

## ЗАВИСИМОСТЬ АКТИВНОСТИ ММП В РАНЕВОМ ЭКССУДАТЕ КРЫС ОТ СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ РАНЫ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

© М. В. Протасов,<sup>1</sup> Л. В. Смагина,<sup>2</sup> О. В. Галибин,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев,<sup>2</sup> И. В. Воронкина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова

и <sup>2</sup> Отдел клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург

В настоящей работе оценивали течение раневого процесса у крыс по изменению активности матриксных металлопротеиназ (ММП) в раневом экссудате. На оригинальной модели изучена корреляция активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата и гистологического строения раны при различном течении раневого процесса. В качестве веществ, изменяющих течение раневого процесса, использованы белковые фракции целомической жидкости регенерирующей морской звезды *Asterias rubens*. На основе данных корреляционного анализа выявлена взаимосвязь течения раневого процесса и активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата.

Ключевые слова: модель раны, ММП-2, ММП-9, раневой экссудат, морская звезда *Asterias rubens*.

Принятые сокращения: ММП — матриксная металлопротеиназа, ПХВ — полихлорвинил.

Одной из проблем в оптимизации лечения ран у человека является необходимость надежного и объективного метода лабораторного мониторинга раневого процесса. Возможным методом может быть оценка активности матриксных металлопротеиназ (ММП) раневого экссудата. ММП — семейство цинкосодержащих эндопептидаз, которые являются основными ферментами, участвующими в раневом процессе.

ММП-9 участвует в процессах воспалительной инфильтрации, продуцируется нейтрофилами и кератиноцитами в процессе их миграции (Delclaux et al., 1996; Woessner, Nagase, 2001). ММП-2 продуцируется клетками соединительной ткани млекопитающих, в основном фибробластами (Wysocki et al., 1993). Показано, что активность ММП-9 наиболее высока в раннем периоде после нанесения раны и снижается со временем, достигая минимальных значений при завершении эпителизации (Agren et al., 1992). Активность ММП-2 нарастает в течение 1—2 сут после повреждения кожи и далее сохраняется на протяжении процессов формирования грануляционной ткани. Активность ММП-9 после нанесения раны резко возрастает за счет ее продукции нейтрофилами и мигрирующими кератиноцитами и снижается по мере реэпителизации. Была показана значительная прогностическая ценность изучения активности ММП-2 и ММП-9 для результатов заживления послеоперационных ран (Tarlton et al., 1997). Однако в литературных источниках не было найдено исследований по сопоставлению активности ММП и состояния раны.

Целью настоящего исследования было изучение взаимосвязи активностей ММП раневого экссудата и данных морфометрии тканей раны на начальных этапах (1—3 сут) раневого процесса у крыс. В качестве биологически

активных веществ, способных изменять течение раневого процесса, мы использовали фракции белков целомической жидкости регенерирующей морской звезды *Asterias rubens* (Воронкина, 2003). Ранее нами было показано, что данные белки способны влиять на процессы миграции и пролиферации соматических клеток млекопитающих в культуре (Воронкина, 2003) и на течение раневого процесса у крыс (Воронкина и др., 2004; Протасов, 2007).

### Материал и методика

Для изучения динамики протеолитической активности раневого экссудата на начальных этапах течения раневого процесса использовали разработанную нами ранее (Галибин и др., 2004) модель раны с имплантацией ПХВ-камеры. Эксперимент выполнен на 60 самцах белых беспородных крыс массой тела 200—250 г, разделенных на 4 группы. В каждой из групп (15 крыс) срок наблюдения составлял 1, 2 и 3 сут (по 5 крыс на каждый срок наблюдения). Контрольной группе в полость раны вводили 0.5 мл 0.9%-ного раствора NaCl. В 1—3-й опытных группах в полость раны вводили белки целомической жидкости I—III групп соответственно (рис. 1).

