

М.Г. Шурыгин<sup>1,2</sup>, И.А. Шурыгина<sup>1,2</sup>, Н.Н. Дремина<sup>1</sup>, О.В. Кая<sup>1</sup>

## МАТРИКСНАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗА 9 И РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)

<sup>2</sup> ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (Иркутск)

Целью исследования являлось изучение распределения металлопротеаза 9 (ММП9) в тканях при инфаркте миокарда. Исследовали патологоанатомический материал 30 больных, погибших от первичного острого трансмурального инфаркта миокарда. Средний возраст – 63,7 года. Мужчин было 18, женщин – 12. По срокам наступления инфаркта: 16 больных погибли в срок до 3 суток; 14 больных – в сроки от 3 суток до 1 месяца. Образцы перинфарктной зоны фиксировали формалином, проводили иммуногистохимическое окрашивание на ММП9. Использовали кроличьи моноклональные антитела IgG к ММП9 (Epitomics, Clone 1D: EP1254, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P) в рабочем разведении 1 : 100 – 1 : 250. При летальных исходах, развившихся в течение нескольких часов после развития инфаркта, регистрировалось большое количество ММП9 в нейтрофилах в сосудах перинфарктной зоны. В срок от 1 до 2 часов ММП9 выявлялась во внеклеточном матриксе в зоне инфаркта, в срок от 3 до 30 суток ММП9 выявлялась в фиброцитах в зоне кардиосклероза. Таким образом, применение окраски на ММП9 при инфаркте миокарда удобно для определения давности возникновения инфаркта миокарда при патоморфологическом исследовании.

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, металлопротеаза, метод диагностики

## MATRIX METALLOPROTEASE 9 AND REMODELING AFTER MYOCARDIAL INFARCTION

M.G. Shurygin<sup>1,2</sup>, I.A. Shurygina<sup>1,2</sup>, N.N. Dremina<sup>1</sup>, O.V. Kanya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

<sup>2</sup> Irkutsk Scientific Center SB RAS, Irkutsk

The objective of the work was to study the distribution of metalloprotease 9 (MMP9) in tissues after myocardial infarction. We studied anatomopathological material from 30 patients, the primary victims of acute transmural myocardial infarction. Average age – 63,7 years. There were 18 men and 12 women. 16 patients died in the period up to 3 days, 14 patients – in a period from 3 days to 1 month. Samples were fixed in formalin, and immunohistochemical staining for MMP9 was conducted. We used rabbit IgG monoclonal antibody to MMP9 (Epitomics, Clone 1D: EP1254, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P) in the working dilution of 1 : 100 – 1 : 250. At fatal outcomes that happened within a few hours after the onset of a heart attack a large number of MMP9 was detected in neutrophils in the blood vessels at near infarction zone. In the period from 1 to 2 hours MMP9 was detected in the extracellular matrix in the area of infarction. In the period from 3 to 30 days MMP9 was detected only in fibroblasts at forming cardiosclerosis zone. Thus, the use of staining for MMP9 is convenient for determination of the time elapsed after myocardial infarction in post mortem examination.

**Key words:** myocardial infarction, metalloprotease, diagnostic method

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство структурно связанных протеолитических ферментов, которые содержат в активном центре ион  $Zn^{2+}$ . За то, что данные металлопротеиназы способны разрушать различные типы белков внеклеточного матрикса, эти ферменты были названы матриксными [2, 6, 8, 23]. ММП играют важную роль в разных процессах жизнедеятельности: в эмбриональном развитии, ремоделировании тканей, ангиогенезе [4, 14], пролиферации, миграции и дифференциации клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей [16], росте нервной ткани, заживлении ран, в том числе после инфаркта миокарда и инсульта [10, 13, 18]. Наряду с этим они задействованы в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов, таких, как FAS, а также в активации и деактивации цитокинов и хемокинов.

В настоящее время данное семейство насчитывает 30 ММП [5, 18, 21]. По субстратной специфичности и структурной организации в семействе ММП выделяют пять подсемейств, при этом ММП9 относится к семейству желатиназ [3].

