

Activities of circulating matrix metalloproteinases in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment

Aktivity cirkulujúcich matrixových metaloproteináz u pacientov so srdcovým zlyháváním vo vzťahu k pohlaviu, hypertenzii a jej liečbe

Radošinská J^{1,3}, Giannakos E¹, Vardali E², Barteková M^{1,3}, Fogarassyová M³, Barančík M³

¹Fyziologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Radosinska J, Giannakos E, Vardali E, Bartekova M, Fogarassyova M, Barancik M. **Activities of circulating matrix metalloproteinases in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment.** Cardiology Lett. 2016;25(6):449–453

Abstract. *Background:* The extracellular matrix is the subject of extensive study due to its dynamic nature and its major role in the development of several diseases. Matrix metalloproteinases (MMPs) are proteolytic enzymes responsible for the degradation and remodeling of the extracellular matrix. It is also suggested they play an important role in the pathogenesis of heart failure (HF). Our aim was to determine the activities of circulating MMP-2 and MMP-9 in patients with HF in respect of gender, occurrence of hypertension and treatment.

Methods: MMP-2 and MMP-9 activities were determined using gelatin zymography in plasma collected from 51 participants.

Results: We did not discover any overall differences in circulating MMP-2 and MMP-9 activities between the patients with HF and those without it. However, there was a decrease in activity of MMP-2 in treated hypertensive participants versus healthy ones. In contrast, we observed increased MMP-2 activity in hypertensive participants with coexistent HF versus hypertensive participants without HF. In addition, a decrease in MMP-2 activity was shown in women suffering from HF versus men suffering from HF.

Conclusions: A potential inhibitory effect of antihypertensive treatment on MMP-2 activity was found, but coexistent HF with hypertension reduces this inhibitory effect. Our data also suggest the role of potential cardioprotective factors influencing the activity of MMP-2 in women. Since we did not detect any changes in pro-MMP-9 activities among the groups, pro-MMP-2 seems to be a more sensitive parameter reflecting gender and hypertension in HF. Fig. 1, Tab. 1, Ref. 16, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: matrix metalloproteinases (MMPs) – heart failure – hypertension – antihypertensive drugs – gender

Radošinská J, Giannakos E, Vardali E, Barteková M, Fogarassyová M, Barančík M. **Aktivity cirkulujúcich matrixových metaloproteináz u pacientov so srdcovým zlyháváním vo vzťahu k pohlaviu, hypertenzii a jej liečbe.** Cardiology Lett. 2016;25(6):449–453

Abstrakt. *Cieľ práce:* Extracelulárna matrix (EM) v srdci je predmetom intenzívneho výskumu, pretože zmeny v EM významne ovplyvňujú patogenézu rôznych ochorení, vrátane srdcového zlyhávania (SZ). Matrixové

Z ¹Fyziologického ústavu, Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ²Center of Health, Koufalia, Thessaloniki, Grécko a ³Ústav pre výskum srdca, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 21. septembra 2016; prijaté dňa 28. októbra 2016

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Jana Radošinská, PhD., Fyziologický ústav LF, Univerzita Komenského v Bratislave, Sasinkova 2, 813 72 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: jana.radosinska@fmed.uniba.sk

Primárna práca bola v plnom rozsahu publikovaná v: Giannakos E, Vardali E, Bartekova M, Fogarassyova M, Barancik M, Radosinska J. Changes in activities of circulating MMP-2 and MMP-9 in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment: a cross-sectional study. *Physiol Res* 2016;65(Suppl. 1): S149-S152.

metaloproteinázy (MMP) sú proteolytické enzýmy, ktoré majú dôležitú úlohu pri degradácii a remodelácii EM. Cieľom našej práce bolo stanoviť aktivitu cirkulujúcich MMP-2 a MMP-9 u pacientov so SZ, ako aj u zdravých kontrol, a to vzhľadom na pohlavie, prítomnosť hypertenzie a jej liečby.

