650. doi: 10.1371/journal.pone.0244650
10. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circular Reseach.* 2002 Nov 1; 91(9): 852-9.
11. Shlyakhto EV, Gavrysheva NA, Ovchynnykova OA, Khansson GK. Vlyyanye yndutsyrovannogo vospalenyya na metabolizm kollagena v ateroskleroticheskykh blyashkakh u myshey [Effect of induced inflammation on collagen metabolism in atherosclerotic plaques in mice]. *Medytsynskaya ymmunologyya.* 2008; 10(6): 507-12. [Russian]. doi: 10.15789/1563-0625-2008-6-507-512
12. Men'shykov YV, Fomya KV, Beduleva LV. Eksperymental'naja model' ateroskleroza u krysv, vyzvannogo ymmunyzacyej natyvnyimi lypoproteynami cheloveka [Experimental model of atherosclerosis in rats caused by immunization with native human lipoproteins]. *Vestnyk Udmurtskogo unyversyteta.* 2012; 1: 80-6. [Russian]
13. Patent 83196 Ukraine, MPK G01N 33/49, G01N 27/26, G01N 33/84, G01N 33/96. Sposib viznachennya zhelatinaz u plazmi krovi [Method for determination of gelatinases in blood plasma] / Shevtsova AI, Gordienko YuA, Shaulska OE, Skoromna AS. (UA); zayavnik i vlasnik patentu Derzhavnyy Zaklad "Dnipropetrovska Medychna Akademiya Ministerstva Okhorony Zdorov'ya Ukrainy" (UA). № u 2013 03700; zayavl 26.03.2013 ; opubl 27.08.2013. Byul № 16. [Ukrainian]
14. Shponka IS, Svyatenko TV, Voznyak IYa, Poslavskaya O.V. Analiz pokaznykiv ekspresiyi imunogistokhimichnykh markeriv proliferatsiyi, vaskulyaryzatsiyi, apoptozu, CD3+ i CD68+ mononuklearnoyi infiltratsiyi ta klityn Langergansa v zalezhnosti vid formy ta vazhkosti perebigu psoriazu [Analysis of expression indicators of immunohistochemical markers of proliferation, vascularization, apoptosis, CD3 + and CD68 + mononuclear infiltration and Langergans cells in the shape of the form and severity of psoriasis]. *Morfologiya.* 2013; 7(3): 117-26. [Ukrainian]

УДК 616.132.2-002-092.9: 577.152.34: 576.53

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 И -9 В ГОМОГЕНАТЕ МИОКАРДА С ИЗМЕНЕНИЯМИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА СТЕНКИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Трясак Н. С., Козлова Ю. В.

Резюме. В сложный многофакторный процесс образования атеросклеротической бляшки активно вовлекаются матриксные металлопротеиназы, которые играют ведущую роль в деградации компонентов экстрацеллюлярного матрикса и увеличении миграционной активности клеточных элементов стенки сосудов. Несмотря на ряд научных исследований, существует необходимость определения достоверных биохимических маркеров развития атеросклеротических поражений.

Целью исследования было изучение взаимосвязи между активностью ММП-2 и ММП-9 в гомогенате сердечной мышцы и изменениями клеточного состава стенки коронарных сосудов при экспериментальном атеросклерозе.

Объект и методы. Эксперимент проводился на 76 нелинейных крысах обоих полов, которые были распределены на 3 группы: Ia – контрольная (n=20) – животные, которым вводили внутривенно 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида; Ib – группа сравнения (n=20) – животные, которым вводили неполный адьювант Фрейнда в дозе 0,1 мл внутривенно и II – экспериментальная группа (n=36), которые были однократно иммунизированы нативными липопротеинами низкой плотности человека в дозе 200 мкг, разведенными в 0,1 мл неполного адьюванта Фрейнда. Срок эксперимента составил 20 недель. Забор материала проводили, начиная с 4-й недели после введения препарата. С венечных артерий и прилегающего миокарда изготавливали микропрепараты согласно общепринятой методике, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методам Ван-Гизон, Маллори и суданом III. Для выявления активности ММП-2 и ММП-9 использовали метод прямой энзим-зимографии.