Основной биологической функцией ММП является удаление компонентов внеклеточного матрикса. Вместе с тем ферменты регулируют и действие ростовых факторов: сосудистого эндотелиального фактора роста, рецептора фактора роста фибробластов, эпителиального фактора роста и инсулиноподобного фактора роста [20]. А такие ферменты, как ММП-2, -3, -7, -9 способствуют также активации трансформирующего фактора роста  $\beta$ , который является хемоаттрактантом для моноцитов, высвобождая его из матрикса [17].

Известно также, что все ММП обладают субстратной специфичностью: так, желатиназы расщепляют коллаген IV, V типов, а также эластин, фибронектин, ламинин и желатин. ММП при инфаркте миокарда способны активно разрушать компоненты экстрацеллюлярного матрикса и участвовать в нарушении структуры соединительной ткани [7, 15]. ММП9 имеет высокое сродство к денатурированному коллагену, но также способна расщеплять нативный коллаген VI, V и XI типов, эластин, а также IL-8, активирующий пептид со-

единительной ткани III, пластинчатый фактор-4, субстанцию P, амилоидный пептид  $\beta$ . В зависимости от места расщепления этих молекул ММП9 может понижать или повышать их биологическую активность [22].

В последние годы активно изучается система протеолиза при воспалительных процессах различного генеза, сердечно-сосудистых, инфекционных, аутоиммунных, аллергических заболеваниях, а также злокачественной трансформации клеток [9, 12, 17, 19].

Необходимо заметить, что работ, посвященных определению активности ММП в клинической кардиологии, немного, и в основном они представлены экспериментальными исследованиями. Установлено, что активация ММП наступает при изменении соотношения в системе протеазы — антипротеазы. Значительно расширяющиеся исследования ММП при кардиологической патологии демонстрируют значимые эффекты на течение заболеваний различных подсемейств ММП, таких, как стромелизины, колагеназы и желатиназы. Предполагается, что при инфаркте миокарда, сердечной недостаточности, ремоделировании левого желудочка специфическая роль принадлежит активности ММП3 и ММП9. Установлено, что при инфаркте миокарда пиковый уровень ММП9 в сыворотке в большей мере отражает объем сформировавшейся зоны инфарктирования [11].

Достаточно интересным является факт полиморфизма генов ММП3, ММП9, связанных с восприимчивостью к сердечно-сосудистым заболеваниям, атеросклерозу артерий, инфаркту миокарда, аневризме аорты. Вместе с тем активность ММП2 и ММП7, представителей подсемейств желатиназ и неклассифицированных ММП при кардиологической патологии остается противоречивой и до конца не изученной, в клиническом и экспериментальном материале имеются противоречивые данные.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился патологоанатомический материал 30 больных, погибших от острого инфаркта миокарда. Во всех случаях диагностирован первичный острый трансмуральный инфаркт миокарда. Средний возраст — 63,7 года. Мужчин было 18, женщин — 12. По срокам наступления инфаркта больные распределились следующим образом: 16 больных погибли в срок до 3 суток; 14 больных — в сроки от 3 суток до 1 месяца.

Образцы ткани из зоны инфаркта миокарда и пограничной к ней зоне фиксировали 10% раствором нейтрального формалина и заливали в парафиновые блоки по общепринятой методике [1].

Затем готовили срезы толщиной 5 мкм, которые монтировали на стекла, покрытые поли-L-лизинем. Депарафинировали препараты вначале в толуоле в течение 5 минут, а затем последовательно в спиртах 100°, 96°, 90°, 70° и 50° по 1 минуте. После этого препараты выдерживали в дистиллированной воде в течение 10 минут.

Для демаскирования антигенов препараты помещали в цитратный буфер (pH = 6.0) и нагревали в течение 8 минут в микроволновой печи мощностью 800W при 100% мощности, а затем 10 минут при 60% мощности. После этого препараты охлаждали до 25 °C в цитратном буфере (pH = 6.0) и промывали дистиллированной водой 2 раза по 5 минут. Образец ткани обводили гидрофобным карандашом Dako Pen (Dako, Code S2002).

