

Б.Г. Безродний, д.м.н., професор, О.М. Петренко, к.м.н., кафедра хірургії № 2 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, А.О. Тихомиров, к.б.н., Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ

Роль матриксних металопротеїназ у фізіологічних процесах загоєння ран

Однією з проблем лікування ран є недостатність вивчення процесів загоєння на молекулярному та клітинному рівнях. Одним з ключових факторів, які не лише впливають на ремоделювання базальних мембран та екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), а й регулюють процеси проліферації та міграції клітин під час загоєння, є металопротеїнази. В огляді узагальнено сучасні дані про молекулярну будову, особливості синтезу та регуляції ензиматичної активності, а також роль металопротеїназ у фізіологічних та патологічних процесах, пов'язаних із процесом загоєння ран. Особливу увагу приділено методам дослідження активності металопротеїназ та перспективам їх упровадження у клінічну діагностику.

Регуляція процесів загоєння ран відбувається через взаємодію медіаторів, які синтезуються клітинами запального інфільтрату (нейтрофілами, моноцитами, лімфоцитами, тромбоцитами), резидентними клітинами (фібробластами, гістіоцитами, епітеліальними клітинами, ендотелієм судин) та компонентами ЕЦМ. Міжклітинна та клітинно-матриксна взаємодія в ділянці рани формують складний каскад процесів, які тісно пов'язані між собою та включають коагуляцію, запальну реакцію, синтез і накопичення компонентів ЕЦМ, неоваскуляризацію, контракцію, ремоделювання ЕЦМ та реепітелізацію [15]. У літературі наявний достатній обсяг інформації, який дозволяє стверджувати, що ключову роль у процесах міграції та проліферації клітин ранової поверхні відіграють ензими суперродини матриксних металопротеїназ (ММП), до якої належать цинк-залежні ендопептидази. Традиційно вважалося, що головною функцією ММП є деградація компонентів ЕЦМ [28]. Новим поштовхом до більш детальних досліджень функцій ММП стали відомості про те, що, крім руйнівної, ММП виконують також регуляторну функцію, здійснюючи процесинг біологічно активних речовин. Наразі відомо, що ММП залучаються та контролюють низку клітинних процесів, а саме проліферацію, адгезію, міграцію, диференціацію та апоптоз [15]. Саме ММП належить провідна роль у забезпеченні реепітелізації в ході загоєння шкірних ран. Проте слід зазначити, що інформація стосовно ролі ММП у процесах загоєння ран є розрізною та не позбавленою певних протиріч. Зокрема, практично не вирішеним є питання щодо ролі ММП у двох основних варіантах патологічного загоєння: рани, загоєння яких супроводжується надмірним накопиченням сполучної тканини і формуванням рубця, та рани, що тривалий час не загоюються. Припускають, що однією з причин, що призводить до надлишкової фіброплазії, є недостатня активність ензиматичних систем, які відповідають за деградацію ЕЦМ, у першу чергу ММП. На противагу цьому аномально висока активність ММП спостерігається у проблемних ранах [8, 26]. Ураховуючи комплексність організації молекулярного і субклітинного ансамблю, за участю компонентів якого здійснюються процеси загоєння ран, надзвичайно складно ідентифікувати причини порушень активності протеїназ, що, у свою чергу, практично унеможливає ефективну корекцію патологічного загоєння. З цього приводу можна окреслити коло питань, висвітлення яких дозволить наблизитися до розуміння значення ММП у репаративних процесах з метою розробки способів регуляції протеолітичних процесів медикаментозними методами: 1) визначення кореляції між активністю різних ММП і станом ранової поверхні на різних етапах загоєння; 2) причини розвитку ензиматичних аномалій під час загоєння; 3) розробка чітких критеріїв оцінки ефективності роботи протеїназ у ранах різного типу (варикозні виразки,

діабетичні рани, пролежні, рани, що тривало не загоюються, тощо); 4) вплив індивідуальних характеристик пацієнтів (вік, наявність супутньої патології, гормональний статус) на стан протеолітичних систем; 5) синергічні зв'язки між функціонуванням ММП та протеїназами інших типів, зокрема ензимів плазміноген-плазмінової системи.

Отже, метою цього огляду є систематизація та аналіз сучасних даних щодо ролі ММП у загоєнні епідермальних ран і значення цих протеїназ у хронічному запальному рановому процесі.

Класифікація та властивості

Усі ММП характеризуються наявністю іонів Zn^{2+} в активному центрі та потребують іонів Ca^{2+} для стабілізації молекули. ММП мають мультидоменну структуру, кожен із доменів відповідає за певну функцію: збереження в латентному стані, секрецію, субстратну специфічність і каталіз. Окрім того, усі ММП характеризуються структурним консерватизмом. Проміж, що містить консервативну

послідовність PRCGXPД, необхідний для збереження ММП у латентній формі. Він відщеплюється лише у процесі активації проферменту. Каталітичний домен включає три консервативні залишки гістидину в комплексі з іонами Zn^{2+} . С-кінцева частина молекули містить гемопексиноподібний домен, який відповідає за субстратну специфічність та взаємодію з рецепторами на поверхні клітин [49]. Доменна структура ММП представлена на рисунку 1.

Усі ММП синтезуються та секретуються у вигляді зимогенів (про-ММП). Активація останніх відбувається за участю низки протеїназ поза клітиною або на її поверхні.

