

УДК 577.152.34:57.084:616.33/.34-018.74-002-02:664.022.32

А.С. Ткаченко, Т.В. Горбач, В.Г. Гопкалов, И.М. Васильева, С.Н. Мартынова

VEGF, MMP-2 И MMP-9 ВОВЛЕЧЕНЫ В РЕГУЛЯЦИЮ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАРРАГИНАН-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

Резюме. Изучено содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в сыворотке крови животных с экспериментальным хроническим гастроэнтероколитом (двух- и четырехнедельное употребление каррагинана). Обнаружено, что развитие заболевания сопровождается увеличением содержания VEGF, что указывает на активацию неоангиогенеза при данной патологии. Изменение уровня, и как следствие активности, MMP-2 и MMP-9 носит однонаправленный характер с изменениями концен-

трации VEGF. Проведенный корреляционный анализ показал наличие положительной корреляционной зависимости между уровнем VEGF и содержанием обоих металлопротеиназ, что указывает на вовлеченность вышеупомянутых ферментов в регуляцию процессов ангиогенеза при каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите.

Ключевые слова: гастроэнтероколит, каррагинан, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2), матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9).

Введение. Известно, что процессы ангиогенеза (образование новых сосудов из уже существующей сосудистой сети) наблюдаются при воспалительных процессах, заживлении ран, а также имеют большое значение в прогрессии и метастазировании опухолей [6]. Активность процессов ангиогенеза зависит от баланса между проангиогенными и антиангиогенными факторами [5]. К проангиогенным факторам, оказывающим максимальное стимулирующее действие на образование новых сосудов в очаге воспаления, относятся фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [5]. Так, VEGF индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток, способствует клеточной миграции и ингибирует апоптоз эндотелиоцитов. Показано, что VEGF играет ключевую роль в инициации и прогрессировании васкулогенеза *in vivo*. Действие VEGF приводит к разрыву адгезионных контактов между эндотелиальными клетками с вовлечением матриксных металлопротеиназ, которые вносят вклад в образование новых сосудов путем деградации межклеточного матрикса вокруг сосудов [5, 7]. Таким образом, матриксные металлопротеиназы принимают активное участие в регуляции процессов васкулогенеза при различных патологических состояниях. В то же время, роль данных ферментов в координировании ангиогенеза при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите (ГЭК) изучена слабо.

Цель работы. Изучение уровня VEGF, содержания матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) в динамике развития хронического гастроэнтероколита, а также роли вышеуказанных протеолитических ферментов в регуляции процессов васкулогенеза.

Материал и методы. При проведении экспериментов использовались тридцать половозрелых крыс линии Вистар. Животные содержались

в стандартных условиях вивария. Согласно условиям исследования, животные были разделены на три равные группы (n=10): 1) ГЭК вызывали ежедневным пероральным введением 1 % раствора каррагинана в питьевой воде в течение 14 дней; 2) ГЭК вызывали ежедневным пероральным введением 1 % раствора каррагинана в питьевой воде в течение 28 дней; 3) контрольная группа состояла из интактных животных, употреблявших питьевую воду без каррагинана. У всех животных первой и второй группы морфологически и биохимически подтверждено наличие ГЭК [2], вызванного пероральным введением каррагинана – пищевой добавки E407, применяющейся при промышленном производстве продуктов питания в качестве загустителя.

Все манипуляции с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и VIII Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Содержание MMP-2 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора реактивов фирмы «Quantikine» (Миннеаполис, США), а уровень и MMP-9 – с помощью набора «eBioScience» (Вена, Австрия). Для определения уровня VEGF в сыворотке крови иммуноферментативным методом использовали набор фирмы «Вектор БЕСТ» (Российская Федерация).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 5. Взаимосвязь между изучаемыми параметрами оценивалась с помощью расчета непараметрического коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате исследования обнаружено достоверное повышение VEGF в 2,3 раза у животных груп-

