

بررسی نقش ماتریکس متالوپروتئینازهای ۱، ۲، ۳ و ۹ در انفارکتوس قلبی حاد

نویسندگان: اکرم سادات طباطبائی پناه^۱، رضا اکبرزاده^۲، زهره خدایی^۳، سید محمد حسین قادریان^{*۲}

۱. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شرق، تهران، ایران.
۲. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی البرز، البرز، ایران.

* نویسنده مسئول: سید محمد حسین قادریان E-mail: sghaderian@yahoo.co.uk

چکیده

مقدمه و هدف: شواهد موجود نشان می‌دهد که تغییرات ماتریکس خارج سلولی (ECM) در پی انفارکتوس قلبی حاد (AMI) ایجاد شده و آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMP) نقش مهمی در ایجاد آترواسکلروزیس، انسداد و انفارکتوس قلبی ایفا می‌کند. اهمیت مهار تغییرات ECM و آسیب‌های بعدی در بیماران مبتلا به ANI نشان‌دهنده نقش احتمالی MMP در این بیماری است؛ بنابراین در این مطالعه، فعالیت MMP-1، 2، 3 و 9 که احتمالاً نقش مهمی در AMI ایفا می‌کنند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: پلاسما و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، ۲۴ ساعت پس از آغاز AMI از خون ۵۰ فرد مبتلا به AMI و ۵۰ نفر سالم مشابه آن‌ها استخراج گردید. فرم فعال MMPs با روش‌های الیزا، حضور این پروتئین‌ها با روش ایمونوبلاتینگ و ارزیابی زایموگرافی و همچنین بیان mRNA توسط Real-time RCR اندازه‌گیری گردید.

نتایج: غلظت پلاسمایی پروتئین‌های MMPs در بیماران نسبت به کنترل افزایش نشان داد. با روش وسترن بلات و بیان ژن MMPs با روش PCR در دو گروه نتایج مشابهی نشان داد. در روش زایموگرافی نیز وزن‌های مولکولی ۴۳، ۶۶، ۴۵ و ۸۳ کیلودالتون نشان‌دهنده به ترتیب MMP-1، MMP-2، MMP-3 و MMP-9 در بیماران و گروه کنترل بود. ژن‌های این پروتئین‌ها در افراد مبتلا به AMI، نسبت به گروه کنترل افزایش نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین بررسی ژن و پروتئین MMPs و همچنین غلظت MMP پلاسمایی در افراد مبتلا به AMI و گروه کنترل بود. به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت MMP در مبتلایان به AMI رخ داده و عدم افزایش بیان ژنی، نشان‌دهنده تنظیم پروتئین در سطح پس از رونویسی می‌باشد.

واژگان کلیدی: متالوپروتئیناز، انفارکتوس قلبی حاد، Real-time RCR

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و سوم- شماره ۱۲۲
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۷

مقدمه

انفارکتوس قلبی حاد (AMI) یکی از مهم‌ترین دلایل ایجاد بیماری و مرگ‌ومیر در انسان است. یکی از نگرانی‌ها و دغدغه‌های بیماران مبتلا به AMI و متخصصین قلب و عروق، بروز MI مجدد و عوارض ناشی از آن می‌باشد. یکی از مهم‌ترین نتایج AMI، پیشرفت تغییر شکل شدید ECM می‌باشد. برخی از MMPs، آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند که قادر به تخریب پروتئین‌های ECM هستند. اعتقاد بر این است که MMP باعث تغییر شکل ماتریکس قلبی و عروقی در طی فرایندهای بیولوژیکی طبیعی می‌شود. افزایش بیان کلاژناز درون‌شبه‌کای (MMP-1)، مسئول تغییرات در ساختار ECM قلبی است (۱). ژلاتیناز A (MMP-2) باعث تخریب کلاژن نوع IV که یکی از ترکیبات مهم غشاء پایه است، می‌شود. استرومیسین-۱ (MMP-3)، وسیع‌ترین سوبسترا است و شامل همه کلاژن‌های رشته‌ای و ترکیبات غشاء پایه می‌شود (۵-۲). ژلاتیناز B (MMP-9) در پیشرفت بیماری قلبی عروقی در انسان دخیل است. تغییر در فعالیت و بیان اعضای خانواده MMP در بافت‌های قلبی عروقی، در پیشرفت بیماری‌های قلبی عروقی مانند انفارکتوس قلبی، آسیب ایسکمی-رپرفیوژن و نارسایی قلبی و همچنین فرایند تغییر شکل ماتریکس تا تشخیص پس از رخداد AMI دخیل است. فعالیت MMPs در سطح رونویسی، ترجمه و پس از رونویسی تنظیم می‌شوند. در این مطالعه، بیان ژن، پروتئین MMP-1، 2، 3، 9 و در بیماران ایرانی مبتلا به AMI در مقایسه با افراد کنترل، بررسی شد. درک بیشتر نقش MMPs ممکن است باعث تشخیص بهتر درمورد بیماران در خطر نتایج ناسازگار پس از رخداد AMI شود. بنابراین، در این مطالعه بر روی تولید MMPs فعال پس از رخداد AMI تمرکز شد. همچنین سطوح MMP در حال گردش و تولید MMPs توسط PBMCs که یک منبع محتمل MMPs در AMI در بیماران ایرانی است، اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