Класифікація ММП є досить складною (табл.). Раніше ММП класифікували на основі субстратної специфічності. Однак зараз відомо, що ММП проявляють перекресну протеолітичну активність щодо багатьох субстратів, тому представлена класифікація є досить умовною [1, 47].

Більш детально розглянемо класи ММП [28].

Таблиця. Види ММП та їх субстратна специфічність

MMP	Альтернативна назва	Субстрат
MMP-1	Колагеназа Колагеназа фібробластів Міжклітинна металопротеїназа	Колагени (I, II, III, VII, VIII, X), желатин, агрекан, протеоглікан, антитрипсин, макроглобулін, IL-1 β , L-селектин, сировотковий амілоїд A, IGF-BP5, IGF-BP3, MMP-2, MMP-9
MMP-2	Желатиназа А Желатинази >92 кДа Нейтрофільна желатиназа Колагеназа типу IV	Колагени (I, IV, V, VII, X, XI, XVI), желатин, еластин, фібронектин, ламінін-1, галектин-3, агрекан, протеоглікан-пов'язаний білок, остеонектин, IGF-BP5, IGF-BP3, FGF-R1, MBP, MMP-1, 9, 13
MMP-3	Стромелізин-1 Транзит	Колагени (III, IV, V, IX), желатин, агрекан, протеоглікан-пов'язаний білок, фібронектин, ламінін, енактин, остеонектин, еластин, антитромбін, плазміноген, фібрин, фібриноген, MMP-1, MMP-2/TIMP-2 комплекс, MMP-7, 8
MMP-7	Матрилізин PUMP	Колагени (V, X), желатин, агрекан, протеоглікан-пов'язаний білок, остеонектин, β_2 -інтегрин, еластин, казеїн, трансфери, MMP-1, 2, 9, MBP
MMP-8	Нейтрофільна колагеназа Колагеназа 1	Колагени (I, II, III, V, VII, VIII, X), желатин, агреман, фібронектин, α -AT, α -антиплазмінін
MMP-9	Желатинази >92 кДа Желатиназа В	Колаген (IV, V, VII, VIII, X), желатин, еластин, галектин-3, фібронектин, остеонектин, плазміноген, GST-TNF/TNF пептид, MBP, IL-1 β
MMP-10	Стромелізин-2	Колагени (III, IV, V), желатин, еластин, казеїн, протеоглікан-пов'язаний білок, MMP-1, MMP-8
MMP-11	Стромелізин-3	Ферменти людини, α -AT, α -AM, казеїн, ламінін, фібронектин, казеїн
MMP-12	Макрофагальна металоептаза	Колаген IV, желатин, еластин, казеїн, К-еластин, фібронектин, вітронектин, ламінін, фібриноген, фібрин, GST-TNF, MBP, плазміноген
MMP-13	Колагеназа-3	Колаген (I, II, III, IV, X, XIV), желатин, інгібітор активатора плазміногену 2, агреман, остеонектин, MMP-9

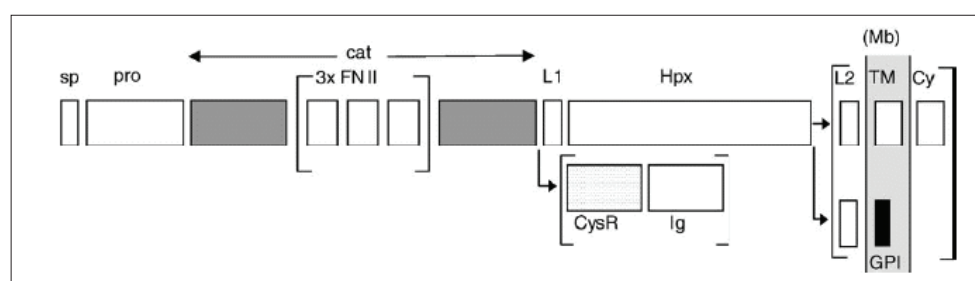


Рис. 1. Доменна структура ММП

FNII – фібронектиновий мотив зв'язування колагену II типу; L1 – лінкер 1, Hrx – гемопексиновий домен, L2 – лінкер 2, Mb – плазматична мембрана, TM – трансмембранний домен, Cy – цитоплазматичний хвіст, CysR – цистеїнбагата ділянка (Zn^{2+} -зв'язувальний домен), Ig – імуноглобуліновий домен, GPI – глікозилфосфатидилінозитоловий якор [Соболева Г.М., 2007].



Б.Г. Безродний



О.М. Петренко

1. Колагенази

До колагеназ належать чотири ММП: інтерстиціальна колагеназа (ММП-1), нейтрофільна колагеназа (ММП-8), колагеназа-3 (ММП-13) та колагеназа-4 (ММП-18). ММП-1 – перший тканинний ензим, який гідролізує спіральну ділянку колагену. ММП-1 синтезується низкою клітин: нормальними і трансформованими фібробластами, хондроцитами, епітеліальними клітинами та макрофагами. ММП-8 була відкрита у нейтрофілах, за що й отримала назву нейтрофільної колагенази. Колагенази каталізують розщеплення колагену I, II та III. Продуктами гідролізу є водорозчинні пептиди, які в подальшому розщеплюються желатиназами та стромелізинами. Окрім того, ці ензими здатні гідролізувати білки ЕЦМ.