Результаты и выводы. Установлено, что динамика активности ММП-2 в течение эксперимента имела линейный характер, увеличиваясь с 109,11±1,23 % на 12-й неделе до 127,32±0,99 % на 20-й неделе и сопровождала выраженные нарушения гистоструктуры стенки венечных артерий. Усиление активности ММП-2 совпадало с увеличением количества лейкоцитов и макрофагов, в том числе и пенистых клеток.

Активность ММП-9 достигала наибольших значений 98,24±0,82 % на 8-й неделе с последующим уменьшением до исходного уровня 86,26±0,54 % на максимальных сроках эксперимента и ассоциировалась с развитием ранних атеросклеротических поражений.

Ключевые слова: атеросклероз, венечные сосуды, матриксные металлопротеиназы, крысы.

UDC 616.132.2-002-092.9:577.152.34:576.53

Relationship between the Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Myocardial Homogenate with Changes of the Cells Composition in the Coronary Arteries Wall in the Experiment

Tryasak N. S., Kozlova Yu. V.

Abstract. Matrix metalloproteinases are involved in a complex multifactorial process of atherosclerotic plaque formation and play a leading role in the degradation of the extracellular matrix components and increase the migratory activity of cellular elements of the vascular wall. Despite a number of scientific studies, it is necessary to identify clear biochemical markers for the development of atherosclerotic lesions.

The purpose of the study was to investigate the relationship between the activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in myocardial homogenate with changes of the cells composition in the coronary arteries wall in experimental atherosclerosis.

Materials and methods. The studies were performed on 76 nonlinear rats, which were divided into 3 groups: group Ia was the control (n=20) – animals, injected intracutaneously with 0.1 ml of 0.9 % sodium chloride solution; Ib – comparison group (n=20) – animals injected with incomplete Freund's adjuvant at the dose of 0.1 ml intracutaneously and II – experimental group (n=36), which were immunized with native human low-density lipoprotein at a single dose of 200 µg, diluted in 0.1 ml of incomplete Freund's adjuvant, regardless of the weight. The experiment lasted for 20 weeks. Material sampling was performed, starting from the 4th week after the drug administration. From the coronary arteries and the adjacent myocardium, microslides were made according to the generally accepted technique, which were stained with hematoxylin and eosin, according to the methods of Van Gizon, Mallory and Sudan III. The activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 was determined by enzyme-zimographic method.

Results and discussion. The growth of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in atherosclerotic lesions showed stages of degradation of extracellular matrix components: the dynamics of matrix metalloproteinase-2 activity during the experiment increased from 109.1 ± 1.23 % at the 12th week to 127.32 ± 0.99 % at the 20th week. The increased activity of matrix metalloproteinase-2 was associated with an increase in the number of leukocytes and macrophages, including foam cells. The activity of matrix metalloproteinase-9 reached the highest values of 98.24 ± 0.82 % at the 8th period from the onset of changes to the final level of 86.26 ± 0.54 % at the maximum terms of the experiment.

Conclusion. The growing activity of matrix metalloproteinase-9 indicated the development of early atherosclerotic lesions, while the high level of activity of matrix metalloproteinase-2 indicated significant structural changes in the wall of the coronary arteries.

Keywords: atherosclerosis, coronary arteries, matrix metalloproteinases, rats.

ORCID and contributionship:

Nataliya S. Tryasak: 0000-0002-0897-7102^{A,B,D,F}

Yuliiya V. Kozlova: 0000-0002-1918-2946^{A,B,C,D,E}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Nataliya S. Tryasak

Dnipro State Medical University,
Pathological Physiology Department
9, Vernads'kogo St., Dnipro 49000, Ukraine
tel: +38098-037-0360, e-mail: nataliatryasak@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Received: 29.03.2021 p.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування