

ÚLOHA MATRIXOVÝCH METALOPROTEINÁZ V PROCESSE INICIÁCIE A ROZVOJA ATEROSKLERÓZY

Mašlanková, J., Stupák, M., Birková A., Hubková B., Mareková M.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

Cieľom prezentovaného článku je zhrnúť úlohu funkčne najdôležitejších matrixových metaloproteináz pri aktivácii a následnom rozvinutí aterosklerotického procesu.

Diskusia Ateroskleróza predstavuje chronické zápalové ochorenie vyvolané v dôsledku synergického efektu mnohých kardiovaskulárnych rizikových faktorov. Široko uznávaným konceptom rozvoja ochorenia je subendotelálna retencia lipoproteínov a bunkových zápalových zložiek. Ukazuje sa však, že štrukturálne zmeny extracelulárneho matrixu (ECM) nemalou mierou ovplyvňujú proces vzniku aterosklerotických plakov a tak prispievajú k regulácii vzniku a rozvoja aterosklerózy. Degradácia proteínov ECM zápalom vyvolanou aktiváciou matrixových metaloproteináz, vedie k prestavbe vaskulárnej steny uľahčujúcej ukladanie plakov a rozvoj ochorenia.

Záver Rozpoznanie a charakterizácia úloh metaloproteináz v aterosklerotickom procese disponuje širokým, terapeuticky významným a diagnosticky relevantným, potenciálom.

KLúčové slová: ateroskleróza, matrixové metaloproteinázy, degradácia extracelulárnej matrix

Úvod

Matrixové metaloproteinázy (MMP) tvoria početnú rodinu na zinku závislých endopeptidáz, ktorých aktivita spočíva najmä v degradácii proteínov extracelulárneho matrixu (ECM) štiepením ich vnútorných peptidových väzieb. Môžu sa vylučovať všetkými bunkami prítomnými vo vaskulárnej stene (Tab. 1), aj keď sa zdá, že makrofágy zohrávajú v aterosklerotických plakoch najvýznamnejšiu úlohu. Každá MMP má špecifický cieľový substrát, podľa ktorého sa klasifikujú do jednotlivých podtried, ako napr. kolagenázy, želatínázy, stromelyzinázy a matrilýziny a ďalšie.

Table 1 Sources of MMPs in human atherosclerotic plaques

(modified according to Johnson et al., 2017) [9]

Endothelial cells	Vascular smooth muscle cells (VSMC)	Macrophages
MMP-1	MMP-1	MMP-1
	MMP-2	MMP-2
MMP-3	MMP-3	MMP-3
		MMP-7
MMP-8	MMP-8	MMP-8
MMP-9	MMP-9	MMP-9
MMP-10		MMP-10
MMP-11	MMP-11	MMP-11
		MMP-12
		MMP-13
	MMP-14	MMP-14
	MMP-16	MMP-16

Kolagenázy (vrátane MMP-1, MMP-8 MMP-13 MMP-18) štiepia intersticiálny kolagén I,II a III a tiež ďalšie molekuly ako napr. bradykinín a angiotenzín I. Fragmenty kolagénu sa následne degradujú pomocou gelatináz. Gelatinázy A a B (MMP-2 a MMP-9) môžu byť sekretované bunkami endotelu, pericytmi, podocyty, fibroblastami, myofibroblastami a monocytmi. Sú zodpovedné za degradáciu kolagénu IV, remodeling ciev, angiogénzu, zápal a prerušenie aterosklerotického plaku [6]. MMP-2 je konštitutívne exprimovaná na bunkovom po-

vrchu, zatiaľ čo MMP-9 je uložená v sekrečných granulách a je indukovateľná exogénnymi stimulmi, ako sú cytokíny, rastové faktory alebo zmenené kontakty bunka - matrix [1].

Stromelysin-1 (MMP-3) a -2 (MMP-10) majú rovnakú substrátovú špecificitu, MMP-3 má v porovnaní s MMP-10 navyše výraznejší proteolytický efekt. Degradujú fibronektín, laminín, želatínu-I, III, IV a V, kolagénové vlákna a proteoglykány.

Matrilýziny (vrátane matrilýzínu-1 (MMP-7) a -2 (MMP-26) môžu hydrolyzovať fibronektín, želatíny a taktiež inhibovať produkciu ľudského plazminogénu.

Membránové typy MMPs (MT-MMPs), transmembránové alebo pomocou GPI (glykozylofosfatidylozitol) zakotvené MMPs môžu degradovať kolagén typu I, -II a III a ďalšie komponenty ECM a tiež aktivovať pro-MMP na MMP. V skutočnosti je väčšina MMP sekretovaná ako prekurzory (zymogény), ktoré sú v extracelulárnom priestore pomocou niekoľkých proteáz vrátane plazminu a iných MMPs konvertované na svoje aktívne formy.

Regulácia syntézy a aktivácie MMP je veľmi komplexná. Radikály kyslíka (ROS) rastové faktory, cytokíny a hormóny môžu ovplyvňovať transkripciu MMP prostredníctvom aktivácie proteínovej kinázy aktivovanej mitogénom (MAPK), inhibície MAPK fosfatázy, inaktívacie histón deacetylázy (zapojená do represie génov) alebo zapojením rôznych chromatin remodelujúcich faktorov.

Úloha MMP v procese aterosklerózy

Remodelácia ECM, ktorá je regulovaná MMPs, je jednou z kľúčových charakteristík aterosklerotického procesu, ktorý tak prispieva k rastu plakov [15]. Aterosklerotické plaky sú charakterizované zvýšenou expresiou MMPs. Vystavenie buniek vaskulárnej steny zápalovým stimulom, ktoré sú prítomné počas chronického zápalu spojeného s aterosklerózou, môže viesť k nadmernej aktivite MMPs v rezidentných a rekrutovaných bunkách arteriálnej steny [18].

Takáto zvýšená aktivita môže podporovať zvýšenú permeabilitu a dysfunkciu endotelialnej bariéry, uľahčiť pritiahnutie zápalových buniek na povrch vaskulárnej steny a vyvolať fenotypovú zmenu buniek hladkej svaloviny (VSMC) smerom k zvýšeniu prežívania, množeniu a migrácii, čo prispieva k zväčšovaniu plakov. MMPs môžu byť obzvlášť dôležité v pokročilom štádiu ochorenia, kde

ich zvýšená aktivita zvyšuje riziko prasknutia plaku a trombogenézy. Regulácia aktivity MMPs sa javí byť preto užitočná pri liečbe aterosklerózy vo fáze zúženia priesvitu ciev a pri destabilizácii a následnej ruptúry plaku. Doteraz známe informácie o úlohe niektorých MMP pri ateroskleróze sú zhrnuté v Tab. 2.

Table 2 Known roles of different MMPs in the atherosclerotic plaque

(modified according to Myasoedova, V.A. et al., 2017) [15]

	Endothelial dysfunction and inflammation	Plaque growth	Neovascularization	Calcification	Instability
MMP-1	promotes endothelial cell senescence; expressed in intimal macrophages	associated with increased intima-media thickness; mediates oxLDL-induced activation of vascular smooth muscle cell	Degrades ECM		
MMP-2	mediates oxLDL effects	associated with increased intima-media thickness; promotes plaque growth; decreases vascular smooth muscle cell contractility	Releases growth factors from ECM glyocalyx	Associated with carotid calcification; involved in calcifying cells formation	Promotes plaque instability
MMP-3		associated with increased intima-media thickness			Promotes plaque instability
MMP-7		associated with increased intima-media thickness		Associated with carotid calcification;	Promotes apoptosis of cells in the fibrous cap
MMP-8		associated with increased intima-media thickness and carotid plaque			
MMP-9	Promote endothelial cell apoptosis; enriched in plaque macrophages suggesting for a role in local inflammation	associated with increased intima-media thickness and carotid plaque, promotes vascular smooth muscle cell migration; decreases vascular smooth muscle cell contractility	Promotes neovascularization by releasing VEGF from ECM		Promotes plaque instability
MMP-10	Expressed in the endothelial cells during chronic inflammation	associated with increased intima-media thickness			
MMP-12	Expressed in intimal macrophages				Involved in lesion destabilization
MMP-13	Expressed in intimal macrophages		Releases growth factors from ECM		
MMP-14	Mediate the effect of oxLD		Releases growth factors from ECM		

MMPs a endotelialna dysfunkcia

Zapojenie MMPs do patogenézy aterosklerózy nastáva v počiatočnom štádiu vývoja endotelovej dysfunkcie. Ukázalo sa, že chronický zápal podporuje expresiu MMP-10 v endotelových bunkách ciev a zvýšená hladina tejto MMP v sére je spojená s zhrubnutím tunica media a tunica intima ciev (IMT) a tvorbou aterosklerotických plakov. Ďalším rizikovým faktorom spojeným s aterosklerózou je

zvýšená hladina oxidovaného LDL lipoproteínu (oxLDL) [17], ktorá vedie k hyperaktivácii MMPs, pravdepodobne prostredníctvom mechanizmu závislého od MMP-14. Zvýšené hladiny MMPs môžu navyše podporovať starnutie a apoptózu endotelialných buniek. Napríklad MMP-1 zvyšuje starnutie endotelu prostredníctvom upregulácie p53 a degradácia endotelialného glykokalyxu závislá od MMP-9 vedie k zvýšenej apoptóze endotelialných buniek.

Degradácia medzibunkových endoteliálnych spojení, ktorá je sprostredkovaná MMPs, môže tiež indukovať apoptózu endoteliálnych buniek, ktorá v pokročilých štádiách ochorenia vedie k arteriálnej denudácii a tvorbe vaskulárnych oblastí bez endoteliálnych buniek so zvýšenou tromboгенicitou [20].

Zhrubnutie steny ciev

Súvislosť medzi aktivitou MMP a zhrubnutím intimy pri ateroskleróze bola opísaná v mnohých vedeckých prácach. Napríklad zvýšené plazmatické hladiny MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8 a MMP-9 boli detegované u pacientov s hrubšou tunica media a tunica intima ciev (IMT) v porovnaní s pacientmi s nižšou IMT. Liu a kol. vo svojej práci uvádzajú, že zvýšená aktivita MMP-3 je spojená so zúžením lúmenu krčnej tepny a infarktom myokardu [12]. U pacientov s predklinickou aterosklerózou bola preukázaná priama súvislosť zvýšených hladín MMP-10 so zápalovými markermi a karotickou IMT. V práci Djurica a kol. sa uvádza, že plazmatická hladina MMP-8 je spojená s aterosklerózou karotídy [3].

Je pravdepodobné, že MMPs prispievajú k zhrubnutiu arteriálnej steny hlavne prostredníctvom aktivácie fenotypových zmien buniek hladkej svaloviny. Tieto bunky počas tvorby plakov strácajú svoju kontraktilnú schopnosť a začínajú sa množiť a migrovať smerom k tunica media – tunica intima vrstvám, kde prispievajú k rastu plakov. Potvrdilo sa napríklad, že inhibícia MMP-9 znižuje migráciu aortálnych buniek hladkej svaloviny indukovanú TNF- α . MMPs uľahčujú migráciu buniek hladkej svaloviny degradáciou ECM, ale nie je to jediný mechanizmus ich vplyvu na bunky arteriálnej steny. Je dokázané, že MMPs ovplyvňujú aj kontraktilitu buniek hladkej svaloviny prostredníctvom inhibície Ca²⁺signalizácie. Okrem toho MMPs rozširujú vonkajšiu vrstvu spojivového tkaniva (tunica adventitia), ktorá pokrýva krvné cievy [19].

Neovaskularizácia

Neovaskularizácia plaku je vyvolaná hypoxickým a zápalovým mikroprostredím v lézii a spôsobuje vznik nezrelých novotvarov spojených s hemorágiou a prasknutím plaku [5]. Účasť na angiogéneze je fyziologickou funkciou MMPs. Jedným z mechanizmov na podporu neovaskularizácie je uvoľňovanie rastových faktorov, ako je VEGF, z ECM. Nadprodukcia MMPs v plaku podporuje tvorbu aberantných novotvarov so zvýšenou priepustnosťou. Nedostatočná bariérová funkcia a slabá integrita plakových novotvarov môžu prispievať k zvýšenej proteolytickej aktivite MMPs a iných proteáz, ktoré degradujú „tight-junction“ proteíny. Nedávna štúdia Butoia a kol., ukázala, že makrofágy a bunky hladkej svaloviny interagujú navzájom, čo vedie k zvýšenej produkcii MMP-1 a MMP-9 oboch typov buniek a následne k zvýšenej degradácii kolagénu a elastínu. Uvedené naznačuje, že komunikácia medzi makrofágmi a bunkami hladkej svaloviny prispieva k neovaskularizácii a destabilizácii plakov [2].