2. Желатинази (ММП-2 і 9)

Першим представником цього класу є желатиназа А (ММП-2) – ензим, описаний у 1988 році, другим – желатиназа В (ММП-9), відкрита роком пізніше. Ці протеїнази синтезуються нейтрофілами, макрофагами, фібробластами, лімфоцитами після стимуляції останніх цитокінами. Зазначені ензими в комбінації з колагеназами беруть участь у повному розщепленні внутрішньотканинного колагену. Це єдині ММП, що містять у своєму каталітичному домені три тандемні повтори фібронектинових послідовностей II типу (рис. 2). Желатинази також здатні гідролізувати еластин, фібронектин, колагени IV, V, VII типів. Водночас не виявлено активності щодо колагену I типу та ламініну.

3. Стромелізини

Стромелізини містять групу ензимів: стромелізин-1 (ММП-3), стромелізин-2 (ММП-10), стромелізин-3 (ММП-11) та матрилізин (ММП-7). Стромелізини не розщеплюють колаген I типу, проте проявляють протеолітичну активність щодо казеїну, фібронектину, желатину, еластину й колагену IV типу. Ці форми протеїназ локалізуються на базальній мембрані кровоносних судин. Встановлено, що ММП-7 проявляє високу активність щодо енактину (білок, який є лінкером між базальною мембраною та колагеном і ламініном).

4. Трансмембранні ММП (ММП-14, 15, 16, 17, 21)

Трансмембранні ММП вперше описано в 1994 році. Першого представника було ідентифіковано за здатністю активувати прожелатиназу А. Згодом було встановлено власну протеолітичну активність ММП-14 відносно елементів ЕЦМ: колагену I, II, III типів, фібронектину, ламініну.

Продовження на стор. 12.

Б.Г. Безродний, д.м.н., професор, О.М. Петренко, к.м.н., кафедра хірургії № 2 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, А.О. Тихомиров, к.б.н., Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ

Роль матричних металопротеїназ у фізіологічних процесах загоєння ран

Продовження. Початок на стор. 11.

Регуляція синтезу та каталітичної активності

Усім ММП притаманна наявність на NH_2 -кінці поліпептидного ланцюга пропептидного домену, що складається з близько 80 амінокислотних залишків. ММП синтезуються в неактивній формі (за винятком ММП-11 і ММП-28). Активна ММП відбувається парацелюлярно шляхом відщеплення продомена, дисоціації зв'язку Cys-Zn^{2+} та формування активного центру в каталітичному домені. Активний центр містить іон Zn^{2+} , який з'єднаний координаційними зв'язками з трьома залишками гістидину та залишком глутамінової кислоти. В активації проензимів важлива роль належить плазміну. Показано активацію плазміном проколагенази-1, проколагенази-3, прожелатинази В та простромеліну. Прожелатиназа А активується на поверхні клітини шляхом протеолізу мембраноасоційованою ММП-1. Також ММП-14 активує проколагеназу-3 (ММП-13). Активна мембранна ММП також здійснюється плазміном [6, 9, 26].

Крім того, до активації ММП здатні цитокіни (фактори росту): інтерлейкіни (IL), інтерферони (IF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту кератоцитів (KGF), фактор росту фібробластів (FGF), фактор росту ендотелію клітин (VEGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), фактор росту гепатоцитів (HGF), фактор некрозу пухлин (TNF- α), трансформуючий фактор росту (TGF- β). Також експресія ММП регулюється мітогенактивованою протеїнкіназою (МАРК). Більше того, експресія генів деяких ММП може регулюватися шляхом модифікації хроматину [20, 30].

На посттрансляційному рівні активність ММП регулюється за участю різних інгібіторів. Універсальний інгібітор усіх протеїназ — альфа-2-макрोगлобулін ($\alpha 2\text{M}$), який також здатний блокувати й ММП. Стехіометрично 1 моль $\alpha 2\text{M}$ здатний зв'язувати 2 моль активної протеїнази. Після зв'язування комплекси $\alpha 2\text{M}$ -протеїнази фагоцитуються макрофагами [46].

Тканинні інгібітори ММП (TIMP, або TIMP — Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) — це глікопротеїни з молекулярною масою близько 28 кДа. TIMP-1 зв'язується переважно з колагеназами, але також меншою мірою здатен блокувати й інші ММП. TIMP-2 — специфічний інгібітор колагенази (ММП-1, 8 та 13). Усі TIMP реагують з ММП у стехіометричному відношенні 1:1. TIMP-1 і TIMP-2 також утворюють стабільні комплекси із прожелатиназами А та В. Окрім TIMP-1 і TIMP-2, на сьогодні характеризовано TIMP-3 і TIMP-4 [36, 41].

До групи тканинних інгібіторів належать специфічний інгібітор ММП-2, 9 і 14 RECK (Reversion-including cysteine-rich protein with Kazal motifs). Показано, що RECK асоційований із плазматичною мембраною та здатний утворювати

потрібні комплекси з ММП-14 і желатиназами [30, 34]. Усі TIMP у своїй структурі містять багаті на цистеїн послідовності. Експресія тканинних інгібіторів ММП індукується FGF та факторами транскрипції AP-1 Est-1 [1, 18, 20].