Metodika: Aktivity MMP-2 a MMP-9 sme stanovovali pomocou želatínovej zymografie v krvnej plazme 51 účastníkov štúdie.

Výsledky: Nezistili sme rozdiely v aktivitách cirkulujúcich MMP-2 a MMP-9 u pacientov so SZ v porovnaní s kontrolami. Zaznamenali sme však rozdiely v aktivite MMP-2 po rozdelení účastníkov štúdie podľa pohlavia a prítomnosti, respektíve neprítomnosti hypertenzie. Aktivita MMP-2 sa znížila u pacientov s hypertenziou v porovnaní so zdravými kontrolami, ako aj v porovnaní s hypertenznými pacientmi so SZ. V skupine pacientov so SZ boli aktivity MMP-2 vyššie u mužov v porovnaní so ženami.

Záver: Na základe výsledkov našej štúdie konštatujeme, že antihypertenzná liečba pravdepodobne pôsobí inhibične na aktivity cirkulujúcich MMP-2, pričom prítomnosťou SZ u hypertenzných pacientov sa tento inhibičný vplyv eliminuje. Kardioprotektívne faktory u ženského pohlavia môžu zahŕňať aj inhibíciu aktivity MMP-2. Keďže sme nezaznamenali žiadne rozdiely v aktivitách MMP-9 medzi skupinami, aktivity MMP-2 sa preukázali ako citlivejší biomarker odrážajúci najmä pohlavie a prítomnosť antihypertenznej liečby u pacientov so SZ. Obr. 1, Tab. 1, Lit. 16, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: matrixové metaloproteinázy (MMP) – srdcové zlyhávanie – hypertenzia – antihypertenzná liečba – pohlavie

Matrixové metaloproteinázy (MMP) predstavujú skupinu proteolytických enzýmov, ktoré sú zodpovedné za štiepenie extracelulárnej matrix. Podieľajú sa na remodelácii rôznych typov tkanív pri fyziologických aj patologických podmienkach, pričom je dobre známa ich účasť na rozvoji srdcového zlyhávania (SZ) (1). Väčšina známych MMP sa uvoľňuje do extracelulárneho priestoru v latentnej forme, respektíve vo forme proenzýmu (proMMP). Aktivácia tejto latentnej formy je nevyhnutná pre jej proteolytickú aktivitu, čo sa dosahuje enzymatickým odštiepením propeptidovej domény. MMP-2 a MMP-9 sú dve významné MMP, ktoré sa zúčastňujú na procese remodelácie srdca a taktiež na vývoji SZ (2, 3). Keďže aktivity MMP-2 a MMP-9 by mohli slúžiť ako potenciálne biomarkery prognózy SZ (4), cieľom našej práce bolo stanoviť aktivity cirkulujúcich MMP-2 a MMP-9 a ich proenzýmov u pacientov s chronickým SZ vo vzťahu k pohlaviu, hypertenzii a jej liečbe.

Súbor pacientov a metodika

Do experimentu bolo zaradených 51 náhodne vybraných pacientov z „Centre of Health“ (Koufalia, Grécko). Štúdiu

schválila Etická komisia tohto centra. Pacienti so SZ boli rozdelení podľa New York Heart Association (NYHA) takto: trieda I – 9 %, trieda II – 44 %, trieda III – 34 % a trieda IV – 13 %. Všetci hypertenzní pacienti mali diagnostikovanú primárnu hypertenziu. Charakteristika účastníkov štúdie ja zhrnutá v **tabuľke 1**.

