

*Е. Л. Лушникова, Д. Б. Никитюк, М. Г. Клиникова, Е. В. Колдышева, М. М. Мжельская*

## ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 В МИОКАРДЕ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АНТРАЦИКЛИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Лаборатория цитологии и клеточной биологии (зав. — проф. Е. Л. Лушникова), ФГБНУ «Институт молекулярной патологии и патоморфологии», г. Новосибирск

В миокарде крыс-самцов линии Вистар (n=28) с помощью иммуногистохимической реакции исследованы локализация и экспрессия матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2), а также их изменения после введения животным сублетальной дозы (7 мг/кг) доксорубина гидрохлорида. В миокарде контрольных и подопытных животных ММП-2 выявлялась преимущественно в ядрах кардиомиоцитов. По мере развития антрациклиновой кардиомиопатии происходило увеличение индекса ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов в 2,6 раза (к 14-м суткам эксперимента), ММП-2 начинала выявляться также в саркоплазме кардиомиоцитов. Обнаружена положительная корреляционная связь между объемной плотностью кардиомиоцитов с литическими повреждениями саркоплазмы и индексом ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов.

**Ключевые слова:** кардиомиоциты, матриксная металлопротеиназа-2, иммуногистохимия, антрациклиновая кардиомиопатия

Цитотоксические эффекты многих противоопухолевых препаратов представляют не менее серьезную проблему для клинической практики, чем неопластический процесс, поскольку могут вызывать развитие как острых, так и хронических структурно-функциональных нарушений органов и тканей, не поврежденных опухолевым процессом, что в ряде случаев может приводить к развитию кардиомиопатии и летальному исходу, например, при использовании антрациклиновых антибиотиков [2, 17]. Одним из наиболее эффективных препаратов этой группы является доксорубин, который по спектру своего действия на внутриклеточные структуры и макромолекулы кардиомиоцитов относится к плейотропным препаратам [1, 17].

Несмотря на большое количество исследований, касающихся молекулярных механизмов повреждения и гибели кардиомиоцитов при действии антрациклиновых антибиотиков, особенно доксорубина, механизмы протеолиза структурных белков кардиомиоцитов, например, входящих в состав саркомеров, митохондрий или ядерных белков, стали детально проясняться лишь в последнее время. Установлено, в частности, что значительную роль в процессах внутриклеточного протеолиза, ассоциированного с развитием сердечной недостаточности (дисфункции), играют матриксные металлопротеиназы (ММП), в том

числе матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2, желатиназа), которая выявлена не только во внеклеточном матриксе, но и в ядрах и саркоплазме кардиомиоцитов [6, 13]. Экспрессия ММП-2 в кардиомиоцитах обнаружена в саркомерах миофибриллярных пучков не только при развитии патологических процессов (окислительном стрессе), но и в физиологических условиях (например, кардиомиогенезе, пролиферации кардиомиоцитов) [4, 10].

Оценка характера и выраженности экспрессии ММП-2 в кардиомиоцитах при моделировании хронической антрациклиновой кардиомиопатии и сопоставление полученных данных с выраженностью деструктивных процессов и ремоделирования миокарда способствуют разработке критериев повреждения миокарда при патологических состояниях, а также уточнению механизмов ремоделирования кардиомиоцитов и отдельных их компартментов.

Цель данного исследования — изучить характер и распространенность экспрессии ММП-2 в кардиомиоцитах у крыс в динамике развития антрациклиновой кардиомиопатии.

**Материал и методы.** Антрациклиновую кардиомиопатию моделировали у крыс-самцов линии Вистар (n=28), которым однократно внутрибрюшинно вводили доксорубина гидрохлорид (ДОК) (Фармахеми Б.В., Нидерланды) в дозе 7 мг/кг в растворе 0,9% NaCl. Контрольным живот-

### Сведения об авторах:

Лушникова Елена Леонидовна (e-mail: [pathol@inbox.ru](mailto:pathol@inbox.ru)), Никитюк Дмитрий Борисович, Клиникова Марина Геннадьевна, Колдышева Елена Владимировна, Мжельская Марина Маратовна, лаборатория цитологии и клеточной биологии, Институт молекулярной патологии и патоморфологии, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