در این مطالعه، از ۵۰ بیمار مبتلا به AMI به روش هم‌گروهی تاریخی بین سال‌های ۸۸ تا ۹۰ استفاده شد. از ۶۵ بیمار غربال‌شده، متعاقباً ۵۹ نفر ثبت‌نام شدند. سه بیمار از ثبت‌نام در این مطالعه امتناع کردند و دو بیمار به علت فقدان اطلاعات آماری، از مطالعه خارج شدند. چهار بیمار هم به علت پردازش نامناسب نمونه‌های آزمایشگاهی از مطالعه کنار گذاشته شدند. همه بیماران مورد ارزیابی اطلاعات اولیه، برای ارائه و تخمین فوری قبل از شروع کار آزمایشگاهی قرار گرفتند. در این مطالعه، همچنین از ۵۰ فرد کنترل هم نمونه‌گیری شد. همه نمونه‌ها توسط کادر پرستاری بیمارستان شهید مدرس در تهران جمع‌آوری شد. اطلاعات فرم‌ها و نحوه و علت استفاده از نمونه‌ها توسط افراد بیمار و کنترل تأیید شد. همچنین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، بر نمونه‌گیری و فرم اطلاعات و روش‌های انجام‌شده، نظارت داشت.

جمع‌آوری خون و جداسازی PBMCs

در این مطالعه، نمونه‌های خون محیطی از بیماران در طی ۲۴ ساعت اولیه پس از رخداد AMI، برای بررسی سطوح پلازما MMPs جمع‌آوری شد. این نمونه‌های خون همچنین برای بررسی ژن و پروتئین MMPs مورد استفاده قرار گرفتند. پلازما توسط سانتریفیوژ نمونه‌های خونی به دست آمده و در ۸۵- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. PBMCs از دهندگان خون توسط سانتریفیوژ گرادیان دانسیته بر روی فایکول (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) برای بررسی بیان ژن و پروتئین MMPs جدا شد.

اندازه‌گیری سطوح پلازما MMPs

غلظت‌های MMPs در پلازما با استفاده از کیت‌های الایزا (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) که قبلاً گزارش شده است (۶)، به دست آمد. اندازه‌گیری بر طبق دستورالعمل کیت انجام شد. ضمناً

¹. Stromelysin-1

پروتئین‌ها توسط الکتروفورز از طریق یک ژل پلی‌آکریل آمید (PAGE) شامل ۰/۵ درصد ژلاتین جدا شدند. پس از ۹۰ دقیقه الکتروفورز، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (RT) در ۳۰ میلی‌لیتر ۲/۵٪ Triton x-100 با مقداری حرکت انکوبه شد. ژل شسته شد و در بافر گسترش‌دهنده (5 mM Tris [pH7.6], 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 5 μM ZnCl₂) یک‌بار به مدت ۳۰ دقیقه در RT بر روی یک شیکر در حال حرکت و سپس در طول یک شب در ۳۷°C انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ژل برای ۱۰ دقیقه با کوماسی بلو G ۰/۵ درصد در اتانول ۳۰ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد که تازه آماده شده بود، رنگ‌آمیزی و در آب مقطر به مدت یک شب، رنگ‌بری شد. نهایتاً ژل به مدت ۳۰ دقیقه در متانول ۴۵ درصد و گلیسرول ۵ درصد، قبل از خشک‌شدن به مدت یک شب انکوبه شد. فعالیت پروتئولیتیک توسط فقدان رنگ‌آمیزی در مناطق ژل که در آن سوبسترای پروتئینی (ژلاتین) تخریب شده است، مشاهده شد و توسط دانسیتومتری (Herolab Imaging system, Wiesloch, Germany) کمی شد. درصد فعالیت ژلاتینولیتیک یک نمونه، به‌عنوان مقدار دانسیته نوری دلخواه نمونه با مقدار دانسیته نوری یک نمونه کنترل مقایسه شد. ژل توسط همه آزمایش‌ها که به شکل سه‌تایی انجام شد، ارزیابی گردید.