Моделирование раны с имплантацией ПХВ-камеры. Крысам в асептических условиях под наркозом продольным разрезом длиной 2 см по паравerteбральной линии на уровне костовертебрального угла рассекали ткани до мышц. В дне раны иссекали мышечный лоскут 2.0 × 0.7 × 0.5 см. В рану помещали ПХВ-камеру, представляющую собой фенистрированную трубку длиной 2 см, которую фиксировали к мышцам. Кожу ушивали. В контрольной группе в сформированную по-

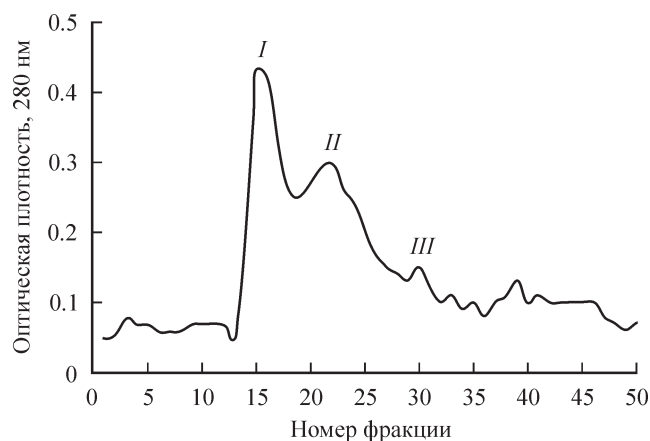


Рис. 1. Разделение целомической жидкости морской звезды способом гель-фильтрации.

I—III — группы белковых фракций.

лость вводили 0,5 мл 0,9%-ного раствора NaCl, в опытных — 0,5 мл раствора фракций целомической жидкости регенерирующей морской звезды в Трис-буфере (pH 7,4). В 1-е, 2-е и на 3-и сут после моделирования раны животных выводили из опыта летальными дозами CO<sub>2</sub>. Материал из дна раны фиксировали в 10%-ном растворе формалина, после чего готовили гистологические препараты с окраской гематоксилином—эозином. Раневой экссудат аспирировали шприцем из полости ПХВ-камеры и центрифугировали для отделения фрагментов тканей, супернатант замораживали и хранили при -70 °C до последующего использования.

Оценка протеолитической активности раневого экссудата крыс. ММП в пробах раневого экссудата обнаруживали с помощью зимографии. Пробы готовили, смешивая образцы с буфером по Лэммли (Laemmli, 1970). Гель для проведения электрофореза (10 % акриламида) полимеризовали вместе с раствором желатина (1 мг/мл). Пробы наносили на гель в количестве, соответствующем 20 мкг белка на дорожку. Гель окрашивали Coomassie Brilliant Blue. Присутствие ММП-2 и ММП-9 определяли по наличию неокрашенных полос на геле (Oliver et al., 1999) (рис. 2). Для проведения количественного анализа содержания ММП-2 и ММП-9 высушенные

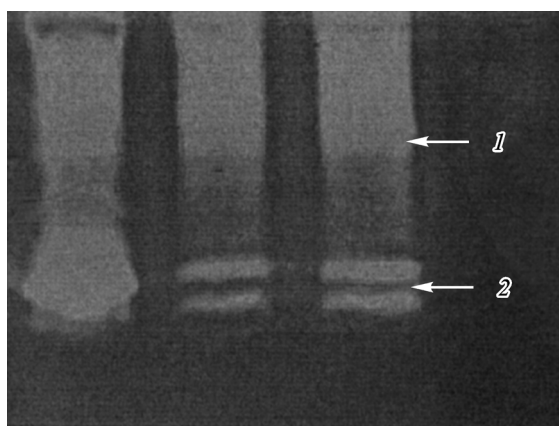


Рис. 2. Зимограмма на желатине образцов раневого экссудата. Стрелками указаны неокрашенные полосы, принадлежащие ММП-9 (1) и ММП-2 (2).

гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программ QuantiScan. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976).

Морфометрия тканей раны. Для морфометрии было выделено несколько параметров: 1) количество нейтрофилов, характеризующее остроту воспалительной реакции; 2) количество фибробластов и фибробластоподобных клеток, отражающее пролиферативную активность; 3) количество капилляров, характеризующее скорость формирования грануляционной ткани. Подсчет производили с помощью светового микроскопа с объективом 40×. Количество клеток и капилляров на каждом микропрепарате определяли в 10 полях зрения, выбранных случайно в пределах 2000 мкм от дна раны, но выше неизменных тканей.