Необхідною умовою нормального перебігу фізіологічних процесів у міжклітинному матриксі є збереження рівноваги між активністю ММП та їх інгібіторами. Порушення цієї рівноваги може змінювати склад матриксу і впливати на функцію клітин, включаючи адгезію, міграцію та диференціацію [12]. На сьогодні в літературі питання регуляції експресії інгібіторів ММП висвітлено недостатньо. Зокрема, практично відсутні дані щодо факторів, які стимулюють та пригнічують продукцію цих регуляторів.

Методи визначення активності матричних металопротеїназ

Методи аналізу різних ММП можна розділити на такі групи:

- методи імунохімічної детекції;
- ензиматичні методи аналізу;
- зимографія.

Слід зауважити, що в наш час не існує ідеального методу визначення вмісту або активності ММП, оскільки високий рівень структурної гомології окремих представників родини ММП, а також перехресна реактивність стосовно низки субстратів зумовлюють певні обмеження щодо використання того чи іншого методу. Так, імунохімічні методи (імуноблот, ELISA) дозволяють отримувати інформацію стосовно кількісного вмісту певної ММП, не оцінюючи при цьому власне активність ензимів. Для визначення активності желатиназ широко застосовують ензиматичний метод, заснований на визначенні кількості продуктів гідролізу 10% желатину при рН 7 (Потеряєва О.Н., 2010). Великої популярності набувають різні модифікації ензиматичних методів, зокрема засновані на використанні флуоресцентного субстрату. Зокрема, активність ММП-2 і 7 визначають за допомогою синтетичного субстрату, що містить флуорофор: MCA-Pro-Ley-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂. Однак дослідження Nagase і співавт. [31] демонструють, що цей субстрат розщеплюється практично всіма відомими ММП. Більше того, при застосуванні хромофорних синтетичних субстратів практично неможливо відрізнити специфічну протеїназну активність від активності серинових та інших протеїназ. У такому випадку використовують або специфічні інгібітори ММП (BB94), або хелатуючі агенти з підвищеною чутливістю до іонів Zn^{2+} (1,10-фенантролін).

Визначення колагеназної активності проводять за допомогою фібрилярного колагену I типу та із застосуванням субстратоподібних лінійних пептидних субстратів [12].

На сьогодні найбільш оптимальним методом визначення активності ММП

вважається так звана желатинова зимографія. Цей метод широко використовують у сучасній науково-дослідній роботі [10]. Суть методу полягає в тому, що зразки біологічного матеріалу, які містять ММП, вносять до поліакриламідного гелю, до складу якого входить желатин, і розділяють електрофоретично. Після проведення електрофорезу гелю інкубують, при цьому желатинази, що знаходяться в ньому, деградує субстрат. У місці, де субстрат був розщеплений енізимом (у зоні, що відповідає його молекулярній масі), проявляються ділянки розщеплення у вигляді чітких світлих смуг на темнозбарвленому тлі (рис. 3). Інтенсивність забарвлення смуг пропорційна активності цих протеїназ. Результати аналізу інтерпретують напівкількісно (наприклад, у відносних одиницях порівняно з контрольним зразком) або кількісно за наявності очищеного ензиму-стандарту. Чутливість методу коливається від 80 до 95%, специфічність — від 52 до 75%. Метод желатинової зимографії характеризується відносною простотою виконання, високою відтворюваністю, ілюстративністю та економічністю.

Роль матричних металопротеїназ у фізіологічних процесах

Базальні мембрани, які відділяють епітелій від тканин, разом зі стромальними елементами є основною мішенню тканинної реконструкції. Структурні білки базальної мембрани та строми включають фібрилярні білки (колагени й еластин), протеоглікани та мультидоменні глікопротеїни (фібронектин та ламінін). ЕЦМ як основна складова частина строми не тільки виконує функцію опори для клітин, а й відіграє регуляторну роль у метаболічних процесах, впливаючи на клітинну проліферацію, диференціацію, міграцію, апоптоз та ангіогенез, а також депонує біологічно активні фактори росту. ЕЦМ являє собою структуру, у якій процеси деградації та синтезу компонентів перебувають у динамічній рівновазі [42]. Активність ММП відіграє вагомий роль у репарації пошкоджень епітелію та процесах ангіогенезу. ММП сприяють міграції кератиноцитів до місця ушкодження для подальшого розвитку грануляційної тканини [35, 39].

Як відомо, важливим етапом у загоєнні ран є ангіогенез — процес формування нової капілярної сітки, що включає стадії руйнування базальної мембрани, міграцію ендотеліоцитів до периваскулярного матриксу, їх проліферацію та формування нових капілярів. Істотна роль у процесі ангіогенезу належить протеолізу [4]. Міграції ендотеліальних клітин передують їх проліферація та протеоліз білків ЕЦМ. Мігруючі ендотеліальні клітини формують «бруньку» (capillary bud) вторинного кровоносного капіляра, який поступово збільшується з утворенням нового капіляра [16]. Як і ММП-2, ММП-9 відіграє важливу роль у підтримці ангіогенного балансу, регуляція якого реалізується шляхом активації ангіогенних цитокінів (TNF- α та VEGF) або генерації антиангіогенних пептидів через обмежений протеоліз інших білків. Так, унаслідок розщеплення колагену XVIII типу утворюються ендостатини, продуктом протеолізу білка фібринолітичної системи плазміногену є ангіостатини [31].