Venózna krv sa odoberala ráno nalačno a centrifugovala pri 2 000 g počas 10 min pri 4 °C. Odobratá plazma sa transportovala a skladovala pri –80 °C až do uskutočnenia analýz. Aktivity cirkulujúcich MMP boli stanovené pomocou metódy zymografie s použitím polyakrylamidového gélu, ktorý obsahoval želatínu slúžiacu ako substrát pre MMP-2 a MMP-9 (5). Výsledky sú vyjadrené v jednotkách optickej denzity a prezentované ako priemer ± smerodajná odchýlka. Na zistenie štatisticky významných rozdielov sme podľa potreby použili nepárový t-test, respektíve jednocestnú ANOVU s následným Tukey HSD post hoc testom.

Výsledky

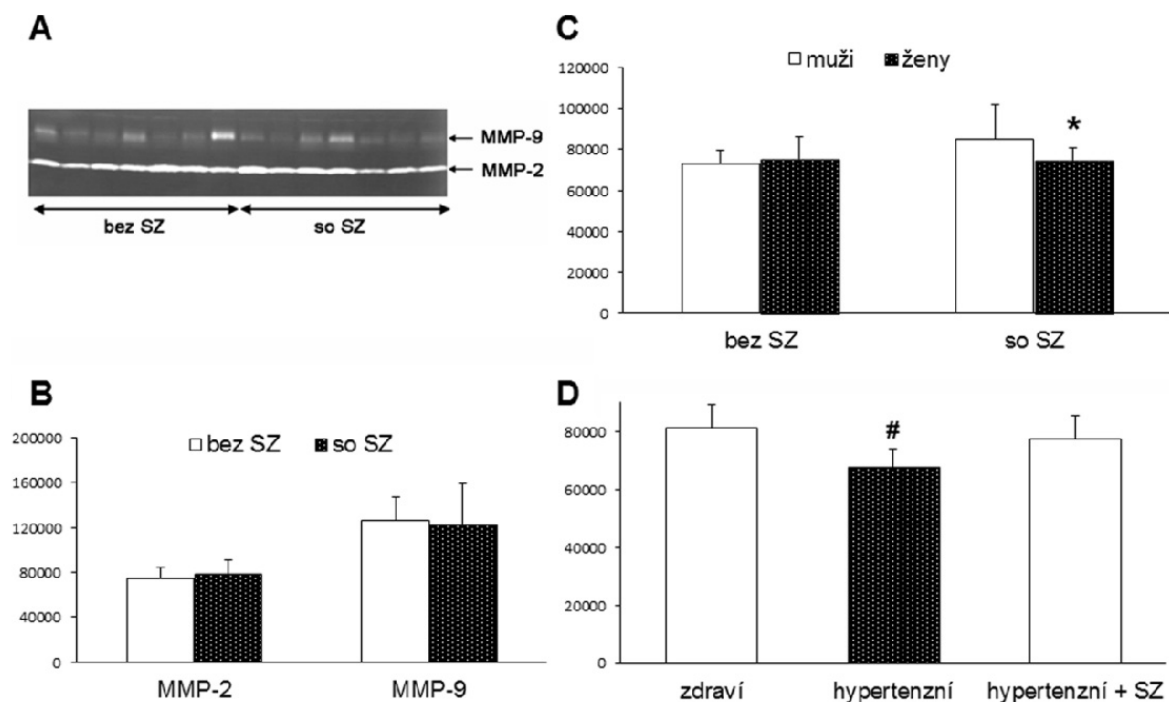
Vo všetkých našich zymogramoch boli detegovateľné želatinolytické aktivity 72 kDa formy MMP-2 (pro-MMP-2) a 92 kDa formy MMP-9 (pro-MMP-9) (**obrázok 1A**). Po ich kvantitatívnom vyhodnotení sme nezaznamenali celkové rozdiely v aktivitách cirkulujúcich MMP-2 a MMP-9 u pacientov so SZ v porovnaní s účastníkmi štúdie bez SZ: MMP-2: 74 674 ± 9 966 bez SZ verus 78 599 ± 12 338 so SZ; MMP-9: 125 773 ± 21 337 bez SZ verus 122 445 ± 36 296 so SZ (**obrázok 1B**). Zaznamenali sme však rozdiely v aktivitách MMP-2 po rozdelení účastníkov podľa pohlavia a prítomnosti, respektíve neprítomnosti hypertenzie. Hoci sme nepozorovali rozdiely v aktivitách MMP-2 medzi mužmi a ženami bez SZ (72 752 ± 6 752 u mužov verus

