

Феномен роли коллагена IV типа и матриксной металлопротеиназы 9 типа в ремоделировании миокарда левого желудочка при ишемической болезни сердца

Попов М. А.¹, Шумаков Д. В.¹, Зыбин Д. И.¹, Гуревич Л. Е.¹, Ашевская В. Е.¹, Бабокин В. Е.², Пронина В. П.¹

В настоящее время в большинстве работ, посвященных "ремоделированию" миокарда, проводится анализ выраженности фиброза при перестройке окружающего экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). В то же время практически не изучена роль базальной мембраны кардиомиоцитов в патологии сердца. Базальная мембрана кардиомиоцитов — это высокоорганизованный слой внеклеточного матрикса (ВКМ), расположенный на внешней стороне сарколеммы. Дегградация компонентов ВКМ осуществляется различными типами матриксных металлопротеиназ (ММП), которые обладают протеолитической активностью и активно участвуют в процессах ремоделирования ВКМ, разрушая такие его компоненты, как коллагены, эластин, фибронектин, гликозаминогликаны и другие структурные его компоненты.

Цель. Оценить состояние ВКМ у пациентов с ишемической болезнью сердца и его влияние на ремоделирование миокарда левого желудочка.

Материал и методы. Проведено морфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование биоптатов миокарда левого желудочка у 16 пациентов, подвергшихся операции левожелудочковой реконструкции в сочетании с аортокоронарным шунтированием.

Результаты. При ИГХ исследовании выявлено накопление матриксной металлопротеиназы 9 типа в цитоплазме кардиомиоцитов, которое сочеталось с частичным или полным разрушением базальных мембран (БМ) кардиомиоцитов, образованных коллагеном IV типа.

Заключение. Выявлен феномен разрушения коллагена IV типа базальных мембран кардиомиоцитов миокарда левого желудочка под действием матриксной металлопротеиназы 9 типа, которая накапливается в цитоплазме клеток.

Российский кардиологический журнал. 2019;24(8):83–87

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2019-8-83-87>

Ключевые слова: ремоделирование левого желудочка, сердечная недостаточность, базальная мембрана кардиомиоцитов, матриксная металлопротеиназа 9, коллаген IV типа, внеклеточный матрикс.

Конфликт интересов: не заявлен.

¹ГБУЗ МО Московского областного научно-исследовательского клинического института (МОНКИ) им. М. Ф. Владимирского, Москва; ²ФГБОУ ВО Башкирского государственного медицинского университета (БГМУ) Минздрава России, Уфа, Россия.

Попов М. А.* — н.с. кардиохирургии, ORCID: 0000-0002-0316-8410, Шумаков Д. В. — член-корр. РАН, профессор, рук. отдела хирургии сердца и сосудов, ORCID: 0000-0003-4204-8865, Зыбин Д. И. — к.м.н., зав. отделением кардиохирургии, ORCID: 0000-0001-7087-5441, Гуревич Л. Е. — д.б.н., профессор, г.н.с. патологоанатомического отделения, ORCID: 0000-0002-9731-3649, Ашевская В. Е. — н.с. отделения патологической анатомии, ORCID: 0000-0002-0248-3259, Бабокин В. Е. — д.м.н., доцент кафедры госпитальной хирургии, ORCID: 0000-0002-2788-8762, Пронина В. П. — в.н.с. отделения функциональной диагностики, ORCID: 0000-0002-2348-1500.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
porovcardio88@mail.ru

ВКМ — внеклеточный матрикс, ЭЦМ — экстрацеллюлярный матрикс, ММП — матриксная металлопротеиназа, ИГХ — иммуногистохимическое исследование, БМ — базальная мембрана.

Рукопись получена 04.03.2019

Рецензия получена 28.05.2019

Принята к публикации 08.06.2019



Role of type IV collagen and matrix metalloproteinase-9 in remodeling of the left ventricular in coronary artery disease

Popov M. A.¹, Shumakov D. V.¹, Zybin D. I.¹, Gurevich L. E.¹, Ashevskaya V. E.¹, Babokin V. E.², Pronina V. P.¹

Currently, the analysis of the fibrosis severity during the restructuring of the surrounding extracellular matrix (ECM) is studied in most of the research works devoted to "cardiac remodeling". At the same time, the role of the basal membrane of cardiomyocytes in heart diseases was not studied. The basal membrane of cardiomyocytes is a highly organized layer of the ECM which is located on the outer side of the sarcolemma. Degradation of ECM components is carried out by different types of matrix metalloproteinases (MMP), which have proteolytic activity and are actively involved in the process of ECM remodeling, destroying its components such as collagen, elastin, fibronectin, glycosaminoglycans and other structural components.