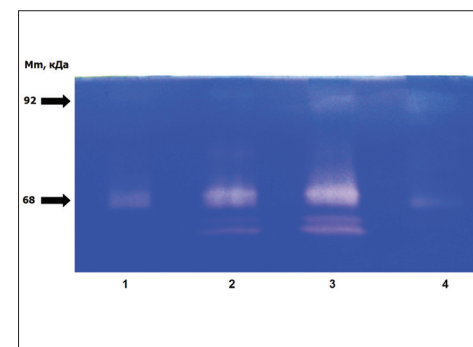


Рис. 3. Приклад желатинової зимографії білкових екстрактів тканинного матеріалу, взятого з рани ступні пацієнта з цукровим діабетом 2 типу на різних етапах загоєння, яку проведено в сополімері поліакриламідного гелю (8%) з желатином (5 мг/мл)

1 — перша доба, 2 — друга доба, третя-четверта доба, четверта-шоста доба (власні дослідження, не опубліковано). Спостерігається відносно низька активність ММП-9 (92 кДа) та висока активність ізоформ ММП-2 (68 кДа), максимум активності обох желатиназ припадає на четверту добу загоєння.

Матричні металопротеїнази та деградація екстрацелюлярного матриксу

У процесах деградації матриксу бере участь значна кількість ММП. Так, ММП-3, ММП-7 і ММП-10 руйнують протеоглікани, фібронектин, колагени та желатин. ММП-11 активно взаємодіє з ламініном і фібронектином. Колагенази ММП-1, ММП-8 та ММП-13 гідролізують як фібрилярні, так і нефібрилярні колагени. Желатинази (ММП-2 та ММП-9) активно руйнують денатуровані колагени. Окрім того, ММП-9 специфічно взаємодіє з компонентами базальної мембрани — колагеном IV й еластином. Мішенню металоеластази (ММП-12) є еластин та фібронектин [11, 12, 30].

Регуляція міграції клітин

ЕЦМ є своєрідним бар'єром для міграції клітин. Перехід від адгезивного до міграційного фенотипу супроводжується активацією моторної функції цитоскелета, модуляцією сайтів адгезії на поверхні клітинних мембран, модифікацією бар'єрних властивостей ЕЦМ. Крім того, значну роль у міграції клітин відіграють хемоаттрактанти, які задають напрямки руху [19]. ММП беруть участь у регуляції більшості з перелічених процесів. Зокрема, деградація компонентів ЕЦМ під дією ММП усуває фізичні перешкоди на шляху міграції клітин, ММП-опосередкований процесинг цитокінів і факторів росту необхідний для модифікації цитоскелета й регуляції напрямку локомоції клітин [21].

Численні дослідження підтвердили участь ММП у міграції як епітеліальних і мезенхімальних, так і нервових клітин in vitro [17, 23]. Для успішної імплантації клітини трофобласта важливою умовою є підсилення експресії ММП-9, що сприяє проникненню в децидуальну оболонку для руйнування ЕЦМ та забезпечення міграції клітин. При ангіогенезі ендотеліальні клітини концентруються в навколишньому міжклітинному середовищі. Міграція ендотеліальних клітин крізь колагенові та фібринові гелі пригнічується інгібіторами ММП.

Проліферація клітин та апоптоз

Взаємодія між компонентами ЕЦМ та молекулами плазматичної мембрани регулює поведінку клітин. При зміні умов відбувається модифікація здатності клітин до проліферації, виживання та диференціації. ММП в якості зовнішніх ефекторів впливають на клітину за рахунок властивості змінювати склад міжклітинного простору [30]. Експериментальне визначення ролі ММП у клітинних культурах підтвердило їх участь у процесах проліферації, апоптозу та диференціації. Наприклад, дермальні мікросудинні ендотеліальні клітини людини активно синтезують компоненти ЕЦМ та припиняють проліферувати у разі зниження активності ММП. Очевидно, активні ММП необхідні для формування проліферативного сигналу [25].

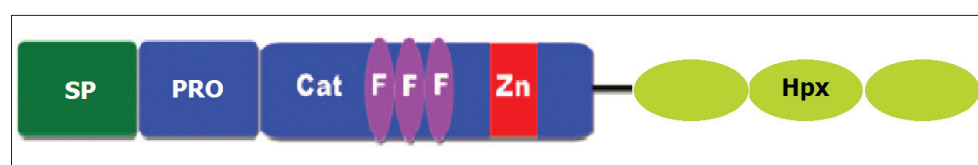


Рис. 2. Схема будови желатиназ (ММП-2 та ММП-9)

sp — NH_2 -кінцева сигнальна послідовність, pro — продомен, cat — каталітичний домен, F — три повтори фібронектинового мотиву; Zn — Zn^{2+} -зв'язувальний домен, Hrx — гемопексинний домен (Martins V.L., 2013).

Роль матричних металопротеїназ у загоєнні ран

Процес загоєння ран включає такі етапи, як міграція клітин, деградація ЕЦМ та реорганізація тканин. При реепітелізації ранової поверхні спостерігається міграція кератиноцитів, видалення фібринового згустка, який закриває просвіт рани. Здатність епідермісу до скорочення сприяє затягуванню рани [27]. Досліди на тваринах і з використанням клітинних культур показали, що ціла низка MMP бере участь у регуляції міграції кератиноцитів та скороченні епідермісу [39]. Цілком очікуваними виявилися дані про те, що інгібітори MMP гальмують процеси міграції кератиноцитів та затримують загоєння ран у мишей [34]. У процесі загоєння MMP функціонують синергічно з компонентами плазмінно-гену/плазмінової системи. Цей факт підтверджується в експериментах на трансгенних мишах, нокаутуваних за геном плазмінно-гену. Відсутність активної протеїнази (плазміну) також негативно впливає на процеси клітинної міграції [47].