ارزیابی بیان پروتئین MMPs

عصاره‌های پروتئینی PBMCs جمع‌آوری شده از نمونه‌های بیمار و کنترل برای ارزیابی وسترن بلاتینگ استفاده شد. SDS-PAGE توسط روش Lammeli (۱۱) و وسترن بلاتینگ با استفاده از روش Towbin و همکاران (۱۲) انجام شد. پروتئین‌های لیز شده کل توسط همگن کردن سلول‌ها در بافر RIPA بسیار سرد (PBS with 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM NP40, PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride), 10 mg/ml of 10 mg/ml of aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, and 10 leupeptin, mM NaF; Sigma) آماده شد. سطوح پروتئینی با استفاده از آزمایش Bradford (۱۳) اندازه‌گیری شد. پروتئین‌ها توسط SDS-PAGE جداسازی شده و بر روی غشاء نیتروسولوز (Sigma) بلات گردید. پس از اینکه انتقال

به‌منظور اطمینان از یافته‌ها، آزمون از هر نمونه، سه‌بار صورت گرفت.

Real time- RT RCR

بیان ژن برای MMP-1، -2، -3، و -9 و همچنین ژن سرای گردان^۱ گلیسر آلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) ارزیابی شد. mRNA از PBMCs جدا شد و به cDNA با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس (Sigma) طبق دستورالعمل کیت، تبدیل شد. تولید cDNA با توجه به نحوه دستورالعمل کیت (Invitrogen, California, USA) با استفاده از پرایمرهای الگو- dT Real time- RT RCR توسط MMPs mRNA بیان (Invitrogen) Taqman q-PCR با استفاده از آزمایش شد. توالی پرایمر و پروب در جدول ۱ خلاصه شده است. انتهای ۳' و ۵' هر پروب به ترتیب با ۶- کربوکسی-فلوئورسین^۲ (FAM) و رنگ خاموش‌کننده ۶- کربوکسی تترامیتیل رودامین^۳ (TAMRA) نشان‌گذاری شد. توالی‌های پروب و پرایمر از توالی‌هایی که از قبل منتشر شده است، به دست آمد (۹-۷). PCR دو مرحله‌ای به شکل زیر انجام شد: (a): ۹۵°C به مدت ۱۲ دقیقه (۱ چرخه)، (b): ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و (c): ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه (۴۰ چرخه). همه نمونه‌ها با GAPDH، مقایسه گردیدند. در انتهای PCR، مقادیر پایه و آستانه با استفاده از نرم‌افزار ABI 7500 prime منتشر شد و مقادیر ct به مایکروسافت اکسل برای ارزیابی منتقل گردید.

ارزیابی ژلاتین زایموگرافی درمورد ترشح MMP توسط سلول‌های PBMCs

رديابی شکل‌های فعال MMPs توسط زایموگرافی، همان‌طوری که در مطالعات گذشته (۱۰) توصیف شده است، به‌همراه تغییراتی در آن بررسی شد. نمونه‌ها برای بررسی توسط رقیق کردن در یک بافر (۴x) شامل 0.4 M Tris (pH 6.8), 5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, and 0.02% bromophenol blue آماده شد.

1. Housekeeping

2. 6-carboxy-fluorescein

3. 6-carboxytetramethylrhodamine

کامل شد، غشاء توسط پانسواس (Merck) رنگ آمیزی شد. سپس غشاء با استفاده از PBS شامل ۲BSA % رنگ آمیزی شده و در محلول ۱BSA % شامل آنتی بادی منوکلونال Mouse anti human MMP-1,2,3,9 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) با رقت ۱:۵۰۰ به مدت ۹۰ دقیقه در RT با حرکت آرام انکوبه شد. پس از سه بار شستشو با PBS-Tween به مدت ۱۰ دقیقه، انکوباسیون با

۳۰ (Dako) anti mouse Ig-HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در RT انجام شد. برای ردیابی باند، از محلول ۳،۳- در آمینو بنزیدین-تتراهیدروکلرید (Roche,DAB) استفاده شد و انکوباسیون ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

جدول ۱. پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در بیان mRNA توسط real time RT-PCR.

ژن‌ها	جهت	توالی
MMP-1	Forward	5'-GAGGGTCAAGCAGACATCATGA-3'
	Reverse	5'-CAAGATTCCTCCAGGTCCATC-3'
	Probe	5'-FAM-TGTCAGGGGAGATCATCGGGACAA-TAMRA-3'
MMP-2	Forward	5'-TTCCTGGGCAACAAATATGAGA-3'
	Reverse	5'-TGGTCGCACACCACATCTTT-3'
	Probe	5'-FAM-AGCGCCGGCCGCAGTGA-TAMRA-3'
MMP-3	Forward	5'-TTCCTGATGTTGGTCACTTCAGA-3'
	Reverse	5'-CCTGTATGTAAGGTGGGTTTTCCT-3'
	Probe	5'-FAM-CCTTTCCTGGCATCCCGAAGTGG -TAMRA-3'
MMP-9	Forward	5'-CCCTGGAGACCTGAGAACCA-3'
	Reverse	5'-AACCATAGCGGTACAGGTATTCCT-3'
	Probe	5'-FAM-TCTCACCGACAGGCAGCTGGCA-TAMRA-3'
GAPDH	Forward	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'
	Reverse	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
	Probe	5'-FAM-CCGACTCTTGCCCTTCGAAC-TAMRA-3'

