

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Μεταβολές των επιπέδων των μεταλλοπρωτεϊνών πλάσματος και των ιστικών αναστολέων τους σε ασθενείς με συγκαλυμμένη υπέρταση\*

**Σ. Σπυρόπουλος<sup>1</sup>**  
**Δ. Παπαδόπουλος<sup>1</sup>**  
**Δ. Περρέα<sup>3</sup>**  
**Η. Σανίδας<sup>1</sup>**  
**Α. Μπράτσας<sup>2</sup>**  
**Ο. Παπαζάχου<sup>2</sup>**  
**Θ. Μακρής<sup>2</sup>**  
**Β. Βοττιάς<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Καρδιολογική Κλινική, ΠΓΝΑ «Λαϊκό»  
<sup>2</sup> Καρδιολογικό Τμήμα, ΓΝΑ «Ελενα Βενιζέλου»  
<sup>3</sup> Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας Πανεπιστημίου Αθηνών

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε τις μεταβολές της αποσύνθεσης του κολλαγόνου σε ασθενείς με συγκαλυμμένη υπέρταση (ΣΥ), τη συσχέτιση των μεταβολών αυτών με διαταραχές της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος και να συγκρίνουμε τα ευρήματα με εκείνα ατόμων με φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης, μετά από προσαρμογή για ηλικία, φύλο και δείκτη μάζας σώματος (BMI, body mass index). Μελετήθηκαν 24 ασθενείς (11 άνδρες, 13 γυναίκες) με ΣΥ, μέσης ηλικίας  $46 \pm 7$  έτη και BMI  $25.9 \pm 2.1$  Kg/m<sup>2</sup> (ομάδα Α) και 106 υγιείς νορμοτασικοί (49 άνδρες, 57 γυναίκες) με φυσιολογική αρτηριακή πίεση μέσης ηλικίας  $44 \pm 6$  και BMI  $25.5 \pm 2.4$  Kg/m<sup>2</sup> (ομάδα Β), χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου ή σακχαρώδη διαβήτη. Οι συγκεντρώσεις πλάσματος της μεταλλοπρωτεϊνάσης στρώματος-9 (MMP-9) και των ιστικών αναστολέων της (TIMP-1 και TIMP-4) μετρήθηκαν με την αντίστοιχη μέθοδο ELISA. Τα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 ήταν σημαντικά υψηλότερα, ενώ τα επίπεδα των TIMP-1 και TIMP-4 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα Α σε σύγκριση με την ομάδα Β (MMP-9  $569 \pm 135$  έναντι  $282 \pm 117$  ng/ml, TIMP-1  $1169 \pm 42$  έναντι  $230 \pm 37$  ng/ml,  $p < 0.01$ , TIMP-4  $2.1 \pm 1.3$  έναντι  $4.2 \pm 1.98$  ng/ml  $p < 0.04$ , αντίστοιχα). Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 είναι σημαντικά υψηλότερα, ενώ των TIMP-1 και TIMP-4 είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΣΥ σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικές τιμές ΑΠ. Αυτή η διαταραχή στην ισορροπία έκφρασης της MMP-9 και των ιστικών αναστολέων της, TIMP-1 και TIMP-4, ενδεχομένως να σημαίνει την έναρξη και να προάγει το remodeling και τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με ΣΥ. Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες για την κατανόηση των συγκεκριμένων ευρημάτων, ώστε να εκτιμηθεί ορθά στην κλινική πράξη ο καρδιαγγειακός κίνδυνος που διατρέχουν οι ασθενείς με συγκαλυμμένη υπέρταση.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φαινόμενο της συγκαλυμμένης υπέρτασης (ΣΥ) ορίζεται ως κλινική κατάσταση κατά την οποία η ΑΠ του ασθενούς κατά τη μέτρηση στο ιατρείο είναι μικρότερη των 140/90 mmHg ενώ οι τι-

\* Η εργασία αυτή τιμήθηκε με το πρώτο βραβείο στο διαγωνισμό του 11ου Πανελληνίου Συνεδρίου Αρτηριακής Υπέρτασης, που έγινε στην Αθήνα από 5 έως 7 Μαρτίου 2009.