Функціонування MMP при нормальному загоєнні ран активно вивчається. У динаміці загоєння секретуються, активуються та функціонують різні види MMP. Ці ензими локалізуються в певних зонах ран, а їх активація припадає на різні періоди процесу загоєння [42]. Предметом досліджень найчастіше стають рани після опіків, післяопераційні рани та рановий ексудат (переважно після мастектомії). Нещодавно проведено дослідження витяжок з пошкоджених тканин, узятих перед накладанням пов'язок [45, 48]. Результати дослідження дозволили встановити, що пік активності MMP-8 припадає на четверту добу захворювання та залишається сталим упродовж тижня. Активність MMP-1 не зафіксовано протягом кількох днів з моменту поранення. Рівень MMP-1 починає зростати приблизно через тиждень після активації MMP-8. Встановлено, що активність MMP-8 перевершує цей показник для MMP-1. Це пов'язано з особливостями профілю синтезу зазначених протеїназ. У перші години після пошкодження нейтрофіли починають інфільтрувати до рани, що триває впродовж усієї стадії запалення. Як відомо, ці клітини продукують численні цитокіни та білкові фактори, у тому числі й деякі протеїнази, зокрема MMP-8 [32]. Ця обставина може слугувати поясненням більш значної кількості MMP-8 у рані порівняно з кількістю MMP-1. У подальшому, на стадії проліферації, починає стрімко зростати рівень колагену III типу [16], необхідного для процесів ремоделювання. Цей факт може пояснити відносно низьку концентрацію MMP-1 у першу добу. MMP-1 продукується фібробластами й ендотеліальними клітинами та широко представлена в підгострій стадії загоєння рани [30]. Рівень колагеназної активності досить стійкий, зростає матриксу сприяє міграції кератиноцитів для загоєння рани шляхом епітелізації.

Високі концентрації MMP-2 та MMP-9 порівняно із плазмозою крові визнаються в рідинах після мастектомії та міопластичних операцій. Частіше рівень MMP-9 перевищує такий для MMP-2. Однак різниця в активності двох желатиназ залежить від наповнення рани клітинами запалення [8, 15]. Як було зазначено раніше, MMP-9 секретується нейтрофілами, тоді як MMP-2 є продуктом синтезу фібробластів.

Arumugam S. і співавт. показали, що активність MMP-2 і MMP-9 зберігається на досить високому рівні навіть після закриття рани, що свідчить про важливу роль желатинази, яку вони виконують у процесі ремоделювання матриксу та, можливо, рубця. В експериментах, присвячених дослідженню динаміки активності MMP у ранах слизової оболонки ротової порожнини, було продемонстровано, що цей показник для MMP-2 залишався сталим протягом усього періоду загоєння, тоді

як пік активності MMP-9 припадав на другу-четверту добу. Це спостереження дає підстави припустити, що MMP-9 не лише первинно секретується під час розвитку запалення, а й може відігравати певну роль на більш пізніх етапах загоєння і синтезуватися кератиноцитами. Важливо зазначити, що MMP-9 бере участь у таких ключових процесах при загоєнні, як відокремлення кератиноцитів від базальної мембрани та ремоделювання ЕЦМ, що сприяє більш ефективній міграції клітин [29, 35]. На противагу цьому результату, отримані *in vitro* на культурі клітин ранової поверхні, вказують на те, що кератиноцити здатні до росту та міграції навіть за умов інгібування MMP-9. Проте істотне зниження швидкості росту культури кератиноцитів спостерігалось при інгібуванні MMP-2 [16, 41, 43]. На основі отриманих, до певної міри суперечливих, даних можна зробити висновок про важливу роль MMP-2 у забезпеченні вивільнення та міграції кератиноцитів через ЕЦМ. Можливо, неузгодження результатів щодо поведінки клітин пов'язано з відмінностями процесів, які відбуваються в рані під час загоєння та за умов культивування тих самих клітин *in vitro*.

Отже, процеси, що відбуваються в рані за участю різних MMP, потребують більш детальних досліджень. Крім того, необхідно зазначити, що матеріалом в описаних дослідженнях були рідини, взяті з ран (ексудат, трансудат, промивні води під час перев'язок). Однак власне рановий субстрат не підлягав дослідженню на жодному з етапів загоєння.

Матричні металопротеїнази при хронічних ранах

Хронічні рани характеризуються високою колагеназною активністю [2, 3, 7, 11, 33] і мають певні відмінності за цим показником порівняно з гострими ранами. Аналіз колагеназної активності при загоєнні хронічних ран показав, що MMP-8 з'являється у значних кількостях. Хронічні виразки містять велику кількість як MMP-1, так і MMP-8. Також у ранах, які тривало не загоюються, виявлено низьку активність TIMP-1 порівняно з нормальними ранами. Рівень MMP-1 і MMP-8 широко варіює у хронічних ранах, причому MMP-8 як домінуюча колагеназа завжди наявна в цих типах ран [25]. У дослідженнях [28] було встановлено, що у процесі загоєння неускладнених епідермальних ран колагенази були присутні в неактивних формах. Водночас протеїназам у ранах, що не загоюються протягом тривалого часу, був притаманний високий рівень активності. Однак нечисленні дослідження хронічних виразок нижніх кінцівок, які загоюються й погано загоюються, не зафіксували статистично достовірної різниці між активністю MMP [29]. Підсумовуючи результати наведених досліджень, можна вивести постулат, що MMP-8 нейтрофільного походження наявна в нормальних ранах як ключова колагеназа, натомість підвищення рівня та гіперактивність цієї колагенази може бути однією з ланок патогенезу хронічних виразок. Також слід урахувати, що колагенолітична активність у хронічних виразках може бути зумовлена низьким рівнем продукції інгібіторів, зокрема, TIMP-1 [49].