Kalcifikácia plakov

Ektopická mineralizácia plakov je častým javom, ktorý sa vyznačuje ukladaním fosforečnanových solí vápnika a abnormálnou diferenciaciou buniek hladkej svaloviny

okolo osteoblastov [10]. Bolo preukázané, že niektoré MMPs spúšťajú vaskulárnu kalcifikáciu. Pre transformáciu buniek hladkej svaloviny na kalcifikujúce vaskulárne bunky (CVC) je rozhodujúca komunikácia medzi dvomi proteázami, calpainom-1 a MMP-2. Calpain-1 môže aktivovať MMP-2 z dovtedy inaktívnej proMMP-2, ktorá následne moduluje kalcifikáciu zvýšeným ukladaním kolagénu v ECM a podporou kalcifikácie buniek hladkej svaloviny. „Up-regulácia“ calpainu-1 koreluje s „up-reguláciou“ TGF- β 1/ SMAD dráhy, aktiváciou alkalické fosfatázy a potlačením inhibítorov mineralizácie osteopontínu a osteonektínu [7]. Gaubatz a kol., vo svojej publikácii opísali vplyv MMP-7 na kalcifikáciu krčnej tepny [4].

Nestabilita plakov

V určitom okamihu poškodenia endotelu, ktorý pokrýva aterosklerotické plaky vznikne fibrotická čiapka, ktorá slúži ako izolátor s ochrannými funkciami. Najnebezpečnejšie, nestabilné plaky sú charakteristické poškodenou alebo zúženou fibrotickou čiapkou, kalcifikáciou a prítomnosťou nekrotického jadra, neovaskularizáciou a krvácaním [5]. Podľa práce Levkau a kol. zvýšená aktivita MMP-7 v nestabilných plakoch pravdepodobne súvisí s apoptózou buniek hladkej svaloviny vo fibróznej čiapke a destabilizáciou lézií. Okrem toho sa predpokladá, že kolagenolytická aktivita MMPs vedie k zúženiu fibrotickej čiapky a zvýšeniu rizika jej prasknutia [11].

U myši s nedostatkom ApoE nesúcich deléciu jednej z analyzovaných MMPs bola vykonaná zaujímavá analýza úloh rôznych MMPs v stabilite plakov. Nezistilo sa žiadne spojenie MMP-7 s rastom lézií, hoci hladiny MMP-7 korelovali so zníženým množstvom buniek hladkej svaloviny v plakoch. Ukázalo sa však, že MMP-2 podporuje rast a nestabilitu lézií, zatiaľ čo MMP-3 a MMP-9 naopak podporujú stabilizáciu plakov a obmedzený rast plakov [8]. No ďalšia štúdia ukázala, že MMP-9 a MMP-12 by mohli podporovať aterogénezu, aj keď delécia MMP-12 neovplyvnila rast lézií a deficiencia MMP-9 viedla k zníženiu rastu plakov, zníženiu infiltrácie makrofágov a akumulácii kolagénu [13]. Zdá sa, že niektoré MMPs prispievajú k rastu plakov, zatiaľ čo iné neovplyvňujú vývoj lézií, ale sú zapojené do destabilizácie pokročilých plakov. Vyžadujú sa ďalšie štúdie zamerané na určité MMPs so špecifickými inhibítormi pre presnejšie vyhodnotenie vplyvu MMPs na rast plakov a ich stabilitu.

Trombóza

Najnebezpečnejším dôsledkom je trombogenéza spojená s aterosklerózou, najmä v miestach nestabilných plakov. Po aktivácii krvné doštičky uvoľnia niekoľko MMPs ktoré prispievajú k trombogenéze. Momi a kol. opísali u myši s deficitom MMP-2 významnú redukciu trombózy, čo naznačuje protrombotickú úlohu tohto enzýmu [14]. Aktivované ľudské krvné doštičky vylučujú MMP-2 v mieste vaskulárneho poškodenia. Aktívne MMP-2 naopak stimulujú agregáciu krvných doštičiek prostredníctvom aktivácie PAR-1 a „up-regulácie“ PI3K [16].

Záver

Prezentovaná štúdia sumarizuje poznatky posledného obdobia opisujúce podstatné úlohy matrixových metaloproteináz pri endotelialnej dysfunkcii, zhrubnutí steny ciev, neovaskularizácii, kalcifikácii plakov a v neposlednom rade aj pri najzávažnejšom dôsledku aterosklerózy, tromboze ciev. Degradácia špecifických proteínov, ktoré slúžia ako substráty enzýmov štiepiacich ECM, zohráva dôležitú funkciu v regulácii celého aterosklerotického procesu. Regulácia životného cyklu vaskulárnych buniek prostredníctvom modulácie syntézy a aktivácie MMPs predstavuje do budúca značný terapeutický potenciál v liečbe aterosklerózy.

