

**УДК 616.34-002-02****ЭФЕКТИВНОСТЬ АГОНИСТОВ D<sub>2</sub> ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА**

Підпружнікова Г.Ю., Кухарський В.М., Дзюбенко Н.В., Толстанова А.Н.

**Резюме.** Впервые установлено, что пероральное введение агонистов D<sub>2</sub> дофаминовых рецепторов каберголина (50 мкг/кг) и бромокриптина (50 мкг/кг) значительно улучшает клинические и морфологические показатели йодоацетамид-вызванного язвенного колита у крыс.

**Ключевые слова:** D<sub>2</sub> дофаминовые рецепторы, язвенный колит, каберголин, бромокриптин.

**УДК 616.34-002-02**

Підпружнікова Г.Ю., Кухарський В.М., Дзюбенко Н.В., Толстанова Г.М.

**ЭФЕКТИВНІСТЬ АГОНІСТІВ D<sub>2</sub> ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ**

**Резюме.** Вперше встановлено, що пероральне введення агоністів D<sub>2</sub> дофамінових рецепторів каберголіну (50 мкг/кг) та бромокриптину (50 мкг/кг) значно покращує клінічні та морфологічні ознаки йодоацетамід-викликаного виразкового коліту у щурів.

**Ключові слова:** D<sub>2</sub> дофамінові рецептори, виразковий коліт, каберголін, бромокриптин.

**UDC 616.34-002-02****EFFICACY of D<sub>2</sub> DOPAMINE RECEPTOR AGONISTS in EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS TREATMENT**

Pidpruzhnykova G.J., Kuharskiy V.M., Dzubenko N.V., Tolstanova G.M.

**Summary.** We showed for the first time that treatment with D<sub>2</sub> dopamine receptor agonists cabergoline (50 mkg/kg, per.os.) and bromocriptine (50 mkg/kg, per.os.) significantly improves clinical and morphologic signs of iodoacetamide-induced ulcerative colitis in rats.

**Key words:** D<sub>2</sub> dopamine receptor, ulcerative colitis, cabergoline, bromocriptine.

Стаття надійшла 15.10.2010 р.

**УДК 616.34-002-02+616.34:611.13/14**

Г.М. Толстанова

**РОЛЬ МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-9 В ГЕНЕРАЦІЇ ЕНДОСТАТИНУ В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТА**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Робота виконана в рамках НДР біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса «Дослідження механізмів функціонування органів травного тракту та розробка методів їх корекції», № держреєстрації 0106U005755.

**Вступ.** Ендостатин – потужний антиангіогенний фактор, який пригнічує абнормальний/патологічний ангиогенез, що спостерігається при злоякісних пухлинах та хронічних запальних захворюваннях [5, 7]. Підвищення рівня ендостатину було показано у хворих на виразковий коліт [2] та на експериментальних моделях даної патології [1, 13].

Ендостатин – 20 кДа фрагмент СООН-кінця NC1 домена колагену XVIII α1-ланцюга, який був

вікритий та виділений з лінії клітин гемангіоендотеліоми мишей [6]. Ендостатин утворюється в результаті протеолітичної деградації колагену XVIII під дією різних протеїназ, в тому числі матрикс метапротеїнази-9 (ММР-9) [11].

Підвищення активності та експресії ММР-9 було показано у хворих на виразковий коліт [10], а також в наших дослідженнях на моделі йодоацетамід-викликаного коліта у щурів та у мишей з спонтанно-виникаючим колітом, в результаті дефіциту інтерлейкіна-10 [13]. Більш того, клінічні та експериментальні дослідження показали домінування матрикс металопротеїназ в слизовій оболонці кишечника в патогенезі виразкового коліта [4, 16].

**Метою даної роботи** було дослідити роль MMP-9 в генерації ендостатину при виразковому коліті.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені на мишах лінії FVB обох статей в віці 6-8 тижнів. В роботі були використані нормальні миші (WT) та миші з дефіцитом MMP-9 (MMP-9<sup>-/-</sup>). Виразковий коліт моделювали згодовуванням 3%-го розчину декстрану сульфату натрію DSS (Mr= 50000; ICN Biochemicals, США) розчиненому у питній воді впродовж 6 днів. Контрольна група отримувала звичайну питну воду. Моніторинг клінічних проявів хвороби та маси тіла мишей проводили щоденно. Щурів умертвляли на 7-ий день після початку експерименту шляхом інгаляції з CO<sub>2</sub> та наступною цервікальною дислокацією. Два сантиметри дистального відділу товстої кишки видаляли та занурювали в рідкий азот для подальших молекулярно-біологічних досліджень. Утримання мишей, моделювання коліта, а також забір матеріалу проводили на базі Університету імені Еморі, м. Атланта, США.