Під час дослідження зразків тканин, узятих у хворих із діабетичними виразками, венозними виразками нижніх кінцівок, шкіри хворих на діабет і шкіри здорових людей встановлено активацію експресії MMP-2 та MMP-8 в усіх хронічних ранах діабетиків, а активність MMP-9 була особливо виражена у венозних виразках [26, 46, 47]. MMP-1 і MMP-8 були досить активними в нормальній шкірі та епідермальних клітинах на тлі діабету, а непошкоджені тканини характеризувалися повною відсутністю інгібіторів MMP. Проведені дослідження показали, що рівні MMP та їх інгібіторів

з'являються й підвищуються саме у хронічних ранах. Більше того, ці молекули можуть відіграти провідну роль у хронізації ран. В інших дослідженнях встановлено зростання рівня желатинази MMP-2 у хворих з діабетичними виразками порівняно з пацієнтами із травматичними ранами [23].

Отже, активність протеїназ можна розглядати як одну з ключових ланок процесу загоєння ран. Однак порушення регуляції функціонування літичних ензимів у рановому середовищі як на рівні експресії відповідних генів, так і внаслідок активаторно-інгібіторного дисбалансу можуть не лише спричинити значні аберації явища в ЕЦМ та порушення метаболізму факторів росту і клітинних рецепторів, а й призводити до деградації нормальної тканини. Слід також зважати на те, що в період розвитку нових прогресивних технологій лікування ран агресивний вплив навколишнього середовища може негативно позначитися і знижувати ефективність терапії.

Висновки

MMP є інтегральною складовою частиною системи загоєння ран шкіри. MMP забезпечують розщеплення компонентів базальних мембран і ЕЦМ, модулюють процеси клітинної міграції, проліферації та диференціації, беруть участь в обміні цитокінів і регуляторів ангіогенезу. Зсув активаторно-інгібіторного балансу протеїназ у рановій поверхні призводить до розвитку різних патологій загоєння. Подальше дослідження біохімічних процесів за участю MMP на кожному етапі загоєння може бути корисним для створення ефективних підходів до лікування ран різної етіології.