Aim. To evaluate the ECM status in patients with coronary artery disease and its effect on left ventricular myocardial remodeling.

Material and methods. Morphological and immunohistochemical (IHC) examination of left ventricular myocardial biopsies was performed in 16 patients undergoing left ventricular reconstruction in combination with coronary artery bypass grafting.

Results. The IHC study revealed the accumulation of matrix metalloproteinase-9 in the cytoplasm of cardiomyocytes. This accumulation was combined with partial or complete destruction of the basal membranes (BM) of cardiomyocytes formed by type IV collagen.

Conclusion. Type IV collagen destruction in basal membranes of left ventricular cardiomyocytes was revealed. It is caused by the action of matrix metalloproteinase-9, which accumulates in the cell cytoplasm.

Russian Journal of Cardiology. 2019;24(8):83–87

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2019-8-83-87>

Key words: left ventricular remodeling, heart failure, basal membrane of cardiomyocytes, matrix metalloproteinase-9, type IV collagen, extracellular matrix.

Conflicts of Interest: nothing to declare.

¹M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow; ²Bashkir State Medical University, Ufa, Russia.

Popov M. A. ORCID: 0000-0002-0316-8410, Shumakov D. V. ORCID: 0000-0003-4204-8865, Zybin D. I. ORCID: 0000-0001-7087-5441, Gurevich L. E. ORCID: 0000-0002-9731-3649, Ashevskaya V. E. ORCID: 0000-0002-0248-3259, Babokin V. E. ORCID: 0000-0002-2788-8762, Pronina V. P. ORCID: 0000-0002-2348-1500.

Received: 04.03.2019 Revision Received: 28.05.2019 Accepted: 08.06.2019

“Ремоделирование левого желудочка (ЛЖ)” подразумевает изменения, которые приводят к перестройке структур, которые обеспечивают его нормальное функционирование. С биологической точки зрения “ремоделирование” обусловлено следующими факторами: 1) общим процессом адаптации, которая позволяет как кардиомиоцитам, так и коллагеновой сети во внеклеточном матриксе (ВКМ) адаптироваться к новым условиям; 2) фиброзом желудочков, т.е. повышенной концентрацией коллагена ВКМ, которая является многофакторным процессом, обусловленным старением, ишемией, гормональным дисбалансом и/или воспалительными процессами; 3) гибелью специализированных клеток, которая наблюдается почти во всех описанных моделях ремоделирования.

С клинической точки зрения, в настоящее время фиброз является основным маркером сердечной недостаточности и решающим фактором, определяющим морфологическую гетерогенность миокарда, увеличение диастолической дисфункции и склонность к повторным аритмиям. Хотя в настоящее время широко используется термин “ремоделирование миокарда”, но первоначально он использовался для описания характерных признаков ремоделирования, которые являются последствием инфаркта миокарда. Значение этого термина впоследствии было расширено, и он стал использоваться для определения целого спектра патологических состояний, включая чисто механическую перегрузку, кардиопатию различного генеза, а также состояния, обусловленные гормональной интоксикацией в клинике или эксперименте. Таким образом, “ремоделирование миокарда” — это обратимый процесс, но при условии, что причина подобной перестройки может быть частично или полностью устранена.