Таблица

Показатели VEGF, MMP-2 и MMP-9 в сыворотке крови крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом (M±m)

Показатели	Животные контрольной группы	Животные с гастроэнтероколитом, вызванным употреблением каррагинана в течение 14 дней	Животные с гастроэнтероколитом, вызванным употреблением каррагинана в течение 28 дней
	n=10	n=10	n=10
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), мкг/мл	32,89±4,19	48,56±8,484 p>0,05	73,58±3,82 p<0,001
Матриксная металлопротеиназа-2 (MMP-2), нг/мл	7,29±0,21	22,81±1,21 p<0,0001	11,43±0,33 p<0,0001
Матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9), нг/мл	2,22±0,12	3,95±0,09 p<0,0001	8,01±0,15 p<0,0001

пы № 2 по сравнению с контрольной группой (табл.). У животных группы № 1 данный показатель также повышен, однако результат является недостоверным ($p>0,05$). Таким образом, ГЭК, вызванный четырехнедельным приемом каррагинана, сопровождается активацией процессов васкулогенеза.

Изучение уровня, и как следствие активности, матриксных металлопротеиназ продемонстрировало выраженное достоверное повышение содержания как MMP-2 (в 3,1 и 1,6 раз у животных первой и второй групп соответственно), так и MMP-9 (в 1,8 и 3,6 раз). Как видно из экспериментально полученных данных, в динамике развития заболевания активность MMP-9 повышалась, а MMP-2 повышалась на 14-й день и снижалась на 28-ой день (табл.).

Матриксные металлопротеиназы представляют собой семейство ферментов, которые протеолитически расщепляют различные компоненты внеклеточного матрикса [4], в том числе и принимая участие в ремоделировании соединительной ткани при образовании новых сосудов [5, 7].

Для оценки роли MMP-9 и MMP-2 в процессах неангиогенеза при каррагинан-индуцированном ГЭК нами был рассчитан коэффициент корреляции между уровнями металлопротеиназ и концентрацией VEGF у животных группы № 2.

Установлено наличие средней положительной корреляционной связи между уровнями MMP-2 и VEGF ($r=+0,64$) и сильной связи между содержанием MMP-9 и концентрацией VEGF в сыворотке крови животных второй группы ($r=+0,72$), что указывает на вовлеченность данных протеолитических ферментов в процессы неоваскулогенеза при ГЭК, вызванном четырехнедельным употреблением каррагинана.

Известно, что под действием VEGF активируется миграция эндотелиальных клеток, необходимых для образования новых сосудов. Однако на пути активированных эндотелиоцитов стоит барьер в виде базальной мембраны, которая состоит из коллагена IV типа. Данный коллаген служит субстратом как для MMP-2, так и MMP-9 [4]. В наших предыдущих исследованиях показано истончение базальных мембран в тонкой кишке при развитии каррагинан-индуцированного ГЭК [1, 3], которое может быть обусловлено действи-

ем вышеуказанных металлопротеиназ. Помимо этого роль MMP-2 и MMP-9 в образовании новых сосудов при каррагинановом воспалении может заключаться в ремоделировании внеклеточного матрикса для обеспечения мобильности эндотелиальных клеток.

Выводы

1. Хронический каррагинан-индуцированный гастроэнтероколит сопровождается активацией процессов неоваскулогенеза.

2. Наличие положительной корреляционной связи между уровнем VEGF в сыворотке крови и содержанием MMP-2 и MMP-9 позволяет судить о кооперативном взаимодействии вышеуказанных соединений в развитии неангиогенеза при каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите.

