



УДК 577.15:616.1-092.4:615.276

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ЖЕЛАТИНАЗ У ЩУРІВ З АНТРАЦИКЛІНОВОЮ КАРДІОПАТІЄЮ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ І КВЕРЦЕТИНУ

**Ю. А. Гордієнко^{1,2}, Є. А. Чернов¹, В. Й. Мамчур¹,
О. А. Коваль¹, В. Ю. Кротова³, А. І. Шевцова¹**

¹Дніпропетровська державна медична академія
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ 49044, Україна
e-mail: gordienko.ju@gmail.com

²КЗ „Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4”
вул. Ближня, 31, Дніпропетровськ 49102, Україна

³Міська клінічна лікарня № 16,
вул. Героїв Сталінограда, 19, Дніпропетровськ 49000, Україна

У роботі проведено аналіз активності желатиназ А та В за умов доксорубіцин-індукованої кардіопатії у щурів при застосуванні інгібіторів циклооксигеназ – кеторолаку, лорноксикаму та целекоксибу.

Виявлено достовірне підвищення активності обох желатиназ при кардіопатії у щурів. Під впливом кеторолаку активність желатинази В підвищується, а желатинази А пригнічується. Протилежна реакція спостерігалася при застосуванні целекоксибу: активність желатинази В знижувалась, а желатинази А підвищувалась. Введення біофлавоноїду кверцетину спільно з інгібіторами ЦОГ призводило до зниження активності латентних форм обох желатиназ. Зроблено висновок, що стабілізація активності желатиназ є одним із показників регулювання метаболізму міокарда та додатковим показником розвитку фіброзу.

Ключові слова: желатинази А та В, кардіопатія, інгібітори ЦОГ, кверцетин.

ВСТУП

Желатинази належать до кальційзалежних цинкових матриксних металопротеїназ і позначаються як ММП2 (желатиназа А) та ММП9 (желатиназа В). Обидва ферменти відрізняються від інших ММП наявністю фібронектинового желатинзв'язувального домену, що входить до складу активного центру, тому ці ферменти проявляють однакову субстратну специфічність і здатні розщеплювати такі білки екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), як колаген IV, V та XI типів, ламінін, агрекан, еластин, фібронектин тощо. Активність желатиназ контролюється багатьма чинниками (ендогенні інгібітори, цитокіни та фактори росту і т.п.), в тому числі й активними формами кисню [15].

За умов надлишкового утворення активних форм кисню (АФК) відбувається інтенсифікація протеолітичних процесів у ЕЦМ. Желатинази займають центральну позицію у регулюванні балансу між процесами синтезу та протеолізу і відіграють вирішальну роль в реалізації патологічних змін у ЕЦМ [4]. З іншого боку, АФК активують циклооксигенази (ЦОГ1, ЦОГ2), що регулюють перетворення арахідонової кислоти у простагландини та впливають таким чином на запальні процеси в організмі. Обидва ці процеси лежать в основі кардіотоксичної дії антрациклінових антибіотиків [3].

На даний момент немає специфічних засобів селективної протекції кардіоміоцитів проти ушкоджень, спричинених антрациклінами, тому актуальним є пошук стратегій, що покращували б антиоксидантний захист кардіоміоцитів проти реактивних форм кисню, що стимулюються цими антибіотиками. Одним із можливих підходів є застосування інгібіторів ЦОГ та біофлавоноїдів як препаратів, що зменшують запалення і таким чином впливають на активність протеолізу в серцевому м'язі. Однак роботи в цьому напрямі не проводились.

Метою дослідження було оцінити вплив селективних та неселективних інгібіторів ЦОГ і біофлавоноїду кверцетину на активність желатиназ А та В у щурів з індукованою кардіопатією.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент проводили на білих самцях щурів лінії Вістар вагою 220 ± 10 г. Щурів було поділено на 9 груп по 6 особин у кожній. До першої групи увійшли інтактні тварини, у всіх інших була використана модель кардіопатії (КП): щурам вводили доксорубіцин у дозі 5 мг/кг ваги один раз на тиждень протягом п'яти тижнів [2]. Залежно від застосованого препарату всі тварини були розділені на такі групи: 2 – щурі із доксорубіцин-індукованою КП, 3-тя група тварин, окрім доксорубіцину, отримувала препарат кверцетин (Борщагівський хімфармзавод, Україна) *per os* у дозі 50 мг/кг ваги, 4 – кеторолак (Runbaху, Індія) 30 мг/кг ваги, 5 – лорноксикам (Nicomed, Данія) 1,3 мг/кг ваги, 6 – целекоксиб (Авант, Україна) 50 мг/кг ваги. 7, 8, 9 групи отримували, окрім вище зазначених препаратів, кверцетин у дозі, що була вказана вище. Усі препарати вводили внутрішньошлунково 1 раз на день протягом 35 днів. Після закінчення експерименту всіх тварин декапітували під наркозом з використанням тіопенталу натрію в дозі 60 мг/кг згідно з етичними принципами „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та в інших наукових цілях”.