Роль фиброза в изменении состава внеклеточного матрикса

Фиброз связан с повышенным накоплением коллагенов и других компонентов ВКМ [1, 2]. Коллаген I, который является очень жестким белком (предел прочности коллагена составляет 50-100 МПа и приближается к таковому для стали), активно накапливается в зонах фиброза и повышает жесткость миокарда, делает его неоднородным, генерирует аритмии, поскольку создает электрическую неоднородность миокарда и затрудняет систолический выброс. Поэтому фиброз миокарда, вероятно, является одной из основных биологических причин фатальных и необратимых состояний при сердечной недостаточности. Принято выделять два типа фиброза: репаративный и реактивный. Репаративный фиброз возникает как реакция на утрату участка миокарда (вследствие некроза или апоптоза кардиомиоцитов в результате ишемии или старения мио-

карда) и является в основном интерстициальным. Напротив, реактивный фиброз происходит без утраты клеток, как реакция на воспаление, и в первую очередь является периваскулярным фиброзом. Реактивный фиброз далее распространяется на соседнее интерстициальное пространство [3]. Оба вида фиброза, реактивный и репаративный, в процессе ремоделирования миокарда обычно сосуществуют.

Внеклеточный матрикс миокарда

В состав ВКМ входит множество различных белков, включая различные типы коллагенов, фибронектин, протеогликаны, компоненты базальных мембран (ламинин, коллаген типа IV), протеазы (включая коллагеназы) и факторы роста. Важным компонентом ВКМ является коллаген I типа, который также является основным компонентом фиброза; он синтезируется и секретируется в основном фибробластами, а также и клетками гладких мышц с очень низкой скоростью (период полуразрушения составляет ~100 дней) [2, 4, 5].

ВКМ — это фибриллярная сеть, которая охватывает все структурные компоненты сердца, в том числе миофибриллы. Обычно ВКМ подразделяется на три основных компонента: эпимизий, который проходит вдоль эпикарда и эндокарда, перимизий, который группирует миофибриллы в пучки, и эндомизий, который окружает отдельные кардиомиоциты, соединяя их с сетью капилляров. В нормальных условиях ВКМ, особенно, составляющие его коллаген I и коллагеназы, является важным биологическим механическим структурным компонентом сердца. Основные функции ВКМ: 1) поддержание нормальной структуры кардиомиоцитов и сосудов и предотвращение их соскальзывания во время сокращения; 2) активная функциональная роль в качестве преобразователя силы во время систолы, что способствует удлинению кардиомиоцитов; 3) это основной фактор, определяющий диастолическую жесткость миокарда [6].

Базальная мембрана (БМ) кардиомиоцитов — это высокоорганизованный слой внеклеточного матрикса, расположенный на внешней стороне сарколеммы. Она образована преимущественно из ламинина и коллагена IV типа, которые формируют плотную оболочку в виде сети вокруг каждой клетки сердечной мышцы. БМ когда-то считались инертными механическими каркасами, но по современным представлениям ее рассматривают как динамичную систему, которая путем взаимодействия между структурными компонентами, расположенными на ее поверхности, играет ключевую роль в формировании миокарда. Синтез и разрушение коллагена обеспечивается с помощью большого количества факторов регуляции. Среди них ангиотензин 2 и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ являются наиболее мощными активаторами синтеза коллагена

фибробластами. Изменения структуры стенки ЛЖ, объемов и формы (геометрии) камер сердца часто предшествуют клиническому проявлению синдрома сердечной недостаточности, являются предвестниками декомпенсации сердечной деятельности и отрицательно влияют на качество жизни и выживаемость больных [7, 8]. Прогрессирование дисфункции сердца сопровождается изменениями геометрии и архитектуры миокарда, увеличением содержания коллагена и фиброзной ткани во ВКМ, которые могут рассматриваться как “ремоделирование” миокарда [9, 10]. В последние годы данные многих работ демонстрируют, что, кроме обеспечения структурной и механической функции, БМ сами продуцируют факторы роста, которые регулируют функциональный статус клеток. Поэтому различные дефекты БМ ведут к сложным системным нарушениям, затрагивающим интеграцию множества клеточных сигнальных регуляторных каскадов. ВКМ, как составной элемент стромы, выполняет не только функцию опоры для клеток, но и играет динамическую роль в метаболических процессах, влияющих на пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток, а также обладает способностью депонировать и выделять биологические активные факторы роста.