ارزیابی آماری

ارزیابی آماری اطلاعات توسط SPSS نسخه ۱۶، برنامه نرم افزار آماری و آزمون t انجام شد و دو گروه بیمار و کنترل با هم مقایسه گردید. یک P value کمتر از ۰/۰۰۱ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

خصوصیات آماری

در این مطالعه، ۵۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدرس تهران و ۵۰ نفر کنترل بررسی شدند. اطلاعات آماری در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. توزیع افراد مورد بررسی برحسب خصوصیات و به تفکیک گروه.

بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد N=۵۰	افراد سالم (کنترل) N=۵۰	خصوصیات	
		گروه	جنس
۳۸	۲۵	مرد	جنس
۱۲	۲۵	زن	
۳۸	۳۴	بیشتر از ۴۵	سن
۱۲	۱۶	کمتر از ۴۵	
۳۸	۱۲	بله	اعتیاد به سیگار
۱۲	۲۹	خیر	
۳۵	۱۴	بله	افزایش کلسترول
۱۵	۳۶	خیر	
۳۴	۱۰	بله	افزایش فشار خون
۱۶	۴۰	خیر	
۳۳	۲۲	بله	دیابت
۱۷	۲۸	خیر	
۴۱	۱۲	بله	نارسایی قلبی قبلی
۸	۳۸	خیر	
۲۸	۱۱	بله	تاریخچه خانوادگی نارسایی قلبی
۲۲	۳۹	خیر	
۴۲	۲۶	بله	استرس
۸	۲۴	خیر	
۶	۵۰	بله	مصرف الکل
۴۴	۰	خیر	
۳۳	۵	بله	مصرف آسپیرین
۱۷	۴۵	خیر	
۲۶	۴	بله	مسدودکننده‌های بتا
۲۴	۵۶	خیر	

سطوح MMP پلاسما

نتایج الیزا نشان داد که همه سطوح MMP پلاسما پس از رخداد AMI افزایش یافت و این مقادیر به طور معنی‌داری بیشتر از افراد کنترل بود. در مقایسه با افراد

جدول ۳. میزان پروتئین‌های MMP-۱، ۲، ۳ و ۹ در روش الیزا به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه.

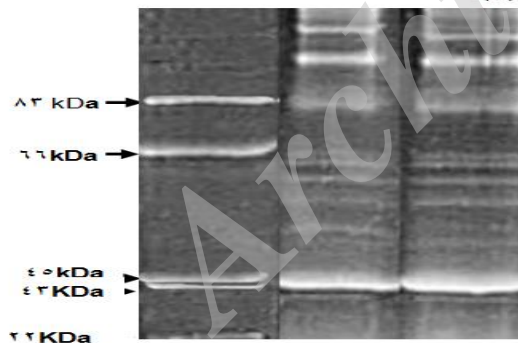
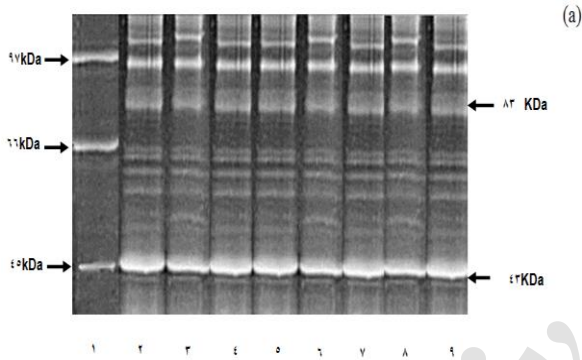
سطح MMP-9 (ng/ml)	سطح MMP-3 (ng/ml)	سطح MMP-2 (ng/ml)	سطح MMP-1 (ng/ml)	شاخص گروه
۱/۶۶±۰/۵۵	۱/۰۰±۰/۱۷	۱/۳۲±۰/۱۳	۱/۱۱±۰/۱۷	افراد سالم (کنترل) N=۵۰
۱۵/۴۵±۳/۱۹	۴/۱۸±۱/۰۳	۳/۰۴±۱/۱۱	۷/۰۰±۱/۸۴	بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد N=۵۰
P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	نتیجه آزمون آماری

بیان MMPS mRNA

تعیین کمی بیان mRNA در PBMCs توسط Real-time RT-PCR آشکار کرد که هیچ تفاوت معنی‌داری در بیان همه MMPهای ذکر شده بین بیماران مبتلا به AMI و افراد کنترل نبود، به جز بیان MMP-1 در دو بیمار مبتلا به AMI، هیچ تفاوتی بین بیان MMP-1، ۲ و ۳ در هیچ نمونه AMI در مقایسه با افراد کنترل ردیابی نشد. mRNA