μές ΑΠ των μετρήσεων στο σπίτι ή της 24ωρης καταγραφής (ABPM, ambulatory blood pressure monitoring) είναι εντός του υπερτασικού εύρους<sup>1,2</sup>. Για τον καθορισμό της έχουν προταθεί κατά καιρούς διαφορετικά εύρη τιμών, καθιστώντας δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων διάφορων μελετών. Ο επιπολασμός της ΣΥ ενδεχομένως να πλησιάζει ως και το 10% του γενικού πληθυσμού, καθώς τα δεδομένα αρκετών διασταυρούμενων μελετών επιδεικνύουν μεγάλες διαφορές, με τιμές επιπολασμού από 8% ως και 49%<sup>3-6</sup>. Μια πληθώρα στοιχείων υποδεικνύουν ότι η ΣΥ είναι ένας σημαντικός παράγοντας καρδιαγγειακής νόσου. Τα δεδομένα διασταυρούμενων μελετών δείχνουν ότι η ΣΥ σχετίζεται με αυξημένο δείκτη μάζας της αριστερής κοιλίας<sup>7-9</sup> και πάχυνση του έσω χιτώνα των καρωτίδων<sup>10</sup>. Επιπλέον, σε προοπτικές μελέτες, η ΣΥ βρέθηκε να είναι προγνωστικός παράγοντας έκβασης καρδιαγγειακής νόσου<sup>11</sup>, θνησιμότητας<sup>12</sup> και βλάβης οργάνων-στόχων<sup>13,14</sup>.

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος (MMPs, matrix metalloproteinases) είναι εξαρτώμενες από τον ψευδάργυρο-ενδοπεπτιδάσες με ικανότητα να αποσυνθέτουν όλα τα συστατικά του εξωκυττάρου στρώματος (ΕΚΣ, ECM, extracellular matrix) σε φυσιολογικό pH<sup>15</sup>. Τα μέλη οικογένειας των MMPs έχουν την ίδια γονιδιακή ακολουθία, εκφράζουν τη δραστηριότητά τους σε πρωτεϊνικό υπόστρωμα, συμμετέχουν σε οξείες φλεγμονώδεις διαδικασίες, καθώς και σε χρόνιες διαδικασίες που αφορούν το remodeling της αριστερής κοιλίας και των αγγείων. Ο ρόλος τους στο remodeling των αγγείων είναι πολύ σημαντικός<sup>16</sup>, όχι μόνο στη συνολική αρχιτεκτονική του αγγείου, αλλά επίσης και περισσότερο σημαντικά, στην πρόοδο της αθηρωματικής πλάκας. Η δραστηριότητα τους ελέγχεται από ενδογενείς αναστολές, όπως οι ιστικοί αναστολές τους (TIMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases)<sup>17</sup>.

Η υπέρταση σχετίζεται με remodeling των αγγείων, που χαρακτηρίζεται από αναδιάταξη των συστατικών του αγγειακού τοιχώματος, συμπεριλαμβανομένου των πρωτεϊνών του ΕΚΣ<sup>18</sup>. Σε πρόσφατες μελέτες έχει διατυπωθεί η ανάμειξη της διαταραχής του μεταβολισμού των πρωτεϊνών του ΕΚΣ στο μηχανισμό της υπέρτασης<sup>19</sup>. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν την ενδιαφέρουσα πιθανότητα της τροποποίησης του μεταβολισμού του κολλαγόνου κατά την αντιυπερτασική θεραπεία. Επιπρόσθετα, δείχθηκε ότι οι MMPs ενδέχεται να έχουν σημαντική και πλειοτρόπο επίδραση στη λειτουργία των αγγείων και στην πρόοδο της νόσου<sup>20</sup>. Ο σκοπός

της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η υπόθεση ότι υπάρχουν διαταραχές των επιπέδων πλάσματος της MMP-9 και των TIMP-1 και TIMP-4 σε ασθενείς με ΣΥ σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικές τιμές ΑΠ χωρίς προηγούμενο ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου.

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη διεξάχθηκε σε 160 άτομα (60 άνδρες, 70 γυναίκες), ελληνικής καταγωγής, μέσης ηλικίας  $45 \pm 12$  έτη, με τιμές κλινικής μέτρησης ΑΠ  $< 140/90$  mmHg, που ήταν υπό παρακολούθηση στο Υπερτασικό Ιατρείο της Καρδιολογικής Κλινικής. Όλος ο πληθυσμός της μελέτης υποβλήθηκε σε 24ωρη καταγραφή της ΑΠ (ABPM, ambulatory blood pressure monitoring). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των καταγραφών, οι 24 (8 άνδρες, 16 γυναίκες), μέσης ηλικίας  $46 \pm 7$  έτη, με BMI  $25.9 \pm 2.1$  kg/m<sup>2</sup>, είχαν ΣΥ (ημερήσια τιμή ΣΑΠ  $\geq 135$  mmHg ή ΔΑΠ  $\geq 85$  mmHg) και αποτέλεσαν την ομάδα Α. Οι υπόλοιποι 106 (52 άνδρες, 54 γυναίκες), μέσης ηλικίας  $44 \pm 6$  έτη, με BMI  $25.5 \pm 2.4$  kg/m<sup>2</sup> είχαν φυσιολογικές τιμές ΑΠ κατά την ABPM και αποτέλεσαν την ομάδα Β. Τα δημογραφικά στοιχεία των συμμετεχόντων στη μελέτη, καθώς και οι μεταβλητές που περιλαμβάνονται στις πρόσφατες Ευρωπαϊκές Κατευθυντήριες Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης Υπέρτασης (ΕΕΥ) για την εκτίμηση του παγκόσμιου καρδιαγγειακού κινδύνου, παρουσιάζονται στον πίνακα 1<sup>21</sup>.