ным ( $n=5$ ) одновременно с подопытными внутрибрюшинно однократно вводили изотонический раствор хлорида натрия в объеме, соответствующем массе их тела. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария на полноценном рационе, вода *ad libitum*. Эксперименты проведены с соблюдением всех правил и рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

Животных выводили из эксперимента декапитацией в первой половине дня через 3 и 14 сут после введения ДОК. После вскрытия животного и взвешивания сердца образцы миокарда фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином — эозином с постановкой реакции Перлса, по методу ван Гизона с докраской эластических волокон резорцин-фуксином по Вейгерту, ставили ШИК-реакцию.

Экспрессию ММП-2 в миокарде оценивали с помощью метода иммуногистохимии. Использовали первичные поликлональные кроличьи антитела к ММП-2 в разведении 1:100 (E18012, SpringBioscience, США). В качестве хромогена применяли 3,3'-диаминобензидин, срезы докрашивали гематоксилином и исследовали с помощью универсального микроскопа Leica DM 4000B (Leica, Германия). Используя планиметрический подход и компьютерную программу «Leica QWinV3», оценивали объемную плотность кардиомиоцитов с литическими повреждениями (при ув. 400, тестовая площадь была  $61\,171,56\text{ мкм}^2$ ). Проводили измерения площадей сечения кардиомиоцитов и относили к тестовой площади; для каждого животного анализировали не менее 30 неперекрывающихся полей зрения.

С помощью компьютерной программы «Leica QWinV3» проводили подсчет ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов при ув. 1000 (тестовая площадь —  $9395,54\text{ мкм}^2$ ). Для каждого животного подсчет ядер кардиомиоцитов проводили на 20 непересекающихся тестовых площадях. Затем вычисляли индекс ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов. Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали значимыми при  $P<0,05$ . Взаимосвязь разных морфометрических параметров оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона.

**Результаты исследования.** Миокард контрольных животных был представлен в основном плотно расположенными мышечными волокнами, между которыми находились тонкие прослойки соединительной ткани и кровеносные сосуды. В миокарде у контрольных крыс встречались единичные кардиомиоциты с эозинофильной саркоплазмой (контрактурные повреждения преимущественно I и II степени) и кардиомиоциты с разреженной (лизированной) саркоплазмой (объемная плотность таких кардиомиоцитов составляла  $3,5\pm 0,7\%$ ). В миокарде контрольных животных ММП-2 выявлялась преимущественно в ядрах кардиомиоцитов. При этом интенсивность окрашивания была умеренной, индекс ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов составлял  $29\pm 5\%$ .