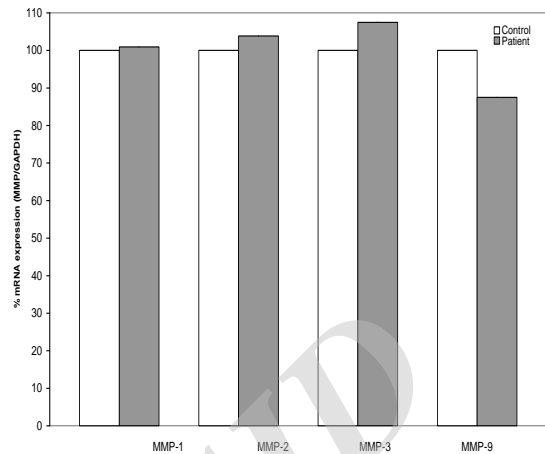
ژلاتین، مربوط به MMP-1، 2، 3، و 9 بر روی ژل زایموگرافی نمونه‌های AMI اثبات شد (شکل ۲، lanes ۲-۵)، حضور این پروتئین‌ها توسط ارزیابی وسترن بلائینگ تأیید گردید (شکل ۴). باندهای به دست آمده توسط ژل زایموگرافی توسط دستگاه دانسیتومتر کمی شد. نتایج نشان می‌دهند که MMP غالب در نمونه‌های AMI MMP-9 بود؛ اما تفاوت معنی‌داری بین شدت باندها در MMP-1، 2، و 3 مقایسه نشد.

مقایسه بین بیماران مبتلا به AMI و افراد کنترل، اثبات کرد که در بیماران، فعالیت MMP-9، 1، 3، و 2 به ترتیب ۱۳، ۶، ۴ و ۳/۵ برابر بیشتر از افراد کنترل بود (شکل ۳).



شکل ۲. ژل زایموگرافی بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و افراد کنترل. (a) مارکر وزن مولکولی به طور موازی بارگذاری شده است. مارکر وزن مولکولی [Mw] Broad Range Marker; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, (USA) در شکل ۱، چهار نمونه بیمار در ردیف‌های ۲ تا ۵ و نمونه‌های افراد کنترل در ردیف‌های ۶ تا ۹ نشان داده شده است. (b) کنترل‌های مثبت تجاری MMP، یک نمونه بیمار مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و یک نمونه کنترل به ترتیب در ردیف‌های ۱، ۲ و ۳ بارگذاری شده است.

MMP-9 فقط مقداری قابل ردیابی بود و افزایش در بیان نمی‌توانست در بیماران ردیابی شود (شکل ۱).



شکل ۱. بیان mRNA مربوط به MMPهای ۱، ۲، ۳ و ۹ real time RT-PCR (MMP/GAPDH) به دست آمده توسط (mean بیمار مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و ۵۰ افراد کنترل \pm SEM). هیستوگرام‌های مقایسه‌کننده بین بیماران و افراد کنترل به شکل درصد بیان mRNA (MMP/GAPDH) بیماران نسبت به افراد کنترل بیان شده‌اند (کنترل‌ها، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده‌اند).

نتایج زایموگرافی و وسترن بلائینگ MMPs

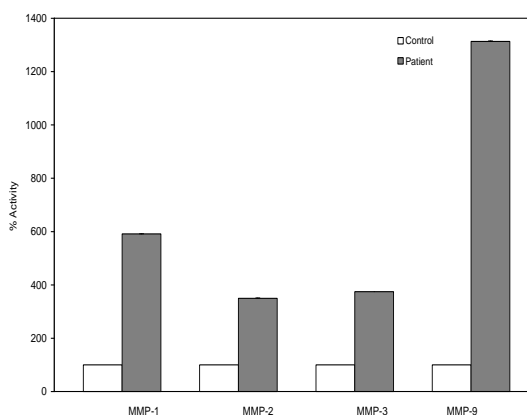
زایموگرافی و وسترن بلائینگ سلول‌های لیز شده PBMCs برای محتوای MMPs مربوط به سلول انجام شد. چهار باند فعالیت تجزیه‌کننده ژلاتین، با وزن‌های مولکولی ۴۳، ۶۶، ۸۳ و ۸۳ کیلو دالتون بر روی ژل زایموگرافی نمونه‌های افراد کنترل مشاهده شد که به ترتیب وزن‌های مولکولی مربوط به MMP-1، 2، 3، و 9 فعال می‌باشد (شکل ۲، lanes ۲-۹).

