

РОЛЬ ІНГІБІТОРІВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ І АНТИОКСИДАНТІВ У ЗБЕРЕЖЕННІ ГОМЕОСТАЗУ ЕКСТРАКЛІТИННОГО МАТРИКСУ СЕРЦЯ

А. Шевцова, Ю. Гордієнко

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
вул. Дзержинського, 9, Дніпро 49044, Україна
e-mail: shevtsova-a@mail.ru*

У роботі представлено результати дослідження активності матриксних металопротеїназ ММП2 та ММП9, трипсиноподібних ензимів (ТПЕ), альфа-1-інгібітора протеїназ (АПП) у щурів з доксорубіцин-індукованою кардіоміопатією за впливу препаратів з антиоксидантною дією (корвітину й альфа-кетоглутарату), а також селективних і неселективних інгібіторів циклооксигеназ (кеторолаку, лорноксикаму та целекоксибу). Встановлено, що тривале застосування доксорубіцину призводить до характерних для кардіоміопатії морфологічних та біохімічних змін у серцевому м'язі, вірогідному збільшенню активності латентних та зрілих форм ММП2/9 і зниженню активності ТПЕ та рівня АПП. При застосуванні корвітину відновлюється активність ТПЕ та АПП і знижується ММП, а за дії альфа-кетоглутарату активність ММП, навпаки, підвищується у 3,3-4,6 разу. Показано, що інгібітори ЦОГ1-2 також змінюють активність матрикс-деградуючих ферментів, причому напрям змін залежить від специфічності застосованого інгібітора. На основі аналізу власних і літературних даних розроблена схема взаємодій у системі матрикс-деградуючих ензимів і визначена роль досліджуваних препаратів у підтриманні гомеостазу екстраклітинного матриксу в серці.

Ключові слова: матриксні металопротеїнази, трипсиноподібні ензими, альфа-1-інгібітор протеїназ, антиоксиданти, інгібітори циклооксигеназ.

Екстраклітинний матрикс (ЕКМ) є динамічною структурою, яка відіграє важливу роль у процесах розвитку і росту, впливаючи на проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин [5, 9]. Розвиток серцево-судинної патології безпосередньо пов'язаний з деградацією компонентів ЕКМ [6] і відбувається за сукупною дією матриксних металопротеїназ (ММП), серинових і цистеїнових протеїназ. Найбільш потужну протеолітичну дію на білки ЕКМ проявляють ММП, особливо желатинази А (ММП2) та В (ММП9), основним субстратом яких є колаген IV типу, що становить структурну основу базальних мембран. Серед серинових протеїназ найбільш розповсюдженими є трипсиноподібні ензими (ТПЕ), які можуть руйнувати білки ЕКМ як безпосередньо, так і шляхом протеолітичної активації латентних форм матриксних металопротеїназ [8]. Активність зазначених вище ензимів і ступінь деградації ЕКМ залежать від кількості тканинних інгібіторів матриксних металопротеїназ (ТІМП) та неспецифічних інгібіторів протеолітичних ферментів, у тому числі альфа-1-антитрипсину й альфа-2-макроглобуліну. Порушення протеазно-інгібіторного балансу в ЕКМ є причиною або наслідком патологічного процесу в серцевому м'язі, тому пошук засобів, що підтримують цей баланс, є актуальним напрямом досліджень.

Метою роботи було визначення ролі інгібіторів циклооксигеназ (ЦОГ) і антиоксидантів у процесах деградації ЕКМ у серцевому м'язі та доповнення сучасних даних про біохімічні механізми їхньої дії на моделі антрациклінової кардіоміопатії.

Матеріали та методи

Усі дослідження були проведені на щурах лінії Вістар вагою 210±50 г, яким моделювали кардіоміопатію шляхом щотижневого введення антрациклінового антибіотика

доксорубіцину (ДР) у дозі 5 мг/кг ваги протягом 28 діб. Тварин було поділено на групи по 8 щурів у кожній: 1 група отримувала ін'єкції фізіологічного розчину, 2 – ДР за наведеною вище схемою, 3 – корвітин (К) за 30-60 хвилин перед введенням ДР, 4 – 1% розчин альфа-кетоглутарату (АКГ) з питною водою протягом всього експерименту, 5 – селективний інгібітор ЦОГ1 кеторолак у дозі 30 мкг/кг маси, 6 – неселективний інгібітор ЦОГ лорноксикам у дозі 1,3 мг/кг маси, 7 – селективний інгібітор ЦОГ2 целекоксиб у дозі 50 мг/кг маси. Після закінчення експерименту проводили декапітацію тварин з використанням тіопенталу натрію (60 мкг/кг) згідно з принципами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях». Для досліджень використовували цитратну плазму й екстракт розчинних білків серцевого м'яза, який отримували шляхом гомогенізації при температурі 4 °С у 0,025 М трис-НСІ буфері з рН 7,2 у співвідношенні 1:4 та осадженням нерозчинних білків центрифугуванням впродовж 5 хв при 8000 об/хв. Супернатант відбирали для подальших досліджень.