Tabuľka 1 Charakteristika účastníkov štúdie

Table 1 Characteristics of participants

Charakteristika	
Muži/ženy	17/34
Vek (Muži/ženy)	64,6 ± 13,5 (67,8 ± 11,6/62,9 ± 14,3)
Zdraví účastníci štúdie	10
Bez SZ/so SZ	19/32
Muži so SZ/ženy so SZ	12/20
Normotenzní/hypertenzní	28/23
Hypertenzní so SZ/ hypertenzní bez SZ	15/8

SZ – srdcové zlyhávanie



Obrázok 1A Reprezentatívny zymogram s aktivitami MMP-2 a MMP-9. **1B:** Kvantitatívne vyhodnotenie aktivít MMP-2 a MMP-9 u pacientov so SZ a bez SZ. **1C:** Pohlavné rozdiely v aktivitách MMP-2 u pacientov so SZ a bez SZ, * $p < 0,05$ ženy so SZ v porovnaní s mužmi so SZ. **1D:** Kvantitatívne vyhodnotenie aktivít MMP-2 u zdravých účastníkov štúdie, hypertenzných pacientov a hypertenzných pacientov so SZ, # $p < 0,05$ zdraví v porovnaní s hypertenznými pacientmi a $p < 0,05$ hypertenzní pacienti v porovnaní s hypertenznými pacientmi so SZ. **Figure 1A** Representative zymogram of MMP-2 and MMP-9 activities. **1B:** Quantitative analysis of MMP-2 and MMP-9 activities in participants without and with HF. **1C:** Gender differences in MMP-2 activities in participants without and with HF, * $p < 0.05$ women with HF versus men with HF. **1D:** Quantitative analysis of MMP-2 activities in healthy participants, hypertensive participants and hypertensive participants with coexistent HF, # $p < 0.05$ healthy versus hypertensives and $p < 0.05$ hypertensives versus hypertensives and coexistent HF.

75 361 $\pm$ 11 026 u žien), u pacientov so SZ boli aktivity MMP-2 nižšie u žien v porovnaní s mužmi: 84 891 $\pm$ 17 218 u mužov verzus 74 824 $\pm$ 6 059 u žien (**obrázok 1C**). V aktivitách MMP-9 sme rozdiely medzi ženami a mužmi so SZ, ako aj bez SZ nepozorovali: bez SZ: 120 866 $\pm$ 20 948 u mužov verzus 127 660 $\pm$ 22 019 u žien; so SZ: 129 423 $\pm$ 33 324 u mužov verzus 118 037 $\pm$ 38 263 u žien. Zaujímali sme sa aj o aktivity MMP-2 a MMP-9 vo vzťahu k terapii statínmi, kde sme však nezaznamenali žiadne rozdiely v aktivitách oboch sledovaných MMP medzi pacientmi so SZ bez a s terapiou statínmi: MMP-2: 8 1674 $\pm$ 14 750 bez statínov verzus 74 646 $\pm$ 6 967 so statínmi; MMP-9 124 226 $\pm$ 28 634 bez statínov verzus 120 496 $\pm$ 46 794 so statínmi. Na záver sme účastníkov štúdie rozdelili do troch skupín: zdraví, hypertenzní pacienti a hypertenzní pacienti so SZ. Porovnaním aktivít MMP-2 sme zistili jej nižšie hodnoty u hypertenzných pacientov (67 673 $\pm$ 6 320) v porovnaní so zdravými jedincami (81 164 $\pm$ 8 272), ako aj v porovnaní s hypertenznými pacientmi trpiacimi súčasne SZ (77 432 $\pm$ 7 880) (**obrázok 1D**). Rozdiely v aktivitách MMP-9 sme ani pri tomto rozdelení nezaznamenali (124 514 $\pm$ 25 680

u zdravých, 131 310 $\pm$ 12 172 u hypertenzných, 116 988 $\pm$ 41 656 u hypertenzných so SZ).