Для оцінки стану міокарда проводили реєстрацію ЕКГ на 21-шу та 35-ту добу експерименту у тварин, що перебували в стані тіопенталового наркозу (40 мг/кг). Наявність КП підтверджували за результатами патоморфологічних і біохімічних досліджень (підвищення активності аланінамінотрансферази, лактатдегідрогенази 1, креатинкінази).

Оцінку активності желатиназ у плазмі піддослідних щурів проводили методом прямої ензим-зимографії з попереднім вертикальним електрофорезом зразків плазми у 10% поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію та додаванням 1% желатини як субстрату [16]. Дія желатиназ проявлялась як знебарвлені смуги на синьому фоні, причому ступінь знебарвлення пропорційно відображав активність ферменту. Ідентифікацію зон, що відповідають проММП2, ММП2, проММП9 і ММП9, проводили за допомогою маркерів Bio-Rad Lab (Німеччина) та позитивного контролю на

ці ферменти Sigma (США). Для кількісної оцінки активності желатиназ використовували програму Sorbfil 2.0, розраховуючи відсоток щодо активності цих ферментів у плазмі крові інтактних щурів, середня активність яких прийнята за 100%. Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм Статистика 6.0. Достовірність відмінностей оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Вітні.

РЕЗУЛЬТАТИ

Як видно з рис. 1, інтенсивність знебарвлення зон зимограм, які відповідають латентним і зрілим формам желатиназ А та В, змінюється залежно від типу використаних препаратів. У всіх випадках зони 92 кДа значно деколоровані, а зони 82 кДа менш знебарвлені порівняно з контролем, тобто активність проММП9 збільшена, а ММП9, навпаки, зменшена. Більш інтенсивне знебарвлення характерне для зон, що відповідають проММП2 та ММП2, причому найбільш виражені зміни спостерігались у щурів, яким одночасно вводили іЦОГ та кверцетин (рис. 1, б).

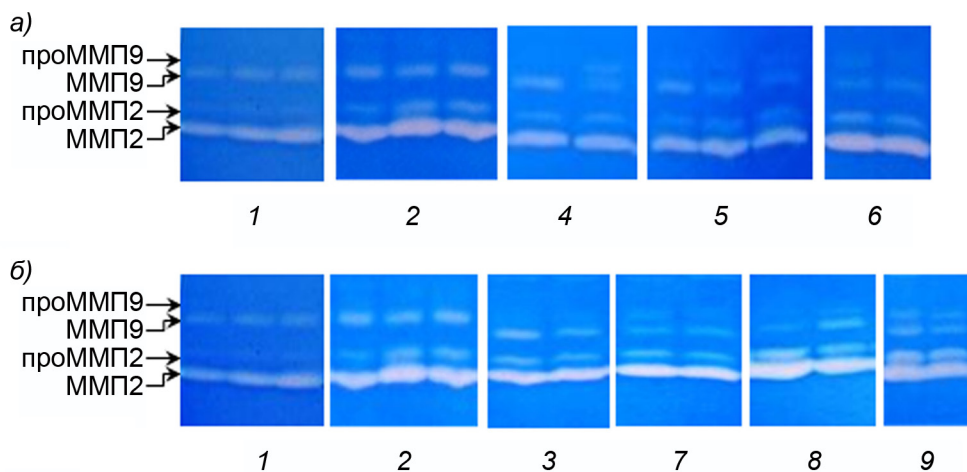


Рис. 1. Зимограми плазми крові щурів з доксорубіцин-індукованою кардіопатією на тлі використання інгібіторів ЦОГ:

а) 1 – у інтактних тварин; 2 – за умов доксорубіцин-індукованої кардіопатії; 4, 5, 6 – за умов використання кеторолаку, лорноксикаму та целекоксибу, відповідно;