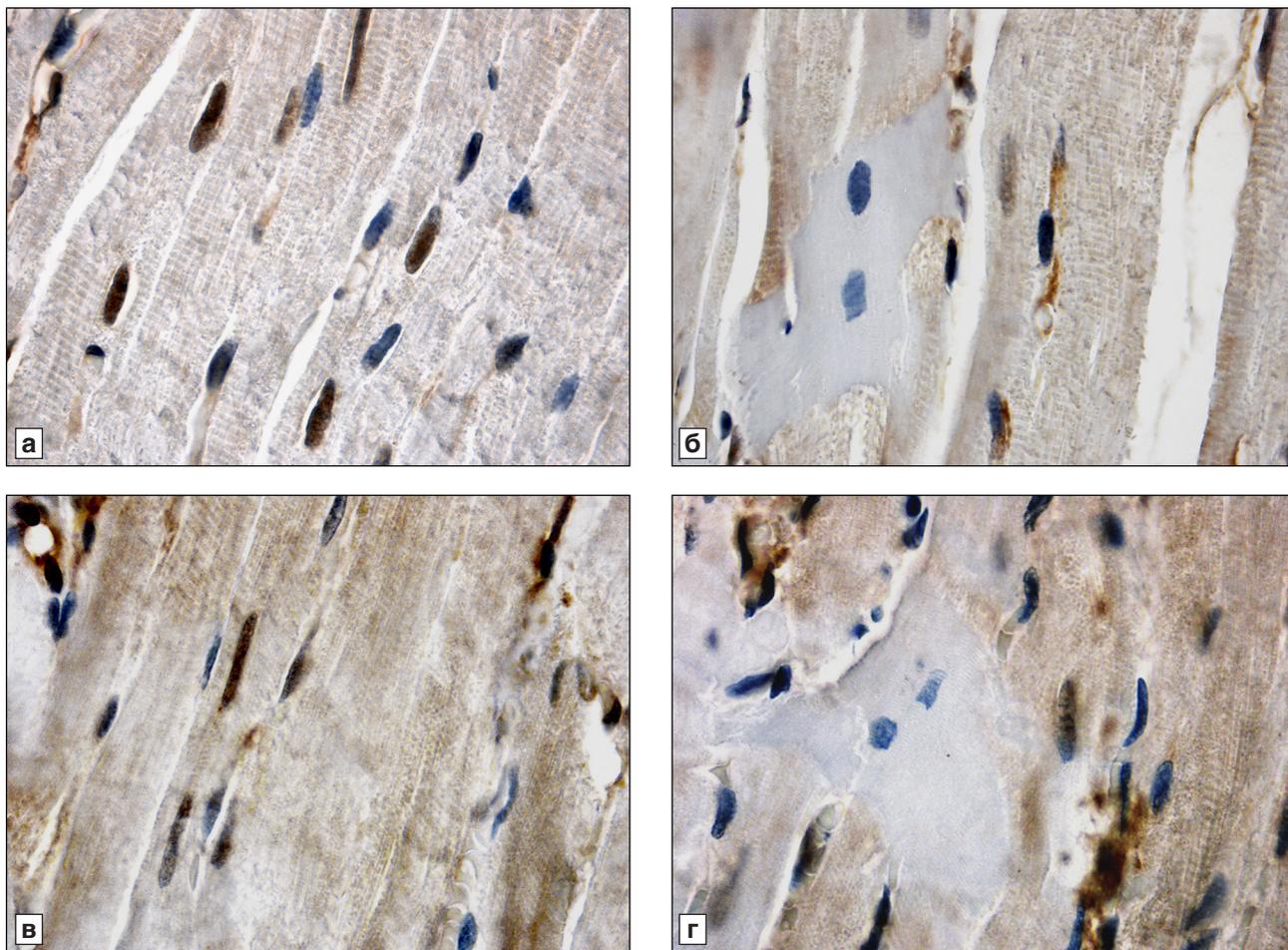
Через 3 сут после введения доксорубицина в миокарде наблюдали кардиомиоциты с различной интенсивностью окрашивания саркоплазмы эози-

ном. Регистрировались отдельные кардиомиоциты или их небольшие группы с контрактурными повреждениями миофибрилл (эозинофильные сегменты), преимущественно II и III степени. В то же время, во всем миокарде присутствовали кардиомиоциты с признаками лизиса саркоплазмы, объемная плотность таких клеток возрастала в 5,4 раза (до  $18,8\pm 2,2\%$ ,  $P<0,001$ ). Кардиомиоциты с контрактурными и литическими изменениями располагались среди клеток с нормальным строением и неизменными тинкториальными свойствами. Следует отметить полиморфизм ядер кардиомиоцитов (увеличение их размеров, изменения формы и тинкториальных характеристик) и частое их смещение в подсарколеммальную зону. Нарушения гемодинамики проявлялись венозным и капиллярным полнокровием, лимфостазом, умеренным отеком.

В этот срок эксперимента в миокарде возрастало количество кардиомиоцитов с ММП-2-позитивными ядрами, усиливалась интенсивность их окрашивания (рисунк, а). Индекс ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов возрастал в 2,1 раза (до  $60,4\pm 1,9\%$ ,  $P<0,001$ ). Одновременно в саркоплазме кардиомиоцитов начинала выявляться ММП-2-позитивная зернистость (см. рисунок, а). При этом следует особо отметить, что в саркоплазме кардиомиоцитов с контрактурными повреждениями миофибрилл ММП-2 не выявлялась ни в ядрах, ни в саркоплазме (см. рисунок, б). В кардиомиоцитах с субсегментарными контрактурами ММП-2 локализовалась в участках саркоплазмы, расположенных между полосами сокращения.