Получение белковых фракций целомической жидкости регенерирующей морской звезды *Asterias rubens*. Работу с морскими звездами проводили на Беломорской биостанции Зоологического института РАН (Кандалакшский залив Белого моря, губа Чупа, мыс Картеш). Для получения целомической жидкости регенерирующей морской звезды надрезали один из лучей скальпелем. Через 6 ч после нанесения раны собирали целомическую жидкость, которую отделяли от цитомитов и концентрировали, а затем проводили гель-фильтрацию (рис. 1). Для уравнивания вводимого количества белка к полученным фракциям добавляли соответствующее количество Трис-буфера (50 мМ Трис-HCl и 0,15 М NaCl, pH 7,4).

Результаты статистически обрабатывали с помощью параметрических методов программ Statistica 6.0 for Windows. Для изучения взаимосвязи данных зимографии и данных морфометрии тканей раны использовали корреляционный анализ (Statistica 6.0 for Windows). Коэффициент корреляции ( $r$ ) рассчитывали между средней активностью ММП-2 или ММП-9 и средними данными морфометрии для каждой группы. Корреляционная связь считалась сильной при  $0,70 \leq r \leq 0,90$  (положительная связь) или  $-0,90 \leq r \leq -0,70$  (отрицательная связь), очень сильной, т. е. близкой к функциональной, при  $r > 0,90$  (положительная связь) или  $r < -0,90$  (отрицательная связь).

## Результаты и обсуждение

Анализ гистологических данных показал, что изменения в тканях раны у животных всех групп в течение первых 2 сут соответствуют фазе воспаления (1-й фазе раневого процесса), о чем свидетельствует преобладание воспалительных изменений, а к 3-м сут начинается переход к фазе регенерации (2-й фазе раневого процесса), что подтверждается формированием к этому сроку элементов грануляционной ткани (Серов, Шехтер, 1981). Ранее нами впервые описано влияние белковых фракций целомической жидкости морской звезды на течение раневого процесса у млекопитающих (Воронкина, 2003, 2004; Протасов, 2007). Показано, что три основные белковые фракции целомической жидкости регенерирующей морской звезды по-разному изменяют течение раневого процесса. На это указывают результаты описательной микроскопии и морфометрии (рис. 3—5).

Динамика активности ММП-2 и ММП-9 в раневом экссудате представлена на рис. 6, 7. Значения коэффициента корреляции данных зимографии и морфометрии представлены в таблице.

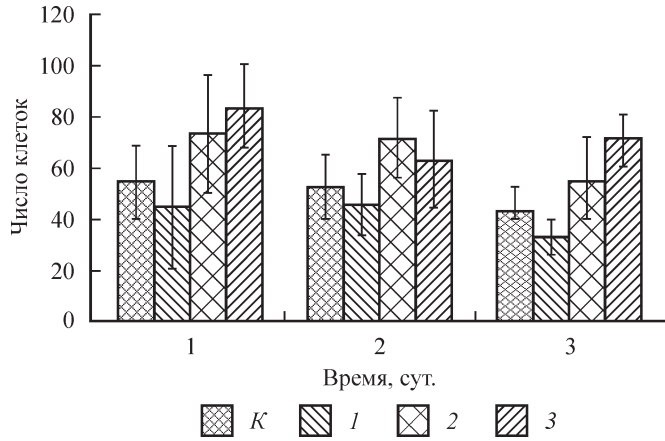


Рис. 3. Изменение числа нейтрофилов в тканях раны крыс в течение 3 сут.  
К — контрольная группа; 1—3 — опытные группы.