б) 1 – у інтактних тварин; 2 – за умов доксорубіцин-індукованої кардіопатії; 3 – на тлі використання кверцетину; 7, 8, 9 – при використанні кверцетину сумісно з кеторолаком, лорноксикамом, целекоксибом, відповідно

Fig. 1. Zymographic gels of rat blood plasma with doxorubicin-induced cardiopathy against COX inhibitors:

а) 1 – intact animals, 2 – doxorubicin-induced cardiopathy, 4, 5, 6 – after applying the ketorolac, lornoxicam and celecoxib respectively;

б) 1 – intact animals, 2 – doxorubicin-induced cardiopathy, 3 – against the use of quercetin, 7, 8, 9 – after applying quercetin together with ketorolac, lornoxicam, celecoxib, respectively

Результати кількісної оцінки зимограм представлені на рис. 2, а. Як видно з рисунка, при КП підвищувалась активність усіх форм желатиназ щодо інтактних тварин, причому підвищення активності латентних форм було більш вираженим і становило $152,08 \pm 5,78\%$ для проММП2 та $119,45 \pm 1,16\%$ для проМММ9.

Застосування різних фармакологічних препаратів, що за механізмом дії є інгібіторами ЦОГ, призводило до змін активності желатиназ. Так, активність ММП9 у 4-й та 5-й групах достовірно знижувалася до $67,30 \pm 7,09$ і $70,07 \pm 5,36\%$, активність

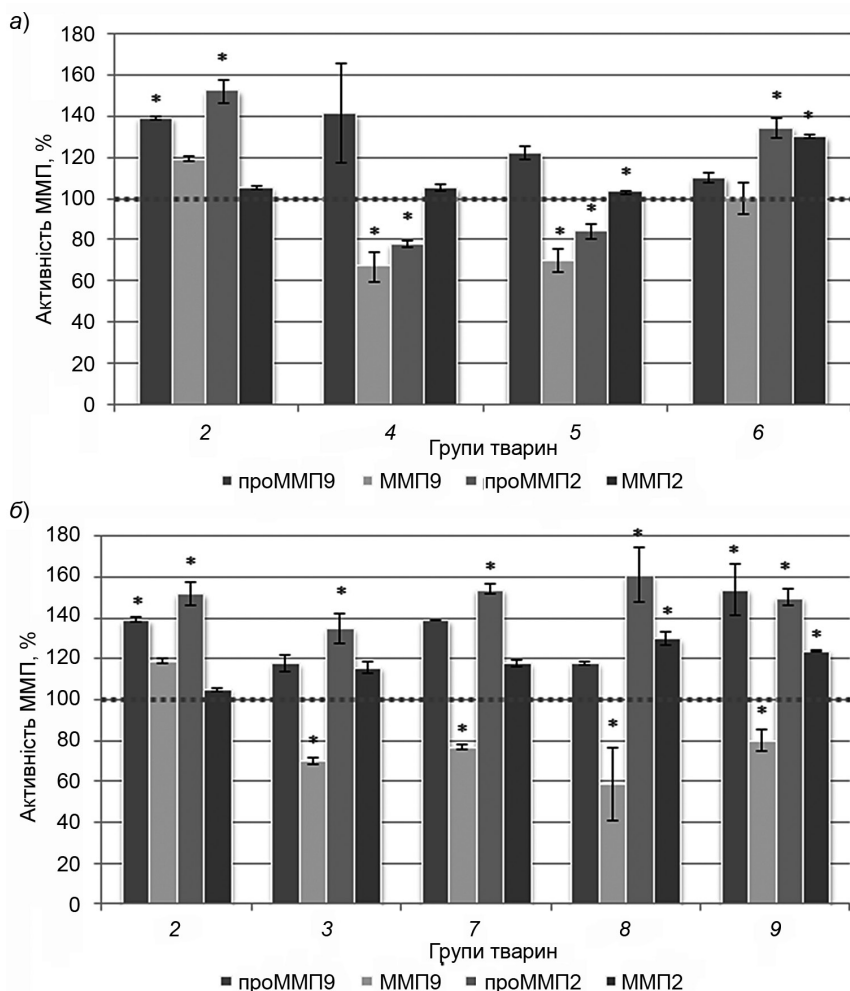


Рис. 2. Рівень активності ММП2 та ММП9 (%) у плазмі щурів з доxorубіцин-індукованою кардіопатією при застосуванні інгібіторів ЦОГ щодо норми (штрихована лінія):