Активність трипсиноподібних ензимів (ТПЕ) та кількість альфа-1-інгібітора протеїназ (АІП) визначали за Веремеєнко [1], активність ММП2 та ММП9 – методом прямої ензімографії [2]. Питому активність досліджуваних ензимів розраховували на 1 мг протеїну, визначаючи його концентрацію за методом Бредфорда.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента і непараметричний критерій Манна-Уїтні (U-критерій). Вірогідними вважали результати, якщо $p \leq 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

При гістологічному дослідженні серця щурів встановлено, що тривале застосування ДР призводить до зменшення кількості міоцитів на тлі збільшення вмісту сполучної тканини; спостерігається ушкодження окремих кардіоміоцитів та ділянки атрофії. За результатами біохімічного аналізу визначено зростання активності АсАТ в 1,3 разу, а ЛДГ – в 1,8 разу. Отримані дані свідчать про розвиток доксорубіцин-індукованої кардіоміопатії (ДКМП).

Оцінка активності ММП2 та ММП9 у плазмі крові та серцевому м'язі щурів з ДКМП показала їхнє вірогідне підвищення. Особливо значимі зміни знайдені для проММП9: її активність в плазмі зростала майже удвічі, а в екстракті міокарда – у 1,5 рази. Такі зміни активності ММП можуть бути наслідком посилення їхнього синтезу або активації вільно радикального окислення. Відомо, що за участі пероксинітриду [7] відбувається приєднання глутатіону до SH-групи цистеїну у складі пропептидного домену ММП2, що призводить до експонування активного центру ензиму, деградації під його дією саркомерних білків і порушенню структури та функцій кардіоміоцитів. Додатковим внеском у підвищення активності желатиназ при ДКМП є інактивація ТІМП4 – основного інгібітора ММП у серцевому м'язі, що також здійснюється за участі пероксинітриду [4]. Що стосується активності ТПЕ, то за умов ДКМП цей показник знижувався у серцевому м'язі удвічі щодо норми, а у плазмі крові зростав утричі, що може бути наслідком вивільнення цих ферментів зі зруйнованих кардіоміоцитів. Застосування К та АКГ призводило до відновлення активності ТПЕ та різноспрямованих змін активності ММП у серцевому м'язі: за впливу К їхня активність вірогідно знижувалась, а за дії АКГ ($p \leq 0,001$), підвищувалась у 3,3-4,6 разу порівняно з щурами з ДКМП. Дослідження впливу інгібіторів ЦОГ на активність ММП2/9 показало, що напрям змін залежить від типу використаного інгібітора (див. таблицю).

Основним інгібітором ТПЕ у крові є альфа-1-інгібітор протеїназ (АІП), що гальмує активність серинових протеїназ. За нашими даними, при ДКМП у плазмі крові щурів концентрація АІП нижче норми. За впливу К його кількість ще більше знижується, а при застосуванні АКГ зростає до нормальних значень. В екстрактах серцевого м'яза щурів