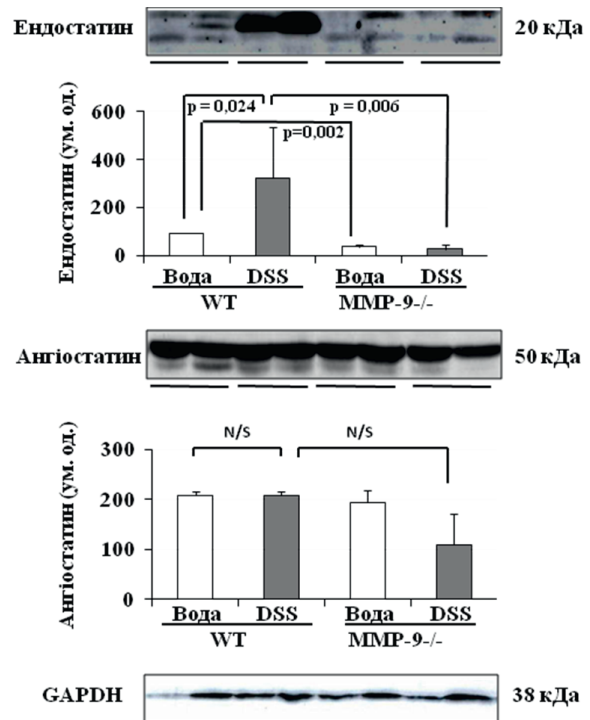
Для виділення загальної фракції білків слизової оболонки товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері з додаванням інгібітора протеїназ (Sigma, США). Концентрацію білка вимірювали за методом Бредфорда з використанням набору «Bio-Rad для білкового аналізу» (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білка (100 мкг заг. білка/зразок) методом Вестерн блот проводили в 10 чи 15 % SDS поліакриламідному гелі з наступним переносом на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) згідно стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Антитіла проти ендостатину (1:250; LabVision, США), ангіостатину (1:500; Abscam, США) використовували для визначення рівня відповідних білків в стінці товстої кишки, з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1:3000, Santa-Cruz Biotech., США). Експресію білка GAPDH (анти-GAPDH антитіло 1:3000; EnCor Biot, США) використовували як контроль кількості білків в зразку. Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США). Інтенсивність сигналу визначали за допомогою оптико-денситометричного аналізу з використанням програмного забезпечення Phoretix 1D.

Статистичну обробку результатів проводили за t тестом Стьюдента. Дані представлені у вигляді M±SD, n – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю р<0,05.

**Результати досліджень та їх обговорення.** MMP-9 належить до індукцибельних матрикс металопротеїназ, рівень експресії яких дуже низький за нормальних умов та значно підвищується при перебудові зовнішньоклітинного матрикса. Різноманітні цитокіни, фактори росту, фізичний стрес, активовані онкогени є стимуляторами експресії MMP-9. Цей ензим секретується в неактивній латентній формі (про-MMP-9) та активується в результаті протеолітичного відщеплення про-

домена [14]. Існує дві ізоформи про-MMP-9: мономер (~92 кДа) і дисульфідно-зв'язаний гомодимер (~220 кДа) [15], при чому MMP-9 проявляє однакову каталітичну активність в обох формах [3].

В нашій роботі для дослідження ролі MMP-9 в генерації ендостатину при виразковому коліті ми застосували сучасний підхід, а саме визначення рівня ендостатину у мишей з дефіцитом гена MMP-9. Як видно на **рис.**, у MMP-9<sup>-/-</sup> мишей спостерігається зниження рівня ендостатину майже в 2-рази (p=0,002) у порівнянні з нормальними мишами. DSS-викликаний виразковий коліт у нормальних мишей спричинює збільшення рівня ендостатину в 3-рази (p=0,024) відносно групи мишей, що отримували воду. Дефіцит MMP-9 знімав збільшення рівня ендостатину на фоні DSS-викликаного виразкового коліта (p=0,006, відносно нормальних мишей з DSS-викликаним виразковим колітом).



**Рис.** Рівень ендостатину та ангіостатину у нормальних мишей (WT) та мишей з дефіцитом MMP-9 (MMP-9<sup>-/-</sup>) у нормі та на фоні виразкового коліта, спричиненого DSS. Вестерн блот, M±SD, n=3. N/S-не достовірна різниця.

Важливо зауважити, що рівень іншого анти-ангіогенного фактора ангіостатину, який також може утворюватися в результаті протеолітичної деградації плазміногена MMP-9 [12], залишався без змін у MMP-9<sup>-/-</sup> мишей у порівнянні з нормальними мишами (**рис.**).