а) 2 – активність ММП2 та ММП9 при кардіопатії; 4 – на тлі використання кеторолаку; 5 – лорноксикаму; 6 – целекоксибу;

б) 2 – активність ММП2 та ММП9 при кардіопатії; 3 – на тлі використання кверцетину; 7, 8, 9 – при використанні кеторолаку, лорноксикаму, целекоксибу та кверцетину, відповідно

* – достовірна різниця порівняно з контролем при $p < 0,001$

Fig. 2. The level of MMP2 and MMP9 activity (%) in plasma of rats with doxorubicin-induced cardiopathy at the application of COX inhibitors comparatively to norm (stroking line):

а) 2 – the activity of MMP2 and MMP9 at cardiopathy, 4 – against the use of ketorolak, 5 – lornoxycam, 6 – celecoxib;

б) 2 – the activity of MMP2 and MMP9 at cardiopathy, 3 – against the use of quercetin, 7, 8, 9 – after applying the ketorolak, lornoxycam, celecoxib and quercetin, respectively

* – significant differences compared with control at $p < 0,001$

проММП2 у цих групах також зменшувалась і становила $78,18 \pm 1,5$ та $84,47 \pm 3,57\%$ відповідно. В той же час активність проММП9 та ММП2 практично не змінювалась порівняно зі щурами другої групи. У 6-й групі щурів знижувалась активність проформ обох желатиназ і зрілої ММП9 порівняно з показниками щурів 2-ї групи, тоді як активність ММП2 вірогідно підвищувалась і становила $130,77 \pm 0,89\%$ ($p < 0,001$).

Застосування біофлавоноїду кверцетину призводило до зниження активності всіх форм желатиназ, окрім ММП2, активність якої достовірно підвищувалась і становила $116,11 \pm 2,68\%$ ($p < 0,01$). У 7-й та 8-й групах піддослідних тварин введення кверцетину слабо впливало на активність желатинази В, але значно посилювало активність желатинази А. У 9-й групі застосування кверцетину на тлі прийому целекоксибу у щурів із КП призводило до зниження ефекту дії останнього на активність латентних форм.

ОБГОВОРЕННЯ

Кардіотоксичність доксорубіцину та інших антрациклінових антибіотиків обмежує використання цих препаратів в онкологічній практиці. Токсична дія доксорубіцину на кардіоміоцити значною мірою реалізується через утворення АФК, надмірна кількість яких виступає як активатор ЦОГ2 [12]. Індукція ЦОГ призводить до утворення ПГЕ₂ (простагландин Е₂) з вираженою проагрегантною дією, акумуляції макрофагів і поліморфноядерних нейтрофілів, які активують желатинази ПГЕ₂/цАМФ-залежним шляхом та за рахунок індукції синтезу ІЛ-6 (інтерлейкін 6), що також є активатором желатиназ [11].

Відомо, що у здоровому серці желатинази синтезуються в невеликій кількості [5]. Наші дослідження показали, що за умов доксорубіцин-індукованої КП у плазмі крові щурів достовірно підвищується активність желатиназ, і це збігається з даними інших дослідників [6]. Зростання активності желатиназ супроводжується руйнуванням колагенового каркаса, деградацією ЕЦМ міокарда і перебудовою архітекtonіки лівого шлуночка [1]. Отже, підвищення активності желатиназ свідчить про наявність патологічних змін у серцевому м'язі.

Останнім часом нестероїдні протизапальні засоби широко використовуються у різних галузях медицини завдяки своїм анальгезивним, жарознижувальним, протизапальним і антитромботичним властивостям. Однак застосування деяких препаратів цієї групи може призвести до кардіоваскулярних ускладнень. Великий резонанс викликали матеріали досліджень VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research), що свідчать про значну частоту розвитку інфаркту міокарда у пацієнтів із ревматоїдним артритом, які отримували іЦОГ2 рофекоксиб, порівняно з групою пацієнтів, що отримували неселективний іЦОГ напроксен [8]. На підставі аналізу результатів клінічних досліджень рофекоксибу і целекоксибу було висловлене припущення, що кардіоваскулярні ускладнення – „клас-специфічний” побічний ефект іЦОГ2 [14]. Поряд із тим, ряд досліджень свідчить про антиатерогенну дію нестероїдних протизапальних засобів [7, 9] і покращення ендотелійзалежної вазодилатації [10]. У зв'язку з цим актуальним є визначення впливу різних за специфічністю інгібіторів ЦОГ та їх комбінації із кверцетином на активність желатиназ і перебудову ЕЦМ.