Коэффициенты корреляции между данными зимографии и морфометрии тканей раны

Группа	ММП	Значение коэффициента корреляции		
		число нейтрофилов	число фибробластов	число капилляров
Контроль	ММП-2	-0.89	0.10	0.52
	ММП-9	0.80	-0.85	0.54
1-я	ММП-2	0.59	-0.20	-0.86
	ММП-9	0.94	-1.00	-0.73
2-я	ММП-2	0.65	-0.59	-0.88
	ММП-9	0.95	-0.53	-0.84
3-я	ММП-2	0.84	-0.96	-0.99
	ММП-9	0.94	-0.37	-0.72

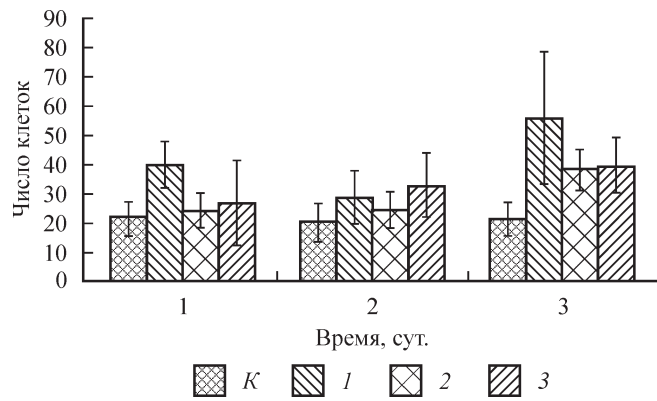


Рис. 4. Изменение числа фибробластов и фибробластоподобных клеток в тканях раны крыс.  
Обозначения те же, что и на рис. 3.

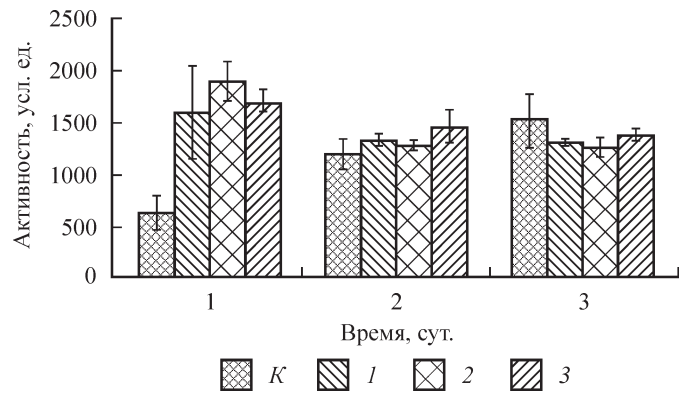


Рис. 6. Изменение активности ММП-2 в раневом экссудате.  
Обозначения те же, что и на рис. 3—5.

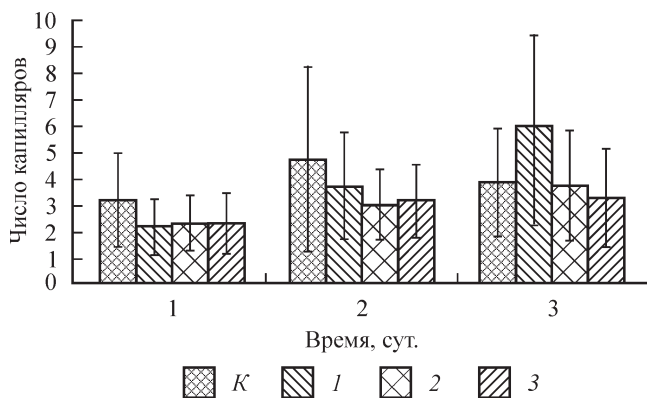


Рис. 5. Изменение числа капилляров в тканях раны крыс.  
Обозначения те же, что и на рис. 3, 4.

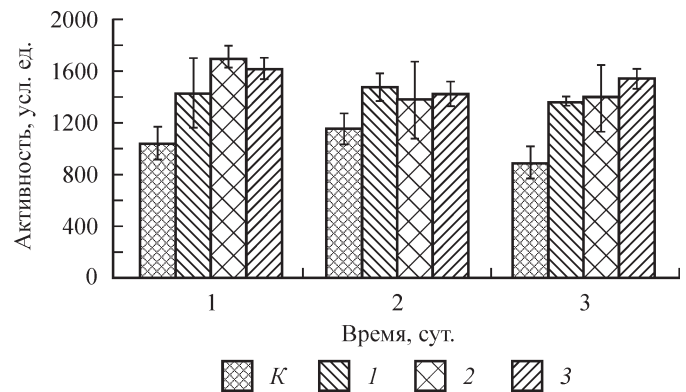


Рис. 7. Изменения активности ММП-9 в раневом экссудате.  
Обозначения те же, что и на рис. 3—6.