Литература

1. Губина-Вакулик Г.А. Морфологическое состояние тонкого кишечника при длительном употреблении пищевой добавки каррагинан / Г.А. Губина-Вакулик, А.С. Ткаченко, М.А. Орлова // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2014. – Т. 3 (109), Вип. 2. – С. 252-256.
2. Пат. 97322 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту / Іваненко Т.О., Коробчанський В.О., Губина-Вакулик Г.І., Горбач Т.В., Колоусова Н.Г.; Заявник Харківський національний медичний університет. – № заяв. а201014510; заявл. 06.12.2010; опубл. 25.01.2012. Бюл. №2.
3. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis / G.I. Gubina-Vakyulyk, T.V. Gorbach, A.S. Tkachenko [et al.] // Comparative Clinical Pathology. – 2015. – Vol. 24, № 6. – P. 1473-1477.
4. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma / H. Zheng, H. Takahashi, Y. Murai [et al.] // Anticancer. Res. – 2006. – Vol. 26, № 5. – P. 3579-3583.
5. Expression of MMP-9 and VEGF in meningiomas and their correlation with peritumoral brain edema / J. Reszec, A. Hermanowicz, R. Rutkowski [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2015. – Vol. 2015, Article ID 646853, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/646853>
6. hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor / N. Liu, D. Ding, W. Hao [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44, № 18. – P. 8693-8703.
7. Role of VEGF and matrix metalloproteinase-9 in peritumoral brain edema associated with supratentorial benign meningiomas / E. Iwado, T. Ichikawa, H. Kosaka [et al.] // Neuropathology – 2012. – Vol. 32, № 6. – P. 638-648.

**VEGF, MMP-2 ТА MMP-9 ЗАЛУЧЕНІ У РЕГУЛЯЦІЮ АНГІОГЕНЕЗУ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КАРАГЕНАН-ІНДУКОВАНОМУ ЗАПАЛЕННІ***А.С. Ткаченко, Т.В. Горбач, В.Г. Гопкалов, І.М. Васильєва, С.М. Мартинова*

Резюме. Вивчено вміст фактора росту ендотелію судин (VEGF), матричної металопротеїнази-2 (MMP-2) та матричної металопротеїнази-9 (MMP-9) у сироватці крові тварин з експериментальним хронічним гастроентероколітом (дво- та чотирихтижневе вживання карагенану). Виявлено, що розвиток захворювання супроводжується збільшенням вмісту VEGF, що вказує на активацію неоангіогенезу за даної патології. Зміни рівня і, як наслідок активності, MMP-2 і MMP-9 носять односпрямований характер зі змінами концентрації VEGF. Проведений кореляційний аналіз показав наявність позитивної кореляційної залежності між рівнем VEGF і вмістом обох металопротеїназ, що вказує на залученість вищезазначених ферментів у регуляцію процесів ангіогенезу при карагенан-індукованому гастроентероколіті.

Ключові слова: гастроентероколіт, карагенан, фактор росту ендотелію судин (VEGF), матрична металопротеїназа-2 (MMP-2), матрична металопротеїназа-9 (MMP-9).

**VEGF, MMP-2, AND MMP-9 ARE INVOLVED IN REGULATION OF ANGIOGENESIS
IN EXPERIMENTAL CARRAGEENAN-INDUCED INFLAMMATION***A.S. Tkachenko, T.V. Gorbach, V.G. Gopkalov, I.M. Vasilyeva, S.N. Martynova*

Abstract. The blood serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were investigated in experimental animals with chronic gastroenterocolitis caused by two- and four-week intake of carrageenan. It was found that the development of the disease was accompanied by elevated VEGF concentrations, indicating activation of neoangiogenesis in this pathology. Changes in the levels, and as a consequence in the activity, of MMP-2 and MMP-9 were unidirectional to VEGF concentration changes. The correlation analysis showed a positive correlation between levels of VEGF and both metalloproteinases, indicating the involvement of the enzymes mentioned above in the regulation of angiogenesis in carrageenan-induced gastroenterocolitis.

Key words: gastroenterocolitis, carrageenan, vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).

Kharkiv National Medical University (Kharkiv)

Рецензент – доц. Н.П. Григор'єва

Buk. Med. Herald. – 2017. – Vol. 21, № 1 (81). – P. 170-172

Надійшла до редакції 03.11.2016 року