У нашому дослідженні було використано селективний іЦОГ1 – кеторолак, неселективний іЦОГ – лорноксикам і селективний іЦОГ2 – целекоксиб.

У ході роботи було з'ясовано, що активність досліджуваних ММП при КП порізному змінюється залежно від типу інгібітора та присутності кверцетину. Так, було встановлено, що кеторолак не впливає на проММП9, але знижує активність зрілої форми, і, навпаки, знижує активність латентної ММП2 та не впливає на зрілу ММП2. Лорноксикам займає проміжне положення. Целекоксиб знижує активність проММП9, нормалізує активність ММП9 та підвищує активність ММП2, тобто виявляє протилежну дію щодо іЦОГ1.

Природний біофлавоноїд кверцетин проявляє мембраностабілізуючу та мембранопротекторну дію, має властивості антиоксиданта, модулятора метаболізму оксиду азоту й синтезу протеаз. Кверцетин у мікромолярній концентрації інгібує циклооксигеназний та ліпоксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти. Таким чином, відбувається зменшення кількості прозапальних медіаторів і в результаті опосередковано знижується секреція желатиназ [13]. За нашими даними, при застосуванні кверцетину у піддослідних щурів із КП характерним є зниження активності желатиназ. Цілком імовірно, пригнічення активності желатиназ пов'язане з прямим інгібуванням дії доксорубіцину кверцетином або з підвищенням фонові активності тканинних інгібіторів ММП.

Слід відзначити, що в усіх випадках при застосуванні іЦОГ та їхньої комбінації з кверцетином відбувається зниження активності ММП9. Враховуючи специфічність дії желатиназ, можна припустити, що довготривала дія означених препаратів може призводити до накопичення колагену в ЕЦМ міокарда з подальшим формуванням фіброзу. Отже, визначення активності желатиназ може бути використано як додатковий маркер фіброзоутворення.

ВИСНОВКИ

1. Кардіопатія у щурів супроводжується значним підвищенням активності желатиназ.
2. Активність ММП9 підвищується, а ММП2 пригнічується при застосуванні інгібіторів ЦОГ1. Інгібітори ЦОГ2 проявляють протилежний ефект.
3. Введення біофлавоноїду кверцетину на фоні інгібіторів ЦОГ підвищує активність ММП2.
4. Стабілізація ММП2 та ММП9 є одним із основних показників регулювання метаболізму міокарда та додатковим критерієм розвитку фіброзу.

-
1. Багрий А.Э., Чумаченко Н.В., Цыба Н.Ю. Оценка плазменных уровней ММП-2 и -9 в прогнозировании ремоделирования левого желудочка у больных с острым инфарктом миокарда с elevацией ST. *Питання експериментальної та клінічної медицини*, 2010; 14(1): 23–26.
 2. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Кетинг Е.В. Антрациклиновая кардиомиопатия. Донецк: ДонГІИИ, 2001. – 236 с.
 3. Калинкина Н.В. Патогенез антрациклиновых повреждений сердца. *Журнал Академії медичних наук України*, 2005; 11(2): 238–250.
 4. Куликов В.Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани. *Медицина и образование в Сибири*, 2009; 4.
 5. Agewall S. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Eur. Heart J*, 2006; 27: 121–122.