Отже, MMP-9 відіграє провідну роль в генерації ендостатину в патогенезі виразкового коліта. На користь отриманих нами даних є результати Bendrik та співав. [8]. Вони показали, що введення аденовірусу з вектором гена MMP-9 значно пригнічувало ріст злоякісних пухлин та число

мікросудин, цей ефект асоціювався зі значним підвищенням ендостатину. Також, Lindsey та співав. [9] спостерігали активацію процесів ангіогенезу у мишей з дефіцитом MMP-9 після інфаркту міокарда, що може бути пов'язано зі зниженням рівня анти-ангіогенного фактора ендостатину.

**Висновки.** Вперше показано провідну роль MMP-9 в генерації ендостатину за умов норми та в патогенезі експериментального виразкового коліта.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у вивченні терапевтичної ефективності ендостатину в патогенезі експериментального виразкового коліта.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: A key to impaired healing? / Z. Sandor, X.M. Deng, T. Khomenko [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – Vol. 350, N 1. – P. 147-150.
2. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease / K.A. Oikonomou, A.N. Kapsoritakis, A.I. Kapsoritaki [et al.] // *Inflammatory Bowel Disease*. – 2010. – PMID:20629092 [Epub ahead of print].
3. Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1 / M.W. Olson, M.M. Bernardo, M. Pietila [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. Vol. 275, N 4. – P. 2661-2668.
4. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease / B. von Lampe, B. Barthel, S.E. Coupland [et al.] // *Gut*. – 2000. – Vol. 47, N 1. – P. 63-73.
5. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis / G. Yin, W. Liu, P. An [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2002. – Vol. 5, N 5. – P. 547-554.
6. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth / M.S. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing [et al.] // *Cell*. – 1997. – Vol. 88, N 2. – P. 277-285.
7. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action / J. Folkman // *Experimental Cell Research*. – 2006. – Vol. 312, N 5. – P. 594-607.
8. Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer in vivo / C. Bendrik, J. Robertson, J. Gaudie [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68, N 9. – P. 3405-3412.
9. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction / M.L. Lindsey, G.P. Escobar, L.W. Dobrucki [et al.] // *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – Vol. 290, N 1. – P. 232-239.
10. Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease / M.D. Baugh, M. Perry, A. Hollander [et al.] // *Gastroenterology*. – 1999. – Vol. 117, N4. – P. 814-822.
11. Nyberg P. Endogenous inhibitors of angiogenesis / P. Nyberg, L. Xie, R. Kalluri // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 10. – P. 3967-3979.
12. Patterson B.C. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9) / B.C. Patterson, Q.A. Sang // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272, N 46. – P. 28823-28825.
13. Relationship between angiogenic and anti-angiogenic factors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / G. Tolstanova, X. Deng, T. Khomenko [et al.] // *Gut*. – 2007. – Vol. 56. – P. A50.
14. Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis / J.E. Rundhaug // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 9, N 2. – P. 267-285.
15. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages / S.M. Wilhelm, I.E. Collier, B.L. Marmor [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264, N 29. – P. 17213-17221.
16. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridization / M.T. Salmela, T.T. MacDonald, D. Black [et al.] // *Gut*. – 2002. – Vol. 51, N 4. – P. 540-547.

**УДК** 616.34-002-02+616.34:611.13/14

#### РОЛЬ МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕІНАЗИ-9 В ГЕНЕРАЦІЇ ЕНДОСТАТИНУ В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТА

Толстанова Г.М.

**Резюме.** Вперше показано, що матрикс металопротеїнази-9 відіграє провідну роль у генерації потужного анти-ангіогенного фактора ендостатину за умов норми та в патогенезі експериментального виразкового коліта, спричиненого декстраном сульфату натрію.

**Ключові слова:** матрикс металопротеїнази-9, ендостатин, виразковий коліт.

**УДК** 616.34-002-02+616.34:611.13/14

#### РОЛЬ МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕІНАЗИ-9 В ГЕНЕРАЦІЇ ЕНДОСТАТИНА В ПАТОГЕНЕЗІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛІТА

Толстанова А.Н.

**Резюме.** Впервые показано, что матрикс металлопротеиназы-9 играет ведущую роль в генерации анти-ангиогенного фактора эндостатина в норме и на фоне экспериментального язвенного колита, вызванного декстраном сульфата натрия.

**Ключевые слова:** матрикс металопротеиназы-9, эндостатин, язвенный колит.

**UDC** 616.34-002-02+616.34:611.13/14

#### ROLE of MATRIX METALLOPROTEINASE-9 in ENDOSTATIN GENERATION in PATHOGENESIS of EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Tolstanova G.M.

**Summary.** We showed for the first time that matrix metalloproteinase-9 plays a key role in generation of potent anti-angiogenic factor endostatin in normal condition and during dextran-sodium sulfate-induced ulcerative colitis.

**Key words:** matrix metalloproteinase-9, endostatin, ulcerative colitis.

Стаття надійшла 12.10.2010 р.