باندهای به دست آمده توسط ژل زایموگرافی توسط دستگاه دانسیتومتر کمی شد. نتایج توصیف شده در شکل ۳ نشان می‌دهند که MMP غالب در نمونه‌های کنترل MMP-2 (۶۶ کیلو دالتون) بود و بعد از آن با شدت‌های کمتر، MMP-3، 9 و 1 قرار داشتند ($P < 0.001$). عصاره‌های سلولی شامل MMP-1 ۴۳ کیلو دالتونی، MMP-2 ۶۶ کیلو دالتونی، MMP-3 ۴۵ کیلو دالتونی و MMP-9 ۸۳ کیلو دالتونی توسط وسترن بلائینگ تأیید شدند (شکل ۴).

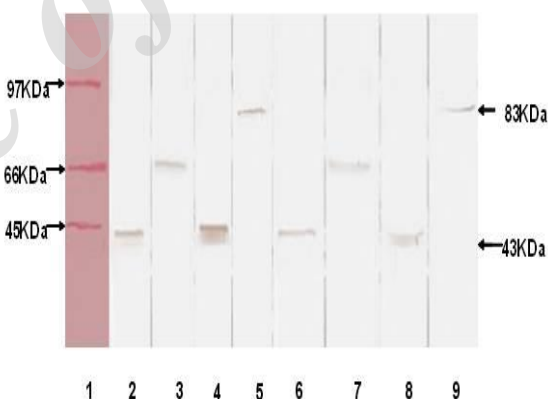
هرچند، چهار باند مهم فعالیت تجزیه‌کننده

پیشنهاد می‌کند که MMPs مختلف ممکن است نقش‌های متفاوتی در AMI داشته باشند. برخی از مطالعات، افزایش بیان و فعالیت MMP-1، -2، -3، و -9 را در قلب انسان، موش و خوک در طی فرایندهای تغییر شکل پس از MI نشان دادند (۱۹-۱۴). علی‌رغم گوناگونی اطلاعات در مورد زمان قطعی فعالیت MMP پس از انفارکتوس قلبی، روشن شده است که فعالیت MMP سریع و کمتر از یک روز پس از MI آغاز می‌شود (۱۶). با توجه به این مسئله، به دلیل اطمینان از تغییرات در فعالیت MMPs، در این مطالعه نمونه‌ها ۲۴ ساعت پس از رخداد AMI جمع‌آوری شد. براساس اطلاعات ما، این اولین مطالعه بر روی MMPs بر روی جمعیت ایرانی مبتلا به AMI است که در آن سطوح بیان ژن و پروتئین توسط روش‌های کمی و کیفی بررسی شده است.

این مطالعه نشان داد که MMP-9 ممکن است نقش فیزیولوژیک و پاتولوژیک مهمی در طی مرحله ابتدایی AMI تا نارسایی قلبی داشته باشد. ما در این مطالعه اثبات کردیم که غلظت‌های پلاسما و فعالیت MMP-9 در اولین ۲۴ ساعت پس از رخداد AMI افزایش پیدا کرد. در مطالعات گذشته، نقش مهم MMPs در AMI تنظیم متفاوت این پروتئین‌ها در طی مرحله ابتدایی اثبات کرده است (۲۴-۲۰) و MMP-2 آسیب رپر فیوژن را ایسکمی قلبی و رپر فیوژن در مدل موشی تنظیم می‌کند (۲۵). نتایج ما، تفاوت‌های معنی‌داری بین سطوح MMP فعال بین بیماران در مقایسه با افراد کنترل به اثبات رساند. با توجه به این مسئله، به دلیل اینکه القاء MMP به دنبال MI باعث بهبود انفارکتوس، تخریب ماتریکس، هم‌ترازی سلول قلبی، تمامیت ساختار قلبی و تغییر شکل بطنی می‌شود (۲۸-۲۶)، ممانعت از فعالیت پروتئولیتیک MMP به عنوان یک هدف درمانی در بیماری‌های مختلف مثل نارسایی قلبی پیشنهاد می‌شود (۲۸، ۲، ۳۵). سطوح سرم و پلاسمای MMPs مربوط به آسیب قلبی می‌تواند به صورت بالقوه، هم برای تشخیص بیماری پنهان و هم برای پیش‌گهی نتایج بالینی استفاده شود.