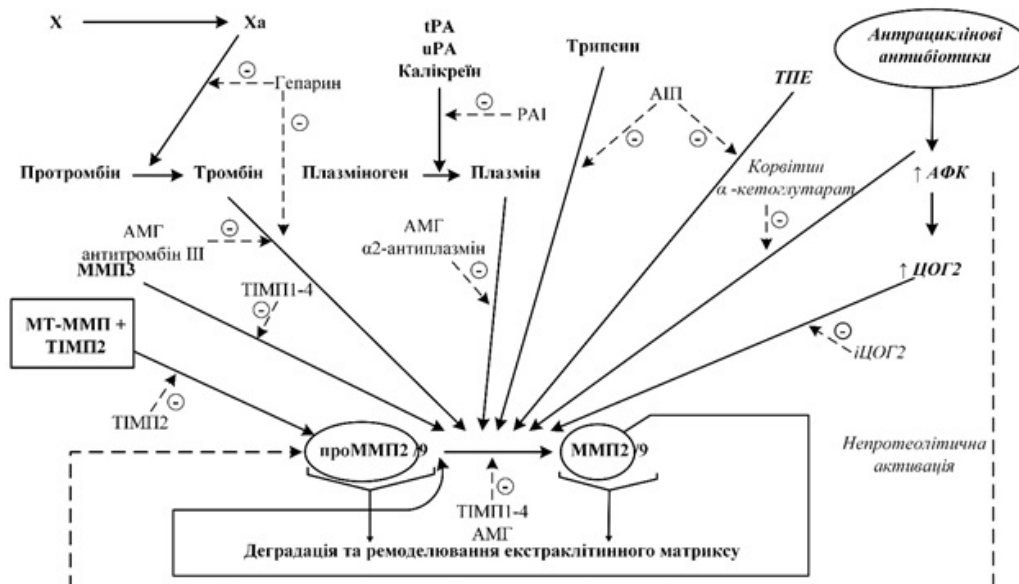
спостерігалась інша картина: у групі контролю вміст АПП був удвічі нижчий, ніж у плазмі, й становив $170,814 \pm 25,330$ мкмоль/л й $347,241 \pm 12,216$ мкмоль/л відповідно. При ДКМП цей показник підвищувався до $264,580 \pm 19,060$ мкмоль/л, при цьому виявлено сильний негативний корелятивний зв'язок між активністю ТПЕ й АПП ($r = -0,946$). Застосування К й АКГ на фоні ДКМП у щурів призводило до вірогідного підвищення концентрації АПП у серцевому м'язі, що дорівнювала $315,359 \pm 5,125$ та $313,265 \pm 12,292$ мкмоль/л, відповідно.

Відносна активність ММП2 і ММП9 у щурів при доксорубіциновій кардіоміопатії (ДКМП) на фоні застосування різних типів інгібіторів ЦОГ (ум. од., $M \pm m$; $n=8$)

Група тварин	проММП9	ММП9	проММП2	ММП2
Контроль	$1,04 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,02$
ДКМП	$1,39 \pm 0,01^{***}$	$1,19 \pm 0,01^{***}$	$1,51 \pm 0,06^{***}$	$1,05 \pm 0,01^*$
ДКМП + кеторолак	$1,41 \pm 0,24$	$0,67 \pm 0,07^{**/§§§}$	$0,78 \pm 0,02^{***/§§§}$	$1,05 \pm 0,02^{**}$
ДКМП + лорноксикам	$1,22 \pm 0,03^{*/§§§}$	$0,70 \pm 0,05^{**/§§§}$	$0,84 \pm 0,04^{**/§§§}$	$1,03 \pm 0,01^{**}$
ДКМП + целекоксиб	$1,10 \pm 0,02^{§§§}$	$1,00 \pm 0,08^{§§}$	$1,34 \pm 0,05^{**/§}$	$1,31 \pm 0,01^{***/§§§}$

Примітка: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ – вірогідно щодо контрольної групи; § $p \leq 0,05$, §§ $p \leq 0,01$, §§§ $p \leq 0,001$ – вірогідна різниця щодо групи з ДКМП.

Зіставлення та узагальнення отриманих результатів з літературними даними дало змогу висунути гіпотезу про кооперативну роль ТПЕ та ММП 2/9 у розвитку й перебігу не тільки ДКМП, а й інших патологічних станів (див. рисунок). Оскільки ТПЕ здатні впливати на активність ММП 2/9, сприяючи перетворенню їх латентних форм на функціонально активні шляхом обмеженого протеолізу, то інгібітори ТПЕ можуть перешкоджати даному процесу. За умов патологічних станів активація ММП може відбуватися непротеолітичним шляхом унаслідок вивільнення активних форм кисню (АФК), що призводить до руйнування координаційного зв'язку між продоменом і каталітичним центром та експонування останнього без зміни молекулярної маси ензиму. АФК також можуть сприяти вивільненню ММП і утворенню активних форм ММП через індукцію ЦОГ2 і підвищення рівня простагландину E_2 [3].