Через 14 сут после однократного введения сублетальной дозы доксорубицина в миокарде усиливались деструктивные изменения, в 6,2 раза возрастала объемная плотность расположения кардиомиоцитов с литическими повреждениями (до  $21,6\pm 1,3\%$ ,  $P<0,001$ ). Повсеместно встречались очаги некробиоза кардиомиоцитов, инфильтрированные мононуклеарными клетками, отмечалось их укрупнение. Сохранялись гемодинамические расстройства, происходило развитие диффузного кардиосклероза.

В этот срок эксперимента локализация ММП-2 в кардиомиоцитах существенно не изменялась, но возрастала интенсивность окрашивания саркоплазмы кардиомиоцитов (см. рисунок, в). В кардиомиоцитах с контрактурными повреждениями ММП-2 не выявлялась (см. рисунок, г). В этот срок эксперимента еще в большей степени (в 2,6 раза по сравнению с контролем) возрастал индекс ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов (до  $74,7\pm 0,4\%$ ,  $P<0,001$ ). Значительное увеличе-



Экспрессия матричной металлопротеиназы-2 (ММП-2) в миокарде крыс через 3 (а, б) и 14 (в, г) сут после введения сублещальной дозы доксорубина.

а — ММП-2-позитивные ядра кардиомиоцитов; б — отсутствие ММП-2 в кардиомиоцитах с контрактурными повреждениями; в — усиленная экспрессия ММП-2 в саркоплазме кардиомиоцитов; г — отсутствие экспрессии ММП-2 в кардиомиоцитах с контрактурами. Иммуногистохимическая реакция. Ув. 1000

ние ММП-2-позитивных ядер коррелировало с возрастанием объемной плотности кардиомиоцитов с литическими повреждениями саркоплазмы ( $r=0,942$ ,  $P<0,05$ ).

**Обсуждение полученных данных.** Активацию ММП традиционно связывают с ремоделированием внеклеточного матрикса в разных органах и тканевых системах в физиологических условиях и при развитии широкого спектра патологических процессов [16]. В отношении миокарда эти процессы наиболее детально изучены при ишемических состояниях (в том числе, инфаркте миокарда), гипертрофии левого желудочка (преимущественно в результате гипертензивных состояний разного генеза), вирусных миокардитах и некоторых видах кардиомиопатий [9, 18]. Ремоделирование внеклеточного матрикса является одной из составляющих ремоделирования миокарда, в который вовлечены также все его клеточные популяции, в наибольшей степе-

ни кардиомиоциты, и сосудистое русло. Важно отметить, что многокомпонентный внеклеточный матрикс имеет структурно-функциональное значение, заключающееся в организации и регуляции жизнедеятельности кардиомиоцитов, процессов их регенерации, гибели и элиминации. Поэтому большое количество исследований посвящено изучению активации и ингибированию ММП во внеклеточном матриксе при очаговых и диффузных патологических процессах с целью поиска молекулярных мишеней и разработки фармакологических подходов для снижения фибропластических процессов и стимуляции пролиферативных реакций кардиомиоцитов.

Обнаружение внутриклеточных локализаций ММП-2 в клетках миокарда, в том числе и в кардиомиоцитах, и ее активация при развитии окислительного стресса в условиях ишемии—реперфузии миокарда и действии провоспалительных цитокинов [8, 11, 14] положили начало новому направлению в изучении физиологической роли

этой протеазы — выяснению протеолитической активности в отношении структурных белков (ядерных и саркоплазматических) кардиомиоцитов как молекулярной основы развития сердечной дисфункции. С помощью различных методических подходов установлено, что ММП-2 локализуется в саркомерах вблизи регуляторного белка тропонина I [4], легкой цепи-1 миозина, белков цитоскелета  $\alpha$ -актина и десмина [19], ядерных белков (ферментов, участвующих в репарации ДНК и др.) [6], в протеолизе которых ММП-2 принимает участие. Осуществляя протеолитическое расщепление ряда саркоплазматических и ядерных белков, ММП-2 играет важную роль в ремоделировании внутриклеточных структур, их деструкции и инициации, таким образом, процессов внутриклеточной регенерации (репарации) или гибели кардиомиоцитов. Ингибирование ММП-2 с помощью доксициклина или о-фенантролина снижает или предотвращает протеолитическое расщепление упомянутых выше белков при окислительном стрессе кардиомиоцитов, вызванном разными причинами [14].