Література

- Андрущенко П.И. Объект изучения клеточной трансплантации: металлопротеиназы // Трансплантология. — 2005. — Т. 8, № 1. — С. 38-45.
- Александрова А.В. Фармакотерапевтические эффекты ингибитора матричных металлопротеиназ на этапах репарации ожоговой раны: влияние на общую протеолитическую активность в очаге повреждения и в периферической крови // Вісник проблем біології і медицини: Український науково-практичний журнал. — 2012. — Т. 2, № 3. — С. 41-43.
- Александрова А.В. Влияние доксициклина на общую протеолитическую активность при экспериментальном лечении термического ожога // Таврич. мед.-биол. вестник. — Симферополь, 2012. — Т. 15, № 3 (ч. 1). — С. 15-17.
- Бурлака А.П. Активність матричних металопротеїназ у тканинах шурів за введення доксорубіцину та дії комплексу попередників і модуляторів біосинтезу убіхінону // Мед. хімія. — Тернопіль, 2011. — Т. 13, № 2. — С. 10-14.
- Звягинцева Т.В., Александрова А.В., Наумова О.В. Морфологическое исследование экспериментального ожога у крыс при лечении синтетическим ингибитором матричных металлопротеиназ доксициклином // Эксперим. і клініч. медицина. — 2012. — № 1. — С. 39-43.
- Звягинцева Т.В., Александрова А.В. Влияние синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина на состояние процессов про- и антиоксидантной системы при лечении ожоговых ран в эксперименте // Эксперим. і клініч. медицина. — X., 2012. — № 2. — С. 5-8.
- Корсунская И.М., Соболева А.Г., Соболев В.В. и др. Изучение действия низкоинтенсивного лазерного излучения на экспрессию генов матричных металлопротеиназ в культуре клеток кератиноцитов человека // Клинич. дерматология и венерология. — 2011. — № 4. — С. 101-104.
- Протасов М.В., Смагина Л.В., Юдинцева Н.М. Возможность прогнозирования эпителизации ран у крыс по изменению активности матричных металлопротеиназ в раневом экссудате // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 4. — С. 311-314.
- Потеряева О.Н., Русских Г.С., Панин Л.Е. Анализ активности матричных металлопротеиназ и α₁-протеиназного ингибитора в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2-го типа // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — М., 2011. — Т. 152, № 11. — С. 509.
- Потеряева О.Н. Матричные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал. — 2010. — № 5.
- Рогова Л.Н. Матричные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестн. новых мед. технологий. — Тула, 2011. — Т. 18, № 2. — С. 86-89.
- Соболева Г.М., Сухих Г.Т. Семейство матричных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль // Акушерство и гинекология. — 2007. — № 1. — С. 5-8.
- Соловьева Н.И., Рыжакова О.С. Методы определения активности матричных металлопротеиназ // Клинич. лаб. диагностика. — М., 2010. — № 2. — С. 17-21.
- Ahokas K., Skoog T., Suomela S., Jeskanen L., Impola U. et al. Matrilysin-2 (matrix metalloproteinase-26) is upregulated in keratinocytes during wound repair and early skin carcinogenesis. J Invest Dermatol 124: 849-856. 2005.
- Armstrong G., Jude E. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. J Am Podiatr Med Assoc 92 (1): 12-18. 2002.
- Arumugam S., Jang Y.C., Chen-Jensen C. et al. Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair. Surgery 125: 587-93. 1999.
- Atkinson J.J., Toennies H.M., Holmbeck K., Senior R.M. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is necessary for distal airway epithelial repair and keratinocyte growth factor receptor expression after acute injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293:L600-L610. 2007.
- Baker A.H., Edwards D.R., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 115: 3719-3727. 2002.
- Bullard K.M., Lund L., Mudgett J.S. et al. Ann. Surg. Vol. 230. P. 260-265. 1999.
- Bullen E.C., Longaker M.T., Updike D.L., Benton R., Ladin D. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. J Invest Dermatol 104: 236-240. 1995.
- Chen P., Parks W.C. Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. J Cell Biochem 108:1233-1243. 2009.
- Chin G.A., Thigpin T.G., Perrin K.J., Moldawer L.L., Schultz G.S. Treatment of chronic ulcers in diabetic patients with a topical metalloproteinase inhibitor, doxycycline. Wounds 15: 315-323. 2003.
- Johnson S., Rnox A. // Am J Physiol. — 1999. — Vol. 227. — P. L1109-L1117.
- Jude E.B., Rogers AA., Oyiba et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in diabetic and venous ulcers // Diabetologia 44: 3. 2001.
- Kuzuya M., Satake S., Ramos M. et al. Exp. Cell Res. Vol. 248. P. 498-508. 1999.
- Lobman R., Ambrosch A., Schultz G. et al. Expression of gelatinase (MMP-2) in diabetic and non-diabetic wounds. Diabetologia. 44 (Supple 1): 4. 2001.
- Lund L.R., Romer J., Ramos et al. EMBO J. Vol. 18 P. 4645-4656. 1999.
- Martins V.L., Caley M., O'Toole E.A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. Cell Tissue Res. 351: 255-268. 2013.
- Makela M., Pirila E. et al. Metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratocytes. Exp Cell Res 251: 67-78. 1999.
- Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. J Cell Biochem 53: 288-295 Mauviel A., Uitto J. The extracellular-matrix in wound-healing-role of the cytokine network. Wounds 5:137-152. 1993.
- Nagase H. Matrix Metalloproteinases / H. Nagase, J. Woessner // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274, № 31. — P. 21491-94.
- Nwomeh B.C., Liang H.X., Cohen I.K., Yager D.R. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. J Surg Res 81:189-195. 1999.
- Nwomeh B.C., Yager D.R. Physiology of chronic wound. Clin Plast Surg 25: 341-350. 1998.
- Oh J., Seo D.W., Diaz T., Wei B., Ward Y. et al. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. Cancer Res 64:9062-9069. 2004.
- O'Toole E.A., van Koningsveld R., Chen M., Woodley D.T. Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. J Cell Physiol 214:47-55. 2008.
- Overall C.M., Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nat Rev Cancer 2: 657-672. 2002.
- Parks W.C., Wilson C.L., Lopez-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol 4:617-629. 2004.
- Salo T., Makela M., Kylmaniemi M., Autio-Harmainen H., Larjava H. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 during early human wound healing. Lab Invest 70:176-182. 1994.
- Sawicki G., Marcoux Y., Sarkhosh K., Tredget E.E., Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. Mol Cell Biochem 269: 209-216. 2005.
- Scholz F., Schulte A., Adamski F., Hundhausen C., Mittag J. et al. Constitutive expression and regulated release of the transmembrane chemokine CXCL16 in human and murine skin. J Invest Dermatol 127: 1444-1455. 2007.
- Trengove N.J., Stacey M.C., MacAuley S. Analysis of acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. Wound Repair Res 7: 442, 1999.
- Toriseva M., Kahari V.M. Proteinases in cutaneous wound healing. Cell Mol Life Sci 66: 203-224. 2009.
- Tu G., Xu W., Huang H., Li S. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. Curr Med Chem 15: 1388-1395. 2008.
- Takahashi C., Sheng Z., Horan T.P., Kitayama H., Maki M. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13221-13226. 1998.
- Wysocki A.B., Staiano-Coico L., Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. J Invest Dermatol 101: 64-68. 1993.
- Yager D.R., Zhang L.Y., Liang H.X., Diegelmann R.F., Cohen I.K. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. J Invest Dermatol 107: 743-748. 1996.
- Woessner G.F. The family of matrix metalloproteinases. M Ann NY Acad Sci 732: 11. 1994.
- Widgerow A.D. Chronic wound fluid-thinking outside the box. Wound Repair Regen 19: 87-291. 2011.
- Van Wart H.E. et al. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci USA 87: 5578-5587. 1999.