Diskusia

Hypertenzia sa považuje za častú príčinu SZ a jeho progresie, avšak vo vzťahu hypertenzie a MMP boli publikované kontroverzné výsledky (6). Naše údaje sú v súlade so štúdiou, ktorá poukázala na znížené plazmatické hladiny MMP-2 u hypertenzných pacientov s hypertrofiou ľavej komory (7). Navyše, všetci pacienti s diagnózou esenciálnej artériovej hypertenzie zaradení do našej štúdie boli liečení počas najmenej troch rokov určitým typom antihypertenznej terapie; preto musíme brať do úvahy aj vplyv antihypertenzív na aktivity MMP. V literatúre sa uvádza, že aktivity a/alebo hladiny MMP-2 môžu byť znížené napríklad po podávaní ACE inhibítorov (8), hydrochlórtiazidu (9) a sartanov (10). Navyše, tlakové preťaženie ľavej komory vyúsťuje do koncentrickej hypertrofie myokardu, ktorá sa spája s akumuláciou ECM. Prechod hypertrofie do SZ je však charakteristický nadmernou aktiváciou MMP (3, 11), čo je

v súlade s výsledkami našej štúdie, pretože sme pozorovali vyššie aktivity MMP-2 u hypertonikov so SZ v porovnaní s hypertonikmi bez SZ.

Voloshenyuk a Gardner (12) poukázali na pozitívny vplyv estrogénovej terapie na expresiu proteínov extracelulárnej matrix v srdci ovariektomizovaných potkanov pri akútnom aj chronickom objemovom preťažení srdca. V súlade s týmto nálezom je naše zistenie, že ženy so SZ mali nižšie aktivity cirkulujúcich MMP-2 v porovnaní s mužmi so SZ, čo poukazuje na zvýhodnenie ženského pohlavia v zmysle zníženej aktivácie MMP-2 pri SZ.

V našej práci sme sledovali aj možný vplyv terapie statínmi na aktivity cirkulujúcich MMP, avšak rozdiely medzi pacientmi užívajúcimi statíny v porovnaní s pacientmi bez statínovej terapie sme nezaznamenali. Podobné výsledky sa pozorovali aj u pacientov s abdominálnou aneuryzmou aorty (13) a u pacientov s koronárnou chorobou srdca (14). Na rozdiel od toho v iných štúdiách sa inhibičný vplyv statínov na aktivity MMP preukázal (15, 16).

Záver

Naša štúdia poukázala na zníženú aktivitu MMP-2 u hypertenzných pacientov v porovnaní so zdravými účastníkmi štúdie ($p = 0,0024$), ako aj v porovnaní s hypertenznými pacientmi, ktorí súčasne trpeli na SZ ($p = 0,018$). Zistili sme tiež nižšiu aktivitu MMP-2 u žien so SZ oproti mužom so SZ ($p = 0,023$). Nezaznamenali sme však celkové rozdiely v aktivitách MMP-2 a MMP-9 u pacientov so SZ a účastníkmi štúdie bez SZ. Korelačný koeficient medzi funkčným štádiom SZ podľa NYHA a aktivitami oboch stanovovaných MMP ($r = 0,23$, $p = 0,2$ pre MMP-2; $r = 0,005$, $p = 0,98$ pre MMP-9) nepoukázal na štatisticky významnú závislosť. Keďže sme nezaznamenali žiadne rozdiely v aktivitách MMP-9 medzi skupinami, aktivity MMP-2 sa preukázali ako citlivejší biomarker odrážajúci najmä pohlavie a prítomnosť antihypertenznej liečby u pacientov so SZ.