Усиление активности ММП-2 в плазме крови и миокарде после введения мелким грызунам больших доз доксорубина (15–25 мг/кг) было установлено с помощью биохимических методов и зимографии [7, 12]. Усиление активности ММП-2 в этих случаях сопровождалось увеличением активности Akt-киназы, ингибированием супероксиддисмутазы, повышением продукции супероксида и оксида азота. Эти данные указывают на то, что активация ММП-2 в миокарде при антрациклиновых повреждениях обусловлена преимущественно развитием окислительного стресса и снижением антиоксидантной защиты.

В нашем исследовании с помощью иммуногистохимического анализа ММП-2 была выявлена преимущественно в ядрах кардиомиоцитов как у контрольных, так и у подопытных крыс, подвергнутых однократному воздействию сублетальной дозы (7 мг/кг) доксорубина. Развитие антрациклиновой кардиомиопатии, усиление литических повреждений кардиомиоцитов сопровождалось увеличением в 2,6 раза индекса ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов и появлением продуктов иммуногистохимической реакции в их саркоплазме. При этом мы не обнаружили ММП-2-позитивного окрашивания стромы миокарда во все сроки эксперимента. Подобные результаты были получены при моделировании хронической даунорубин- и доксорубин-индуцированной кардиомиопатии у кроликов — иммуногистохимически ММП-2 выявлялась в

кардиомиоцитах и фибробластах, но не во внеклеточном матриксе [3, 5].

Присутствие ММП-2 в ядрах кардиомиоцитов у контрольных животных и увеличение ее экспрессии при действии антрациклиновых антибиотиков, индуцирующих усиленную генерацию активных форм кислорода [17], свидетельствуют о том, что ММП-2 относится к конститутивным формам ядерных белков, экспрессия которых значительно возрастает при цитопатических воздействиях. Возрастание экспрессии ММП-2 безусловно связано с усилением протеолитического расщепления ядерных белков (например, ламина А, поли-АДФ-рибозополимеразы) [6, 15], что можно отнести к механизмам повреждающего действия. В то же время, присутствие ММП-2 в ядрах кардиомиоцитов в норме позволяет сделать вывод, что эта протеиназа играет важную роль в процессах клеточного роста, клеточном цикле, возможно полиплоидизации, при которых ремоделирование нуклеоплазмы имеет большое значение.

Выявление сильной положительной корреляционной связи между объемной плотностью кардиомиоцитов с литическими изменениями саркоплазмы и индексом ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов свидетельствует о важной роли данной металлопротеиназы в доксорубин-индуцированных повреждениях кардиомиоцитов. Поскольку по мере развития антрациклиновой кардиомиопатии происходило не только увеличение индекса ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов, но и усиление интенсивности окрашивания саркоплазмы при постановке иммуногистохимической реакции и нарастание деструктивных процессов в кардиомиоцитах, можно рассматривать индекс ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов в качестве дополнительного критерия выраженности цитотоксического эффекта доксорубина (и подобных ему химических соединений).

Таким образом, ММП-2 в миокарде у контрольных крыс и крыс, подвергнутых воздействию сублетальной дозы доксорубина, экспрессируется преимущественно в ядрах кардиомиоцитов. По мере развития антрациклиновой кардиомиопатии ММП-2 начинает выявляться в саркоплазме кардиомиоцитов. При этом в контрактурно измененных кардиомиоцитах ММП-2 не регистрируется. Выявлена положительная корреляционная связь между объемной плотностью кардиомиоцитов с литическими повреждениями саркоплазмы и индексом ММП-2-позитивных ядер кардиомиоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ММП-2 может вносить вклад в развитие литических изменений кар-