شکل ۳. دانسیتومتری باندهای MMPهای ۱، ۲، ۳، و ۹ فعال به دست آمده توسط ژل زایموگرافی (شکل ۲ را ببینید) ۵۰ بیمار بیمار مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و ۵۰ افراد کنترل (mean ± SEM). هیستوگرام‌های مقایسه‌کننده بین بیماران و افراد کنترل به شکل درصد فعالیت ژلاتینولیتیک بیماران نسبت به افراد کنترل بیان شده‌اند (کنترل‌ها، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده‌اند). $P < .001$ *



شکل ۴. وسترن بلائینگ MMP ۱، ۲، ۳ و ۹ در نمونه‌های بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و افراد کنترل. ردیف ۱، مارکر وزن مولکولی، ردیف‌های ۲ تا ۵، نمونه‌های بیماران و ردیف‌های ۶ تا ۹، نمونه‌های افراد کنترل است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، غلظت‌های پلاسما MMPs گوناگون در بیماران مبتلا به AMI و افراد کنترل ارزیابی شد و تفاوت‌های معنی‌داری در غلظت‌های پلاسما بین گروه‌های MMP-1، -2، -3، و -9 به دست آمد. تمام غلظت‌های MMP پلاسما به طور معنی‌داری در بیماران به حالت‌های مختلفی افزایش پیدا کرد. این مسئله

در نمونه‌های نارسایی قلبی یافتیم، اما هیچ تفاوتی در بیان mRNA آن‌ها یافت نشد، نشان می‌دهد که فعالیت MMPs در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌گردد.

به دلیل نقش‌های متفاوت و مهم MMPs در میوکاردیوم و اهداف مهم درمانی نارسایی قلبی، در این مطالعه سطوح افزایش‌یافته MMP پلاسما و تولید توسط PBMCs در بیماران ایرانی مبتلا به AMI اثبات شد. این تغییرات ممکن است بر تغییر شکل بطنی که پس از AMI رخ می‌دهد، اثر بگذارد. افزایش برخی از MMPs مثل افزایش در فعالیت و سطوح MMP-9 می‌تواند به‌عنوان یک مارکر تشخیصی در پیشرفت نارسایی قلبی در بیماران پس از MI استفاده شده و همچنین می‌تواند تفاسیری در مورد بیماری‌زایی پس از MI تا نارسایی قلبی فراهم سازد.

این مطالعه، اولین بررسی ژن و پروتئین MMPs و همچنین غلظت MMP پلاسمایی در افراد مبتلا به AMI و گروه کنترل بود. به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت MMP در مبتلایان به AMI رخ داده و عدم افزایش بیان ژنی نشان‌دهنده تنظیم پروتئین در سطح پس از رونویسی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه، توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی سرمایه‌گذاری شده است که از این طریق، از آن‌ها قدردانی به‌عمل می‌آید. همچنین از پرسنل بیمارستان شهید مدرس به‌خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های بیماران تشکر می‌شود.

منابع

1. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000;106:857-66.
2. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal*. 1991;5:2145-54.
3. Nagase H, Engild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry*. 1990;29:5783-89.

MMPs قلبی توسط سلول‌های شبه فیروپلاست، سلول‌های التهابی و کاردیومیست‌ها تولید می‌شوند (۱۴،۳۶) که به‌طور برجسته به شکل نهفته‌شان وجود دارند (۳۷). هرچند، بیان اکثر MMPs عموماً در سطوح کمی در سلول‌ها و بافت‌های طبیعی افراد بالغ یافت می‌شود، اما بیان و فعالیت آن‌ها در طی فرایندهای تغییر شکل فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی خاص افزایش پیدا می‌کند. بیان mRNA MMP-9 در این مطالعه، ردیابی نشد که این مسئله، حضور مکانیسم‌های تنظیمی اضافی را در نارسایی میوکاردیوم پیشنهاد می‌کند. بیان کم mRNA MMP-9 در AMI در مقایسه با افراد کنترل در تقابل با مقدار زیاد MMP-9 فعال که با الیزا و ژل زایموگرافی اندازه‌گیری شده بودند، قرار می‌گیرد. بنابراین، اگرچه تنظیم رونویسی برای تولید MMP مهم است، تخریب ماتریکس نیاز به آنزیم‌های نهفته دارد تا توسط شکافت پروتئولیتیک فعال شود (۳۸) و سنتز شبانه‌روزی MMP با پیش‌آنزیم‌های غیرفعال، دلالت بر یک عدم توازن زمانی بین سنتز و فعالیت MMP دارد (۲۳-۳۹).

در سال‌های اخیر، تحقیقات بیولوژی ماتریکس شامل تغییر شکل قلبی به‌دنبال AMI شده است. اتساع بطن چپ به‌دنبال MI به ایسکمی و بهبود متعاقب انفارکتوس و بافت‌های اطراف مربوط است (۴۰). به دلیل این اثر بر روی تغییر شکل بطن چپ، بیان mRNA و پروتئین MMPs در بیماران مبتلا به AMI در مقایسه با افراد کنترل بررسی شد. افزایش بیان پروتئین MMP در زایموگرافی که در PBMCs یافت شد، با بیان mRNA تطابق پیدا نکرد. این واقعیت که ما افزایش بیان پروتئین MMP را