Виходячи з викладеного вище, можна стверджувати, що інгібітори ЦОГ2 та препарати, які гальмують утворення активних форм кисню, очікувано знижують і активність матрикс-деградуючих ферментів, пригнічуючи патологічні процеси, пов'язані з деградацією та перебудовою ЕКМ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Веремеєнко К. М., Голобородько О. П., Кизим А. И.* Протеолиз в норме и при патологии. К.: Здоров'я, 1988. 200 с.
2. Пат. 83196 Україна, МПК G 01 № 33/49. Спосіб визначення желатиназ у плазмі крові / Шевцова А. І., Гордієнко Ю. А., Шаульська О. Е., Скоромна А. С. № у 2013 03700; заявл. 26.03.2013; опубл. 27.08.2013, Бюл. №16. 4 с.
3. *Cipollone F., Fazia M. L.* COX-2 and atherosclerosis // *J. Cardiovascular Pharmacology*. 2006. Vol. 47. № 1. P. 826-836.
4. *Kandasamy A. D., Chow A. K., Ali M. A., Schulz R.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix // *Cardiovasc. Res*. 2010. Vol. 85. № 3. P. 413-423.
5. *Lu P., Takai K., Weaver V. M., Werb Z.* Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2011. Vol. 3. № 12. P. 1-24.
6. *Mouw J. K., Ou G., Weaver V. M.* Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014. Vol. 15. № 12. P. 771-785.
7. *Mukhopadhyay P., Rajesh M., Batkai S. et al.* Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2009. Vol. 296. № 5. P. 1466-1483.
8. *Page M. J., Di Cera E.* Serine peptidases: classification, structure and function // *Cell Mol. Life Sci*. 2008. Vol. 65. № 7-8. P. 1220-1236.
9. *Rozario T., DeSimone D. W.* The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // *Dev. Biol*. 2010. Vol. 341. № 1. P. 126-140.

Стаття: надійшла до редакції 29.07.16

доопрацьована 1.09.16

прийнята до друку 2.09.16

РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ И АНТИОКСИДАНТОВ В СОХРАНЕНИИ ГОМЕОСТАЗА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА СЕРДЦА

А. Шевцова, Ю. Гордиенко

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины»

ул. Дзержинского, 9, Днепр 49044, Украина

e-mail: shevtsova-a@mail.ru

В работе представлены результаты исследования активности матриксных металлопротеиназ ММП2 и ММП9, трипсиноподобных энзимов (ТПЭ), альфа-1-ингибитора протеиназ (АИП) у крыс с доксорубин-индуцированной кардиомиопатией и оценено влияние на эти показатели препаратов с антиоксидантным действием (корвитина и альфа-кетоглутарата), а также селективных и неселективных ингибиторов циклооксигеназ (кеторолака, лорноксикама и целекоксиба). Установлено, что длительное применение доксорубина приводит к характерным для кардиомиопатии морфологическим и биохимическим изменениям в сердечной мышце,

достоверному увеличению активности разных форм ММП 2/9, снижению активности ТПЭ и АИП. Под влиянием корвитина уровни ТПЭ и АИП восстанавливаются, активность ММП снижается, в то время как альфа-кетоглутарат повышает активность ММП 2/9 в 3,3-4,6 раза. Показано, что ингибиторы ЦОГ также изменяют активность матрикс-деградирующих ферментов, причем направление изменений зависит от специфичности ингибитора. На основе анализа собственных и литературных данных разработана схема взаимодействий в системе матрикс-деградирующих ферментов и определена роль указанных выше препаратов в сохранении гомеостаза внеклеточного матрикса в сердце.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, трипсиноподобные энзимы, альфа-1-ингибитор протеиназ, антиоксиданты, ингибиторы циклооксигеназ.

ROLE OF COX-INHIBITORS AND ANTIOXIDANTS IN SAVING OF HEART EXTRACELLULAR MATRIX HOMEOSTASIS

A. Shevtsova, Iu. Gordiienko

*SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Healthcare of Ukraine"
9, Dzerzhynskiy St., Dnipro 49044, Ukraine
e-mail: shevtsova-a@mail.ru*

The study of activity of matrix metalloproteinases MMP2/MMP9, trypsin-like enzymes (TLE) and alpha-1-proteinase inhibitor (AIP) in heart and plasma of rats with doxorubicin cardiomyopathy was carried out, as well as impacts of antioxidants (corvutin and alpha-ketoglutarat), selective and nonselective cyclooxygenase (COX) inhibitors (ketorolac, lornoxicam and celecoxib) on these parameters was estimated. It was found that doxorubicin causes morphological and biochemical changes in the heart, increases the activity of different forms of MMP2/9 and reduces the TLE and AIP activities. The activities of the enzymes and AIP recovered after application of corvutin. In contrast, alpha-ketoglutarate increased the MMP2/9 activities by 3.3-4,6 times. It has been shown that COX-inhibitors cause changes of the activity of matrix-degrading enzymes, and the direction of changes depends on the specificity of inhibitor. Based on our and literature data we have developed the scheme of interaction of enzymes which cause degradation of the matrix and shown the role of the investigated drugs in maintaining homeostasis in the heart

Keywords: matrix metalloproteinases trypsin-like enzymes, alpha-1-proteinase inhibitor, antioxidants, cyclooxygenase inhibitors.