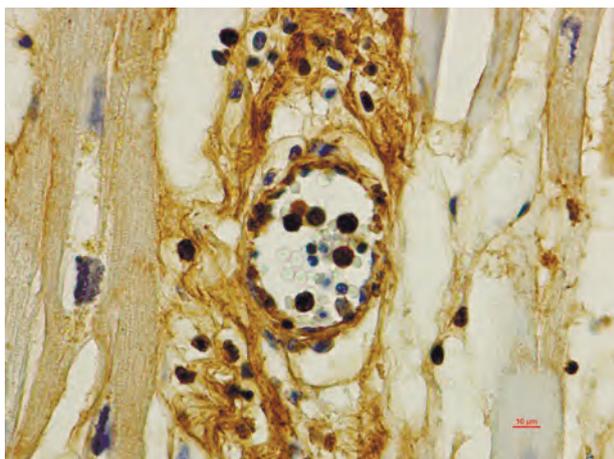
Для инактивации эндогенной пероксидазы на каждый препарат наносили по 50 мкл 3% перекиси водорода и выдерживали в течение 5 минут. После этого отмывали Трис-буфером (pH = 7.6) дважды по 5 минут. Затем наносили 50 мкл 0,4% раствора казеина, инкубировали 5 минут, отмывали Трис-буфером (pH = 7.6) 2 раза по 5 минут.

Далее на каждый препарат наносили первичные антитела — кроличьи моноклональные антитела IgG к ММП9 (Epitomics, Clone 1D: EP1254, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P) в рабочем разведении 1 : 100 — 1 : 250 и инкубировали во влажной камере при температуре 25 °C и 100% влажности в течение 1 часа. Потом отмывали Трис-буфером (pH = 7.6) 2 раза по 5 минут. Затем на препараты наносили по 50 мкл раствора, содержащего 10% сыворотку в Трис-буфере (pH = 7.6), инкубировали во влажной камере при температуре + 25 °C в течение 30 минут. Отмывали Трис-буфером (pH = 7.6) 2 раза по 5 минут. Затем наносили вторичные антитела Novolink Polymer (Novocastra, REF = 7112, Lot 711236), меченные пероксидазой, по 50 мкл, инкубировали во влажной камере при температуре + 25 °C в течение 30 минут. Отмывали Трис-буфером (pH = 7.6) 2 раза по 5 минут. Добавляли по 50 мкл субстратной смеси, содержащей 50 мкл 1,74% 3'3'-диаминобензидина в 1 мл 0,05% перекиси водорода (Novocastra, REF = RE7105, Lot 710550), выдерживали 5 минут. Отмывали водой. Срезы докрашивали 0,02% раствором гематоксилина в течение 30 секунд. Отмывали водой. Дегидратировали последовательно в спиртах 70°, 90°, 96°, 100° по 1 минуте, затем в толуоле — в течение 5 минут. Помещали в заключающую среду Permanent Slide Mounting Medium (Novocastra, REF = 7137, Lot 713708) под покровные стекла. Микроскопическое исследование проводили с использованием светового микроскопа Nikon 80i.

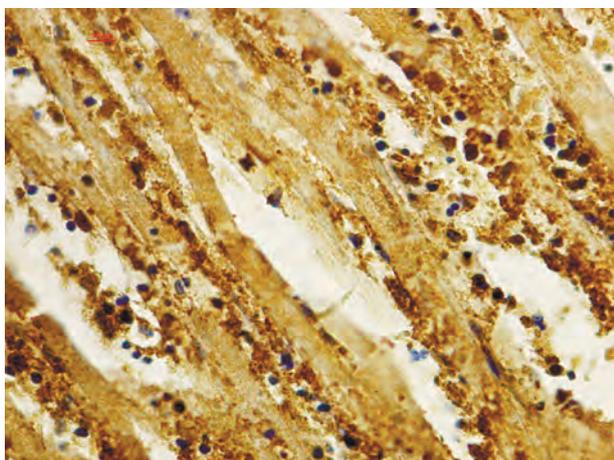
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, ММП9 в высоких концентрациях присутствует в нейтрофилах. В нашем исследовании в ранние сроки (до 3 суток) в зоне ишемического повреждения во всех исследуемых группах регистрировались окрашенные положительно на ММП9 нейтрофилы.