диомиоцитов и обуславливать их последующую деструкцию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Клиникова М.Г., Лушникова Е.Л., Колдышева Е.В. и др. Кардиотоксический и дислипидемический эффекты доxorубина и амида бетулоновой кислоты // Бюл. exper. биол. 2016. Т. 162, № 8. С. 247–252.
2. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: Морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: Изд-во РАМН, 2003.
3. Adamcova M., Potacova A., Popelova O. et al. Cardiac remodeling and MMPs on the model chronic daunorubicin-induced cardiomyopathy in rabbits // *Physiol. Res.* 2010. Vol. 59. P. 831–836.
4. Ali M.A., Fan X., Schulz R. Cardiac sarcomeric proteins: Novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease // *Trends Cardiovasc. Med.* 2011. Vol. 21 (4). P. 112–118.
5. Aupperle H., Garbade J., Schubert A. et al. Effect 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. Vol. 44 (4). P. 494–503.
6. Baghirova S., Hughes B.G., Poirier M. et al. Nuclear matrix metalloproteinase-2 in the cardiomyocyte and the ischemic-reperfused heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016. Vol. 94. P. 153–161.
7. Bai P., Mabley J.G., Liaudet L. et al. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Oncol. Rep.* 2004. Vol. 11, № 2. P. 505–508.
8. Cheung P.-Y., Sawicki G., Wozniak M. et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart // *Circulation.* 2000. Vol. 101, № 15. P. 1833–1839.
9. Chow A.K., Cena J., Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature // *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 152, № 2. P. 189–205.
10. Fan X., Hughes B.G., Ali M.A. et al. Matrix metalloproteinase-2 in oncostatin M-induced sarcomere degeneration in cardiomyocytes // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2016. Vol. 311, № 1. P. H183–189.
11. Gao C.Q., Sawicki G., Suarez-Pinzon W.L. et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction // *Cardiovasc. Res.* 2003. Vol. 57, № 2. P. 426–433.
12. Ivanova M., Dovinova I., Okruhlicova L. et al. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats // *Acta Pharmacol. Sin.* 2012. Vol. 33, № 4. P. 459–469.
13. Jacob-Ferreira A.L., Schulz R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. Vol. 540, № 1–2. P. 82–93.
14. Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A.M., Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix // *Cardiovasc. Res.* 2010. Vol. 85. P. 413–423.
15. Kwan J.A., Schulze C.J., Wang W. et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, № 6. P. 690–692.
16. Malla N., Sjoli S., Winberg J.O. et al. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes // *Connect. Tissue Res.* 2008. Vol. 49. P. 180–184.
17. Mityr M.A., Edwards J.G. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms // *Int. J. Cardiol. Heart Vasc.* 2016. Vol. 10. P. 17–24.
18. Spinale F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87, № 4. P. 1285–1342.
19. Sung M.M., Schulz C.G., Wang W. et al. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein alpha-actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007. Vol. 43, № 4. P. 429–436.

Поступила в редакцию 27.08.2016

### EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 IN THE MYOCARDIUM IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF ANTHRACYCLINE CARDIOMYOPATHY

*Ye. L. Lushnikova, D. B. Nikityuk, M. G. Klinnikova, Ye. V. Koldysheva, M. M. Mzhel'skaya*

The localization and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the myocardium and their changes after administration of a sublethal dose (7 mg/kg) of doxorubicin hydrochloride were studied in male Wistar rats (n=28) with the use of an immunohistochemical analysis. MMP-2 in the myocardium of control and experimental animals was detected primarily in cardiomyocyte nuclei. With the development of anthracycline-induced cardiomyopathy, there was an increase of the index of MMP-2 positive cardiomyocyte nuclei (2.6-fold by the 14<sup>th</sup> day of the experiment), while MMP-2 expression was also detected in the cardiomyocyte sarcoplasm. Positive correlation between the volume density of cardiomyocytes with lytic sarcoplasmic lesions and the index of MMP-2 positive cardiomyocyte nuclei was detected.

**Key words:** *cardiomyocytes, matrix metalloproteinase-2, immunohistochemistry, anthracycline cardiomyopathy*

Laboratory of Cytology and Cell Biology, Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology, Novosibirsk