4. Okada Y. Proteinases and matrix degradation in: Harris ED Jr, Budd RC, Genovese MC, Firestein GS, Sargent JS (ed) *Kelly's textbook of rheumatology*, 8th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia. 2009;115-34.
5. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochemistry Journal*. 1987;248:265-8.
6. Ikeda U, Shimpo M, Ohki R, Inaba H, Takahashi M, Yamamoto K, Shimada K. Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human

- vascular endothelial cells. *Hypertension*. 2000;36:325-9.
7. Jordan RCK, Macabeo-Ong M, Shiboski CH, Dekker N, Ginzinger DG, Wong DTW, Schmidt BL. Overexpression of Matrix Metalloproteinase-1 and -9 mRNA Is Associated with Progression of Oral Dysplasia to Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:6460-5.
 8. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. Matrix Metalloproteinase-3 Genotype Contributes to Age-Related Aortic Stiffening Through Modulation of Gene and Protein Expression. *Circulation Research*. 2003;92:1254-61.
 9. Weglarz L, Molin I, Orchel A, Parfiniewicz B, Dzierżewicz Z. Quantitative analysis of the level of p53 and p21WAF1 mRNA in human colon cancer HT-29 cells treated with inositol hexaphosphate. *Acta Biochimica Polonica*. 2006;53:349-56.
 10. Kleiner DE, Stetlerstevenson WG. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry*. 1994;218:325-9.
 11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
 12. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:4350-4.
 13. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-54.
 14. J Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1995;27:1281-92.
 15. Tyagi SC, Kumar SG, Haas SJ, Reddy HK, Voelker DJ, Hayden MR, et al. Post-transcriptional regulation of extracellular matrix metalloproteinase in human heart end-stage failure secondary to ischemic cardiomyopathy. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1996;28:1415-28.
 16. Herzog E, Gu A, Kohmoto T, Burkhoff D, Hochman J. Early Activation of Metalloproteinases after Experimental Myocardial Infarction Occurs in Infarct and Non-infarct Zones. *Cardiovascular Pathology*. 1998;7:307-12.
 17. Carlyle WC, Jacobson AW, Judd DL, Tian B, Chu C, Hauer KM, et al. Delayed reperfusion alters matrix metalloproteinase activity and fibronectin mRNA expression in the infarct zone of the ligated rat heart. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1997;29:2451-63.
 18. Sato S, Ashraf M, Millard RW, Fujiwara H, Schwartz A. Connective tissue changes in early ischemia of porcine myocardium: an ultrastructural study. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1983;15:261-75.
 19. Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1998;30:1431-42.
 20. Etoh T, Joffs C, Deschamps AM, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, et al. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *American Journal of Heart Circulation Physiology*. 2001;281:H987-94.
 21. Kaden JJ, Dempfle CE, Sueselbeck T, Brueckmann M, Poerner TC, Haghi D, et al. Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction. *Cardiology*. 2003;99:140-4.
 22. Lu L, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galardy RE, et al. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *American Journal of Heart Circulation Physiology*. 2000;279:H601-9.
 23. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovascular Research*. 2000;46:307-15.
 24. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sciences*. 2001;68:799-814.
 25. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000;101:1833-9.
 26. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *Journal of Molecular Cell Cardiology*. 1994;26:279-92.
 27. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 1999;99:3063-70.
 28. Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, et al. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. *Circulation Research*. 1999;85:364-76.
 29. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovascular Research*. 2000;46:225-38.
 30. Yip D, Ahmad A, Karapetis CS, Hawkins CA, Harper PG. Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology. *Investigation of New Drugs*. 1999;17:387-99.
 31. Moore G, Liao S, Curci JA, Starcher BC, Martin RL, Hendricks RT, et al. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms by systemic treatment with a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor (RS 132908). *Journal of Vascular Surgery*. 1999;29:522-32.
 32. Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents

- progression, of vascular disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105:21-34.
33. Jimenez RE, Hartwig W, Antoniu BA, Compton CC, Warsaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control. *Analytical Surgery*. 2000;231:644-54.
34. Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez JM. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Pharmacology*. 2000;60:269-74.
35. Haq M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. Addition of Matrix Metalloproteinase Inhibition to Conventional Cytotoxic Therapy Reduces Tumor Implantation and Prolongs Survival in a Murine Model of Human Pancreatic Cancer. *Cancer Research*. 2000;60:3207-11.
36. Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *American Journal of Physiology*. 1999;277:H777-87.
37. Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clinical Biochemistry*. 1993;26:191-8.
38. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry*. 1997;378:151-60.
39. Grant GM, Cobb JK, Castillo B, Klebe RJ. Regulation of matrix metalloproteinases following cellular transformation. *Journal of Cell Physiology*. 1996;167:177-83.
40. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *American Journal of Physiology*. 1991;260:H1406-14.

Archive of SID