В то время как в большинстве работ, посвященных “ремоделированию” сердца, проводился анализ выраженности фиброза при перестройке окружающего ВКМ, практически не изучена роль в патологии сердца БМ кардиомиоцитов. Поскольку структура волокон сердечной мышцы очень сложна, без использования современных и адекватных поставленной задаче методов исследования взаимосвязи между формированием, составом и патологическими изменениями в БМ кардиомиоцитов и их функциональными свойствами до сих пор остаются неясными. Дегградация компонентов БМ осуществляется различными типами матриксных металлопротеиназ, которые обладают протеолитической активностью. Металлопротеиназы (ММП) входят в большое семейство, в котором в настоящее время уже насчитывается >20 единиц, обычно секретируются клетками в межклеточное пространство. Разные типы ММП активно участвуют в процессах ремоделирования ВКМ и БМ, избирательно разрушая такие его компоненты, как коллагены, в том числе коллаген IV типа, эластин, фибронектин, гликозаминогликаны и другие структурные компоненты матрикса, что позволило считать эти ферменты важными эффекторами ремоделирования [7-8]. Экспрессия ММП регулируется изменениями условий тканевой перестройки и их естественными тканевыми ингибиторами (ТИММП). Клиническое значение секреции в клетках сердечной мышцы и ММП и ТИММП, циркулирующих в кровотоке, у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями изучено недостаточно. Особый

интерес представляет выяснение роли изменений как межклеточной среды в процессах развития и формирования хронической сердечной недостаточности, так и роли БМ самих миокардиоцитов в этих процессах.

Цель настоящего исследования: изучение состояния БМ кардиомиоцитов при нарушении кровообращения, оценка выраженности их структурных изменений.

Материал и методы

В исследование вошли 16 пациентов с осложненной формой ишемической болезни сердца, пролеченных в кардиохирургическом отделении МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского в период с 2016г по 2017г. У всех пациентов в анамнезе был перенесенный острый инфаркт миокарда с формированием хронической аневризмы ЛЖ передне-перегородочно-верхушечной локализации. Исходные данные пациентов представлены в таблице 1. Всем пациентам выполнялось оперативное вмешательство в условиях искусственного кровообращения и фармакоологической кардиopleгии (кустодиол). Реконструкция ЛЖ проводилась по методике, предложенной профессором В. Дором, и дополнялось аортокоронарным шунтированием. Проводилась интраоперационная биопсия миокарда в области аневризмы ЛЖ. Эффективность хирургической коррекции оценивалась по данным эхокардиографии в раннем периоде наблюдения. Контрольные исследования проводились на ультразвуковом приборе ARTIDA (“Тошиба”, Япония) в В- и М-режимах, секторальным датчиком (2,7-3,5 МГц). Конечный систолический (КСО), конечный диастолический (КДО) объемы и фракции выброса (ФВ) ЛЖ рассчитывались по формуле “площадь-длина” в модификации Simpson из апикальной четырехкамерной позиции.

Гистологическое и иммуно-гистохимическое (ИГХ) исследование. Биоптаты маркировались в соответствии с их локализацией в ЛЖ и направлялись на патоморфологическое исследование: ЗС — задняя

Таблица 1
Исходные данные пациентов

Показатель	Значение
Возраст (М±SD), лет	55,4±9,6
Функциональный класс стенокардии, % (n)	II 25% (4) III 56,25% (9) IV 18,75% (3)
Функциональный класс хронической сердечной недостаточности по NYHA, % (n)	I 12,5% (2) II 56,25% (9) III 25% (4) IV 6,25% (1)
Количество пораженных коронарных артерий, % (n)	1 — 50% (8) 2 — 25% (4) 3 — 25% (4)