6. *Aupperle H., Garbade J., Schubert A.* Effects of autologous stem cells on immunohistochemical patterns and gene expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in doxorubicin cardiomyopathy in a rabbit model. **Vet. Pathol**, 2007; 44: 494–503.
7. *Belton O., Byrne D., Kearney D.* et al. Cyclooxygenase-1 and -2 dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. **Circulation**, 2000; 102: 840–845.
8. *Bombardier C., Lane L., Reicin A.* et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **New Engl. J. Med**, 2000; 343: 1520–1528.
9. *Burleigh M.E., Babaev V.R., Oates J.A.* et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor deficiency mice. **Circulation**, 2002; 105: 1816–1823.
10. *Chenevard R., Hurlimann D., Bechir M.* et al. Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. **Circulation**, 2003; 107: 405–409.
11. *Cipollone F.* COX-2 and Atherosclerosis. **J. of Cardiovascular Pharmacology**, 2006; 47: 826–836.
12. *Dowd N.P., Scully V., Adderley Sh.R., Cunningham A.J.* Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates doxorubicin-mediated cardiac injury *in vivo*. **J. Clin. Invest**, 2001; 108: 585–590.
13. *Lakhanpal P., Kumar Rai D.* Role of quercetin in cardiovascular diseases. **Internet Journal of Medical Update**, 2008; 3(1): 31–49.
14. *Mukherjee D., Nissen S.E., Topol E.J.* Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, 2001; 286: 954–959.
15. *Murphy G., Nagase H.* Progress in matrix metalloproteinase research. **Mol. Aspects Med**, 2010; 29(5): 1–33.
16. *Troeberg L., Nagase H.* Current Protocols in Protein. **Science**, 2003; 21: 15.

CHANGES OF GELATINASES ACTIVITY IN RATS WITH ANTHRACYCLINE CARDIOPATHY AT APPLICATION OF NONSTEROID ANTIINFLAMMATORY DRUGS AND QUERCETIN

**Yu. A. Gordiyenko^{1,2}, Eu. A. Chernov¹, V. I. Mamchur¹,
O. A. Koval¹, V. Yu. Krotova³, A. I. Shevtsova**

¹Dnipropetrovsk State Medical Academy
9, Dzerzhynskiy St., Dnipropetrovsk 49044, Ukraine
e-mail: gordienko.ju@gmail.com

²MI „Urban Multidisciplinary Clinical Hospital № 4”, 31, Blyzhnya St., Dnipropetrovsk 49102, Ukraine

³Urban Clinical Hospital № 16, 19, Geroyiv Stalingrada St., Dnipropetrovsk 49000, Ukraine

The activity of gelatinases A and B in blood plasma of rats with doxorubicin-induced cardiopathy at the application of cyclooxygenases inhibitors – ketorolac, lornoxycam and celecoxib was investigated.

Significant increase of activity of both gelatinases in rats with cardiopathy was identified. Under ketorolac effect gelatinase B activity increases, and gelatinase A is inhibited. The opposite reaction was observed when celecoxib was applied: gelatinase B activity decreases, and gelatinase A increases. Combination of bioflavonoid quercetin and COX inhibitors decreased the activity of both latent forms of gelatinases in blood plasma of rats with cardiopathy. It is concluded that the stabilization of gelatinases activity is an indicator of myocardial metabolism and additional indicator of fibrosis development.

Key words: gelatinases A and B, cardiopathy, COX inhibitors, quercetin.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЖЕЛАТИНАЗ У КРЫС С АНТРАЦИКЛИНОВОЙ КАРДИОПАТИЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ И КВЕРЦЕТИНА

**Ю. А. Гордиенко^{1,2}, Е. А. Чернов¹, В. И. Мамчур¹,
Е. А. Коваль¹, В. Ю. Кротова³, Шевцова¹**

¹Днепропетровская государственная медицинская академия
ул. Дзержинского, 9, Днепропетровск 49044, Украина
e-mail: gordienko.ju@gmail.com

²КУ „Городская многопрофильная больница № 4”
ул. Ближня, 31, Днепропетровск 49102, Украина

³Городская клиническая больница № 16
ул. Героев Сталинграда, 19, Днепропетровск 49000, Украина

В работе проведен анализ активности желатиназ А и В при доксорубицин-индуцированной кардиопатии у крыс при применении ингибиторов циклооксигеназ – кеторолака, лорноксикама и целекоксиба.

Выявлено достоверное повышение активности обеих желатиназ при кардиопатии у крыс. Под влиянием кеторолака активность желатиназы В повышается, а желатиназы А снижается. Противоположная реакция наблюдалась при использовании целекоксиба: активность желатиназы В снижалась, а желатиназы А повышалась. Применение биофлавоноида кверцетина совместно с ингибиторами ЦОГ приводило к снижению активности латентных форм обеих желатиназ. Сделан вывод о том, что стабилизация активности желатиназ является одним из показателей регулирования метаболизма миокарда и дополнительным показателем развития фиброза.

Ключевые слова: желатиназы А и В, кардиопатия, ингибиторы ЦОГ, кверцетин.

Одержано: 08.11.2010