Динамика активности ММП-2 в опытных группах значительно отличается от контрольной. В контрольной группе активность ММП-2 последовательно нарастала в течение первых 3 сут. Во всех опытных группах активность ММП-2 была наибольшей в 1-е сут и далее во

2-й и 3-й опытных группах снижалась. При этом в контрольной группе активность ММП-2 была меньше, чем во всех опытных группах на протяжении 1-х и 2-х сут, а к 3-м не отличалась от активности в опытных группах (рис. 6).

Из литературы известно, что основными продуцентами ММП-2 являются клетки мезенхимы в процессе их миграции (Wysocki et al., 1993; Pilcher et al., 1997; Werb, 1997; Agren, 1999; Wiessner, Nagase, 2001).

В эксперименте на животных введение белков целомической жидкости морской звезды изменяло миграционные свойства клеток мезенхимы, чем, вероятно, и обусловлены изменения в динамике активности ММП-2.

В контрольной группе повышение активности ММП-2 соответствует усилению миграции клеток из окружающих тканей к месту повреждения, что подтверждается нарастанием количества фибробластов и фибробластоподобных клеток и положительной корреляционной связью между этими показателями и активностью ММП-2. В то же время в опытных группах выявлены отрицательные корреляционные связи между активностью ММП-2 и количеством капилляров, фибробластов и фибробластоподобных клеток в тканях раны.

Такое несоответствие между результатами в контрольной и опытных группах может быть объяснено следующим образом. В контрольной группе происходят нормальные процессы пролиферации и миграции фибробластов и ангиогенеза, что сопровождается относительно низкой активностью ММП-2. В опытных же группах под действием введенных белков к 1-м сут количество фибробластов и фибробластоподобных клеток достигает большего уровня, чем в контроле, на всех сроках наблюдения. Такое количество фибробластов и фибробластоподобных клеток может быть обусловлено лишь резким усилением процессов миграции в течение 1-х сут. После накопления в тканях раны большого количества клеток мезенхимного ряда миграция их в рану прекращается, однако количество продолжает нарастать за счет пролиферации. Замедление процессов миграции сопровождается снижением активности ММП-2 со 2-х по 3-и сут. В то же время процесс формирования капилляров отстает от активности в контрольной группе вплоть до 3-х сут вследствие повышенной желатиназной активности, которая препятствует формированию структуры ВКМ. Ангиогенезу также препятствует сохраняющаяся избыточная миграционная активность клеток. Таким образом, активность ММП-2 без стимуляции миграции и пролиферации положительно коррелирует с количеством фибробластов и фибробластоподобных клеток и капилляров, в то время как избыточная активность ММП-2 вследствие стимуляции процессов миграции клеток какими-либо факторами имеет отрицательную корреляционную связь с количеством фибробластов и фибробластоподобных клеток и капилляров.

ММП-9 присуща нейтрофилам, которые секретируют ее в процессе деструкции поврежденных тканей (Schaffer, Nanney, 1996). По данным корреляционного анализа, между количеством нейтрофилов в тканях раны и активностью ММП-9 во всех группах и на всех сроках наблюдения имеется сильная или очень сильная (близкая к функциональной) положительная связь (рис. 7; см. таблицу). Наличие же отрицательных корреляционных связей различной выраженности между активностью ММП-9 и количеством капилляров или между активностью ММП-9 и количеством фибробластов и фибробластоподобных клеток, на наш взгляд, обусловлено антагонизмом между процессами острого воспаления и репаративного ангиогенеза (Кузин, Костюченко, 1990). Таким образом, мы полагаем, что уровень активности ММП-9 является значимым маркером выраженности воспалительных явле-

ний на протяжении всей 1-й и в начале 2-й фазы раневого процесса.

Таким образом, оценка активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата на начальных этапах раневого процесса позволяет оценить процессы, происходящие в ране в эксперименте, а в дальнейшем может быть внедрена в клиническую практику как метод лабораторного мониторинга раневого процесса.