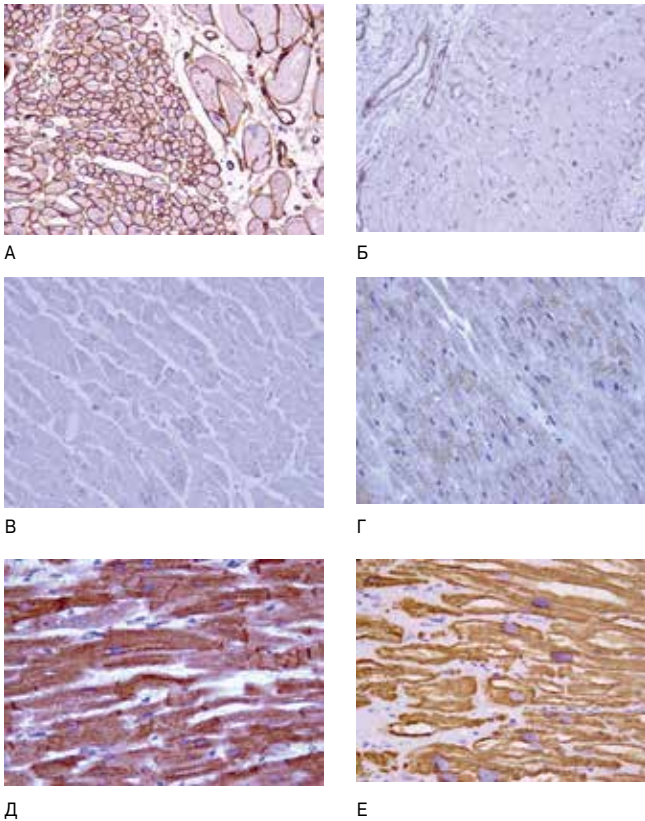


Рис. 1 (А, Б, В, Г, Д, Е). А, В, Д. Контроль. Б, Г, Е. Ткань сердечной мышцы при аневризме ЛЖ.

Примечание: А. экспрессия коллагена IV типа в виде сплошной четко окрашенной "сетки" или "сот" на базальной мембране кардиомиоцитов, а также в стенках сосудов. Б. Экспрессия коллагена IV типа в стенках сосудов; отсутствие сплошной коллагеновой сетки или обрывки коллагена 4 в отдельных участках базальных мембран кардиомиоцитов. В. Отсутствие экспрессии ММП-9 в цитоплазме кардиомиоцитов. Г. Крупногранулярные скопления ММП-9 в цитоплазме кардиомиоцитов. Д. Интенсивная экспрессия десмина, плотность и четкость волокон кардиомиоцитов. Е. Экспрессия десмина: извилистость, прерывистость и рыхлость волокон кардиомиоцитов. А, Б, В, Г. ув. x250; Д, Е. Ув. x400.

стенка, БС — боковая стенка, МЖП — межжелудочковая перегородка, ПС — передняя стенка. Образцы фиксировались в нейтральном формалине (pH-7,0), заливались в парафин и из них готовились парафиновые блоки, затем из которых готовились серийные парафиновые срезы. Часть срезов депарафинировали по стандартному протоколу и окрашивали гематоксилином и эозином для рутинного гистологического исследования. Остальные срезы использовали для дальнейшего ИГХ исследования.

Для ИГХ исследования серийные срезы толщиной 3-5 мкм наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием, реакцию проводили ручным методом. Для ИГХ исследования применяли антитела к десмину (Cell Margue, США, моноклональные мышечные антитела, клон D33), коллагену IV типа (Cell Margue, США, моноклональные мышечные антитела, клон CIV22) и металлопротеиназе 9 типа

(Epitomics, моноклональные кроличьи антитела, клон EP127, США). Восстановление антигенности для десмина, коллагена IV типа проводили по стандартному протоколу в буфере pH 9.0 (Trilogy), а для ММП9 в буфере pH 6.0 (Declere) по 20 мин при 95° С в модуле PT Module (Thermo Scientific, Великобритания). Реакцию оценивали полуколичественным методом (наличие/отсутствие реакции) и интенсивность по выраженности реакции (отсутствие реакции; слабая реакция, где выявлялось небольшое количество мелкогранулярного материала в цитоплазме кардиомиоцитов; интенсивная реакция — скопления крупных гранул в цитоплазме большинства кардиомиоцитов).

Результаты

Все пациенты были оперированы в условиях искусственного кровообращения и фармакоологической кардиopleгии (кустодиол). Среднее время искусственного кровообращения составило 139 ± 41 мин, время пережатия аорты 100 ± 30 мин. Экстубация трахеи у всех пациентов выполнена в первые сутки после операции. Среднее время нахождения в отделении реанимации составило 2 сут. У пациентов, отобранных для оперативного лечения, отмечалось выраженное увеличение КДО и КСО, а также значительное снижение систолической функции, что отражалось в уменьшении ФВ. После операции выявлено статистически значимое уменьшение размеров ЛЖ и улучшение его систолической функции. Средняя ФВ до оперативного вмешательства составила $42,1 \pm 10\%$, после $48,4 \pm 9\%$. Средний КДО до реконструкции ЛЖ составил $154,5 \pm 39$ мл, после $112,9 \pm 20$ мл. Летальных случаев отмечено не было.