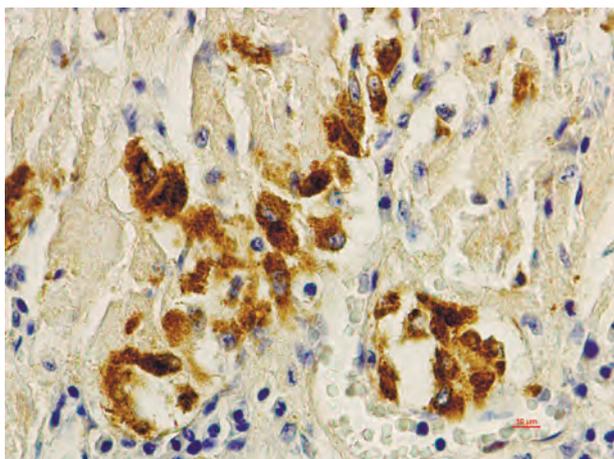
Причем при летальных исходах, развившихся в течение нескольких часов после развития инфаркта, регистрировались ярко окрашенные нейтрофилы в сосудах периинфарктной зоны, а также ярко окрашенные нейтрофилы в зоне инфаркта (рис. 1).



**Рис. 1.** Ярко окрашенные нейтрофилы в сосудах перинфарктной зоны и во внеклеточном матриксе, 9 часов после инфаркта миокарда, иммуногистохимия, первичные антитела к ММП9.



**Рис. 2.** Яркая окраска внеклеточного матрикса, 2 суток после инфаркта миокарда, иммуногистохимия, первичные антитела к ММП9.



**Рис. 3.** Ярко окрашенные фиброкласты в зоне постинфарктного кардиосклероза, 14 суток после инфаркта миокарда, иммуногистохимия, первичные антитела к ММП9.

В срок давности инфаркта от 1 до 2 суток фиксировали дегрануляцию нейтрофилов, потерю окраски цитоплазмы нейтрофилов. Параллельно с этим было зафиксировано появление яркой окраски внеклеточного матрикса в зоне инфаркта,

что отражает диффузию ММП9 из выделенных нейтрофилами гранул в ткани (рис. 2). В случае летальных исходов в более поздние сроки (3–30 суток) появлялась специфическая окраска клеток фибробластического ряда в пограничной зоне. Наличие ММП9 в фибробластах связывают с необходимостью перестройки внеклеточного матрикса при образовании и созревании соединительной ткани. При этом максимальная выраженность окраски отмечена на 7–14-е сутки (рис. 3). После 30 суток специфическая окраска в зоне постинфарктного кардиосклероза не регистрировалась.

Таким образом, окрашивание на ММП9 на гистологических препаратах в разные сроки после развития инфаркта миокарда отражает как динамику цитолитического процесса и выход ММП9 в зону повреждения в ранние сроки патологического процесса, так и функциональную активность ряда клеток по ремоделированию фибриллярных белков в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза в поздние сроки.

При этом в ранние сроки основным источником ММП9 в зоне повреждения являются нейтрофилы, мигрирующие в очаг ишемического повреждения во время нейтрофильной фазы воспаления.

В поздние сроки окраска на ММП9 клеток фибробластического ряда с максимумом окраски на 7–14-е сутки отражает появление в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза клеток с фиброкластической активностью, одной из основных функций которых является перестройка внеклеточного матрикса. Известно, что ремоделирование миокарда, происходящее после эпизода ишемического повреждения, имеет очень важный аспект — перестройку соединительнотканного каркаса. При этом развивается ферментативное расщепление существовавших ранее соединительнотканых волокон (преимущественно коллагена) и синтез нового межклеточного вещества, организуемого согласно новым условиям механических нагрузок органа. Наибольшую роль в этом процессе отводят ферментам группы металлопротеаз.