#### Список литературы

- Воронкина И. В. 2003. Модуляция функциональной активности клеток и белков внеклеточного матрикса в процессе регенерации тканей под действием матриксных металлопротеиназ: Автореф. канд. дис. СПб. 28 с.
- Воронкина И. В., Кокорин К. В., Чуликов О. В., Парамонов Б. А., Блинова Г. П. 2003. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 раневых и ожоговых экссудатов и их действие на белки внеклеточного матрикса. Цитология. 45 (1): 43—50.
- Воронкина И. В., Сакута Г. А., Шарлаимова Н. А., Блинова Г. П., Пинаев Г. П. 2000. Факторы целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens* и их биологическая активность. Цитология. 43 (4): 330—331.
- Воронкина И. В., Шарлаимова Н. А., Блинова Г. П., Пинаев Г. П. 2003. Изменение пролиферативной и миграционной активности соматических клеток млекопитающих под действием фракций целомической жидкости регенерирующей морской звезды *Asterias rubens* зависит от присутствия матриксных металлопротеиназ. Цитология. 45 (9): 86.
- Галибин О. В., Воронкина И. В., Прокопчук С. Н., Протасов М. В., Соловьева М. А., Пинаев Г. П. 2004. Комплексная оценка течения раневого процесса на модели глубокой раны у крыс с имплантацией полихлорвиниловой камеры. Цитология. 46 (12): 1073—1079.
- Кузин М. И., Костюченко Б. М. (Ред.). 1990. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей. М.: Медицина. 591 с.
- Протасов М. В. 2007. Экспериментальное обоснование применения дермального эквивалента в лечении ран: Автореф. канд. дис. СПб. 20 с.
- Серов В. В., Шехтер А. Б. 1981. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина. 312 с.
- Agren M. S. 1999. MMP are required for re-epithelization of cutaneous wounds. Arch. Derm. Res. 291: 583—590.
- Agren M. S., Talpin C. J., Woessner J. F., jr., Eaglestein W. H., Mertz P. M. 1992. Collagenase in wound healing: effect of wound age and type. J. Invest. Dermatol. 99: 709—714.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248—254.
- Delclaux C., Delacourt C., D'Ortho M. P., Boyer V., Lafuma C., Harf A. 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 14: 288—295.
- Gailit J., Clark R. A. 1994. Wound repair in the context of extracellular matrix. Curr. Opin. Cell Biol. 6: 717—725.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680—683.
- Nagase H., Woessner J. F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 274: 21 491—21 494.
- Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press. 61—76.
- Parks W. C. 1999. Matrix metalloproteinases in repair. Wound Rep. Reg. 7: 423—432.
- Pilcher B. K., Dumin J. A., Sudbeck B. D., Krane S. M., Welgus H. G., Parks W. C. 1991. The activity of collagenase-1 is requi-

red for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J. Cell Biol.* 137 : 1445—1457.

Werb Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 91 : 431—442.

Woessner F. J., Nagase H. 2001. Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York: Oxford Univ. Press. 223 p.

Wolz R. L. 1999. Strategies for inhibiting proteases of unknown mechanism. In: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press. 90—106.

Wysocki A. B., Staiano-Coico L., Grinnell F. 1993. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J. Invest. Dermatol.* 101 : 64—68.

Поступила 7 V 2008

THE DEPENDENCE OF MMP-2 AND MMP-9 ACTIVITY IN WOUND FLUID ON THE WOUND TISSUE STATE AT INITIAL STAGES OF WOUND HEALING PROCESS

M. V. Protasov,<sup>1</sup> L. V. Smagina,<sup>2</sup> O. V. Galibin,<sup>1</sup> G. P. Pinaev,<sup>2</sup> I. V. Voronkina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Research Center, I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University, and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

One of the problems in wound treatment optimization is the necessity of an effective and objective method of laboratory wound process monitoring. In present study the current wound process was estimated by changes in MMP-2 and MMP-9 activities in the wound fluid. An original model was used in this work to study correlation of morphological structure of the wound with the activities of MMP-2 and MMP-9 in wound fluid at various types of wound process. Protein fractions of the coelomic liquid from regenerating sea star *Asterias rubens* were used as the substances changing the wound process. The correlation of wound process with MMP-2 and MMP-9 activities in wound fluid was revealed on the basis of correlation analysis.

Key words: wound model, MMP-2, MMP-9, wound fluid, starfish, *Asterias rubens*.