Было проведено предварительное (пилотное) ИГХ исследование биоптатов миокарда с антителами к десмину, коллагену IV типа и ММП-9 типа из 4 зон. Контролем послужили 3 контрольных образца (по 4 фрагмента из тех же зон), полученные при аутопсии пациентов среднего возраста, умерших от причин, не связанных с патологией сердца.

Контрольная группа. Экспрессия десмина в клетках кардиомиоцитов контрольной группы позволяла выявить их нормальную структурную организацию с четкими клеточными границами клеток, плотно прилежащих друг к другу, регулярную поперечную исчерченность мышечных волокон (рис. 1Д). При использовании антител к коллагену IV типа мы наблюдали очень четко выраженный непрерывный коллагеновый каркас вокруг кардиомиоцитов в виде сети (рис. 1А). Экспрессия ММП-9 в подавляющем числе кардиомиоцитов не выявлялась (рис. 1В), только в отдельных клетках выявлялись единичные очень мелкие внутриклеточные гранулы этого энзима.

Исследуемая группа. При исследовании биоптатов из зоны аневризмы ЛЖ было выявлено, что

в большинстве участков полностью исчезали каркас из коллагена IV типа, который формирует БМ кардиомиоцитов, а в отдельных участках имелись отдельные небольшие очаги из клеток, в которых БМ были прерывистыми и истонченными, или на них сохранялись только обрывки мембраны (рис. 1Г). Это коррелировало с умеренно выраженной или интенсивной экспрессией ММП-9 типа в цитоплазме кардиомиоцитов, которая имела вид обильных скоплений мелких или крупных гранул (рис. 1Б). Обильные крупногранулярные скопления ММП-9 обычно выявлялись в зонах полного отсутствия каркаса БМ кардиомиоцитов из коллагена IV типа. Экспрессия десмина в мышечных волокнах обычно была неравномерной, иногда хаотичной, прерывистой (рис. 1Е), встречались пестрые участки в виде чередования “белых” участков

с полным отсутствием в них десмина и “темных” участков.

Заключение

Проведенное пилотное исследование показало важную роль ММП-9 в разрушении коллагена IV типа БМ кардиомиоцитов. Значение этого феномена еще только предстоит осмыслить в дальнейших исследованиях, для чего важно также сравнить различные по степени поражения участки сердечной мышцы и показать, существует ли связь между выявленными морфологическими изменениями и тяжестью течения заболевания.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Assayag P, Carré F, Chevalier B, et al. Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype I fibrosis. *Cardiovascular Research*. 1997;4:439-44. doi:10.1016/S0008-6363(97)00073-4.
2. Weber KT. *Wound Healing in Cardiovascular Disease*. Armonk, NY: Futura 1997; 535-95.
3. Silver MA, Christian R, Brilla G, et al. Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovascular Research*. 1990;9:741-7. doi:10.1093/cvr/24.9.741.
4. Farhadian F, Contard F, Sabri A, et al. Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovascular Research*. 1996;32(3):433-42. doi:10.1016/0008-6363(96)00119-8.
5. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, et al. Collagen Network of the Myocardium: Function, Structural Remodeling and Regulatory Mechanisms. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1994;3:279-92. doi:10.1006/jmcc.1994.1036.
6. Lamas GA, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: clinical course and beneficial effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Am Heart J*. 1991;4:1194-202. doi:10.1016/0002-8703(91)90682-8.
7. Sabbah HN, Goldstein S. Ventricular remodelling: consequences and therapy. *Eur Heart J*. 1993;14:24-9. doi:10.1093/eurheartj/14.suppl_C.24.
8. Coux A, Lindsey ML, Villarreal F, et al. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;77:64-72. doi:10.1016/j.jmcc.2014.09.016.
9. Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Journal Annals of Medicine*. 2001;9:33. doi:10.3109/07853890109002108.
10. Lowe JS, Anderson PG. *Human Histology (Fourth Edition), Support Cells and the Extracellular Matrix*. 2015; p. 440. ISBN: 978-0-323-61279-1.