Literatúra

1. Bourboulia, D., Stetler-Stevenson, W.G.: Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol.* 20, 2010, 161-68.
2. Butoi, E., et al.: Cross-talk between macrophages and smooth muscle cells impairs collagen and metalloprotease synthesis and promotes angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2016, 1568-78.
3. Djurić, T. et al.: Plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with carotid atherosclerosis. *J Clin Lab Anal.* 24, 2010, 246-51.
4. Gaubatz, J.W. et al.: Association of circulating matrix metalloproteinases with carotid artery characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 2010, 1034-42.
5. Chistiakov, D.A. et al.: Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. *Acta Physiol (Oxf).* 213, 2015, 539-53.
6. Jaiswal, A. et al.: Comparative analysis of human matrix metalloproteinases: Emerging therapeutic targets in diseases. *Bioinformation* 6, 2011, 23-30.
7. Jiang, L. et al.: Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis. *Hypertension* 60, 2012, 1192-199.
8. Johnson, J.L.: Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 816, 2017, 93-106.
9. Johnson, J.L. et al.: Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2005, 15575-580.
10. Kalamogias, A. et al.: Basic mechanisms in atherosclerosis: The role of calcium. *Med Chem.* 12, 2016, 103-13.
11. Levkau, B. et al.: Activation of metalloproteinases and their association with integrins: an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells. *Cell Death Differ.* 9, 2002, 1360-367.
12. Liu, J., Khalil, R.A.: Matrix metalloproteinase inhibitors as investigational and therapeutic tools in unrestrained tissue remodeling and pathological disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 148, 2017, 355-420.
13. Lutun, A. et al.: Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 109, 2004, 1408-414.
14. Momi, S. et al.: Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *J Exp Med.* 206, 2009, 2365-379.
15. Myasoedova, V.A. et al.: Matrix metalloproteinases in pro-atherosclerotic arterial remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 123, 2018, 159-67.
16. Sebastiano, M. et al.: A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2-mediated PAR1 biased signaling. *Blood* 129, 2017, 883-95.
17. Štelmachová, J., Petrašová, D.: Tukové tkanivo a perspektívy využitia adipocytokínov v liečbe diabetu. *Ateroskleróza* 19, 2015, (1-2):741-46.
18. Wang, M. et al.: Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension.* 65, 2015, 698-703.
19. Wang, Z. et al.: Angiotensin-II induces phosphorylation of ERK1/2 and promotes aortic adventitial fibroblasts differentiating into myofibroblasts during aortic dissection formation. *J Mol Histol.* 45, 2014, 401-12.
20. Xu, F. et al.: Endothelial cell apoptosis is responsible for the formation of coronary thrombotic atherosclerotic plaques. *Tohoku J Exp Med.* 218, 2009, 25-33.

The role of matrix metalloproteinases in the process of initiation and development of atherosclerosis

Mašlanková, J., Stupák, M., Birková A., Hubková B., Mareková M.

Aim The aim of this paper is to summarize roles of the most important matrix metalloproteinases in the activation and subsequent development of the atherosclerotic process.

Discussion Atherosclerosis represents a chronic inflammatory disease caused by the synergistic effect of many cardiovascular risk factors. Subendothelial retention of lipoproteins and cellular inflammatory components is a widely accepted concept for disease development. However, it appears that the structural changes of extracellular matrix (ECM) have a considerable influence on the process of atherosclerotic plaque formation and thus contribute to the regulation of the initiation and development of atherosclerosis. The degradation of ECM proteins by inflammation induced activation of

matrix metalloproteinases leads to remodeling of the vascular wall facilitating plaque deposition and disease development.

Conclusion *The recognition and characterization of the roles of metalloproteinases in the atherosclerotic process has a therapeutically significant and diagnostically relevant potential.*

Key words atherosclerosis, matrix metalloproteinases, degradation of extracellular matrix

Autori deklarujú, že nemajú potenciálny konflikt záujmov.

Korešpondujúci autor:

RNDr. Jana Mašlanková, PhD.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF

Trieda SNP č. 1, 04011 Košice

E-mail: jana.maslankova@upjs.sk