Интенсивность окраски фиброкластов в зоне формирования постинфарктного кардиосклероза отражает активность перестройки внеклеточного матрикса в сроки 7–14 суток после перенесенного инфаркта миокарда. Снижение активности данного процесса сопровождается снижением интенсивности и последующим исчезновением специфической окраски.

В связи с четко выраженной стадийностью применение окраски на ММП9 при инфаркте миокарда удобно использовать для определения давности возникновения инфаркта миокарда при патоморфологическом исследовании.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Меркулов Г.А Курс патогистологической техники. — Л.: Медицина, 1969. — С. 13–15, 52–59.
2. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Ж. биол. химии. — 1998. — Т. 24. — С. 217–226.

3. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы: регуляция активности и роль в процессе онкогенеза // *Вопр. мед. химии.* – 2000. – № 5. – С. 30–31.
4. Bergers, G., Javaherian K., Lo K.M., Folkman J. et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multi-stage carcinogenesis in mice // *Science.* – 1999. – N 284 (5415). – P. 808–812.
5. Bode W., Fernandez-Catalan C., Tschesche H. et al. Structural properties of matrix metalloproteinases // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol. 55. – P. 639–652.
6. Close D.R. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases // *Ann. Rheum. Dis.* – 2001. – Vol. 60, N 3. – P. 62–67.
7. Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W. Increased expression of matrix metalloproteinase and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques // *J. Clin. Invest.* – 1994. – Vol. 94, N 6. – P. 2493–2503.
8. Hidalgo M., Eckhardt G.S. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy // *J. Nation. Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93, N 3. – P. 178–193.
9. Hoekstra R., Eskens F.A.L.M., Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives // *The Oncologist.* – 2001. – Vol. 6, N 5. – P. 415–427.
10. Jefferis B.J., Whincup P., Welsh P. et al. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 208, N 2. – P. 557–563.
11. Kelly D., Cockerill G., Ng L.L., Thompson M. et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study // *Eur. Heart. J.* – 2007. – Vol. 28. – P. 711–718.
12. Kim H.E., Dalal S.S., Young E. et al. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 106. – P. 857–866.
13. Lehrke M., Greif M., Broedl U.C. et al. MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2009. – Vol. 8. – P. 50–58.
14. Liotta L.A., Steeg P.S. Stetler-Stevenson W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation // *Cell.* – 1991. – Vol. 64, N 2. – P. 327–336.
15. Loftus I.M., Naylor A.R., Goodall S. et al. Increased matrix MMP9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption // *Stroke.* – 2000. – Vol. 31, N 1. – P. 40–47.
16. Matrisian L.M., Cancer biology: extracellular proteinases in malignancy // *Curr. Biol.* – 1999. – Vol. 9, N 20. – P. R776–R778.
17. Mohammed F.F., Smookler D.S. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – Vol. 62, N 2. – P. 1143–1147.
18. Nagase H., Woessner J.F. Matrix Metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 31. – P. 21491–21494.
19. Rudek M.A., Figg W.D., Dyer V. et al. Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19, N 2. – P. 584–592.
20. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior // *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2001. – Vol. 17. – P. 463–516.
21. Troeberg L., Nagase H. Analysis of TIMP expression and activity // *Methods Mol. Med.* – 2007. – Vol. 135. – P. 251–267.
22. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M. et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) // *Critical. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 37, N 6. – P. 375–536.
23. Woessner J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling // *FASEB J.* – 1991. – Vol. 5, N 8. – P. 2145–2154.

#### Сведения об авторах

**Шурыгин Михаил Геннадьевич** – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-69; e-mail: mshurygin@gmail.com)

**Шурыгина Ирина Александровна** – доктор медицинских наук, заместитель директора ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН по научной и инновационной деятельности, главный научный сотрудник отдела медико-биологических исследований и технологий ФГБУН Иркутский научный центр СО РАН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; тел.: 8 (3952) 29-03-38; e-mail: irinashurygin@gmail.com)

**Дремина Наталья Николаевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: drema76@mail.ru)

**Каня Олег Витославович** – аспирант ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1; e-mail: ole1587@gmail.com)