Limitáciou našej štúdie je malý počet účastníkov štúdie, ktorý je ďalej roztrieštený na podskupiny a takisto nedostatočná charakteristika súboru pacientov so SZ, ako aj bez neho. Napriek tomu, že naše výsledky poukazujú na rôzne vzťahy medzi aktivitami MMP-2 a hypertenziou, respektíve pohlavím, nedokazujú ich kauzálnu závislosť. Cirkulujúce MMP taktiež môžu pochádzať z rôznych tkanív tela, a preto nemusia odrážať iba zmeny prítomné na srdci.

Na záver by sme chceli konštatovať, že napriek limitáciám štúdie sme poukázali na niektoré nové a zaujímavé skutočnosti súvisiace s aktivitami cirkulujúcich MMP vo vzťahu k pohlaviu, statínovej a antihypertenznej terapii u pacientov so SZ.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0032/14, 2/0108/15 a APVV 0348-12.

Konflikt záujmov

Autori deklarujú, že neexistuje žiadny konflikt záujmov vo vzťahu k tejto práci.

Literatúra

1. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90(5):520-530.
2. Meluzin J, Tomandl J, Podrouzkova H, Gregorova Z, Soska V, Dobsak P, Pecan L, Stepanova R. Can markers of collagen turnover or other biomarkers contribute to the diagnostics of heart failure with normal left ventricular ejection fraction? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013;157(4):331-339.
3. Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006;22 Suppl B:25B-30B.
4. Sanchis L, Andrea R, Falces C, Llopis J, Morales-Ruiz M, López-Sobrinho T, Pérez-Villa F, Sitges M, Sabate M, Brugada J. Prognosis of new-onset heart failure outpatients and collagen biomarkers. *Eur J Clin Invest* 2015;45(8):842-849.
5. Giannakos E, Vardali E, Bartekova M, Fogarassyova M, Barancik M, Radosinska J. Changes in activities of circulating MMP-2 and MMP-9 in patients suffering from heart failure in relation to gender, hypertension and treatment: a cross-sectional study. *Physiol Res* 2016;65(Suppl. 1): S149-S152.
6. Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta* 2012;413(7-8):656-662.
7. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 2006;113(17):2089-2096.
8. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 2000;46(2):298-306.
9. Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, Montenegro MF, Fontana V, Salgado MC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2010;160(1):77-87.
10. Derosa G, Maffioli P, Ferrari I, Palumbo I, Randazzo S, Fogari E, D'Angelo A, Cicero AF. Different actions of losartan and ramipril on adipose tissue activity and vascular remodeling biomarkers in hypertensive patients. *Hypertens Res* 2011;34(1):145-151.
11. Iwanaga Y1, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Apr 17;39(8):1384-1391.
12. Voloshenyuk TG, Gardner JD. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts

- of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299(2):R683-693.
13. Muehling B, Oberhuber A, Schelzig H, Bischoff G, Marx N, Sunder-Plassmann L, Orend KH. Effect of statin therapy on serum activity of proteinases and cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(6):1433-1437.
14. Bencsik P, Sasi V, Kiss K, Kupai K, Kolossváry M, Maurovich-Horvat P, Csont T, Ungi I, Merkely B, Ferdinandy P. Serum lipids and cardiac function correlate with nitrotyrosine and MMP activity in coronary artery disease patients. *Eur J Clin Invest* 2015;45(7):692-701.
15. Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015;19(14):2583-2589.
16. Sapienza P, Borrelli V, Sterpetti AV, Biacchi D, Venturini L, Tartaglia E, Bononi M, Di Marzo L. Statins reduce levels of metalloproteinases in patients with carotid occlusive disease. *Int Angiol* 2014;33(6):530-539.