Ο πληθυσμός τόσο της ομάδας Α όσο και της ομάδας Β δεν λάμβανε φαρμακευτική αγωγή και δεν έκανε χρήση καπνού. Όλοι ακολουθούσαν συγκεκριμένη δίαιτα προ της εισαγωγής στη μελέτη και ήταν ελεύθεροι θυρεοειδοπάθειας. Η κατανάλωση αλκοόλ διευκρινίστηκε μέσω απαντήσεων σε πρότυπο ερωτηματολόγιο σχετικά με την ημερήσια κατανάλωση κρασιού, λικέρ και μπίρας και εκφράστηκε σε γραμμάρια (gr) ανά ημέρα. Οι πληροφορίες σχετικά με τη φυσική άσκηση λήφθηκαν μέσω απαντήσεων σε πρότυπο ερωτηματολόγιο που έχει ήδη σχολιαστεί<sup>22</sup>. Προ της μελέτης λήφθηκε έγγραφη συγκατάθεση από κάθε συμμετέχοντα που εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου. Κατά την έναρξη της μελέτης (baseline) διενεργήθηκε αντικειμενική εξέταση όλων των συμμετεχόντων, λήψη ατομικού αναμνηστικού, εργαστηριακός έλεγχος, εκτίμηση των παραγόντων κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, λήψη ΗΚΓ, μέτρηση σωματικού βάρους (ΣΒ σε kg)

με ελαφρά ένδυση και ύψους (σε m) χωρίς υποδήματα και ακόλουθος υπολογισμός του BMI (ΣΒ/ύψος σε kg/m<sup>2</sup>).

### **Μέτρηση ΑΠ και εργαστηριακός έλεγχος**

Η συστολική ΑΠ (ΣΑΠ) και η διαστολική ΑΠ (ΔΑΠ) μετρήθηκαν κατά την ακρόαση του πρώτου και του πέμπτου ήχου Korotkoff αντίστοιχα. Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν με χρήση υδραργυρικού σφυγμομανομέτρου στο δεξιό βραχίονα με απόκλιση χιλιοστού υδραργύρου (mmHg). Όλες οι μετρήσεις διενεργήθηκαν με τον συμμετέχοντα σε ύπτια θέση μετά από ξεκούραση 15 min, από τον ίδιο εκπαιδευμένο νοσηλευτή, ο οποίος δεν ήταν ενήμερος για το αναμνηστικό των συμμετεχόντων. Τα αποτελέσματα εξάχθηκαν από το μέσο όρο τριών ξεχωριστών μετρήσεων.

Η ένταξη των ασθενών με ΣΥ στη μελέτη έγινε σύμφωνα με τον ορισμό της ΕΕΥ για την ΣΥ (τιμές κλινικής ΑΠ >140/90 mmHg και τιμές ΣΑΠ >135 mmHg ή ΔΑΠ >85 mmHg κατά τη διάρκεια της ημέρας) που περιέχεται στις Κατευθυντήριες Οδηγίες για την Υπέρταση της ΕΕΥ, έκδοση 2007<sup>23</sup>. Οι μετρήσεις ΑΠ απαρτίστηκαν από κλινικές μετρήσεις ΑΠ (όπως προαναφέρθηκε), μετρήσεις ΑΠ στο σπίτι (μέσες τιμές μετρήσεων monitoring και απογευματινών μετρήσεων με ημιαυτόματη συσκευή) και ABPM με χρήση συσκευής Spacelabs 90207, που κατέγραφε μετρήσεις ΑΠ ανά 20 min κατά τη διάρκεια της ημέρας (μετάξύ 10:00 πμ και 08:00 μμ) και ανά 40min κατά τη διάρκεια της νύχτας (μετάξύ 00:00 πμ και 06:00 πμ) για 24 ώρες<sup>3</sup>. Από τους συμμετέχοντες ζητήθηκε να συμπληρώσουν έντυπο ημερησίων δραστηριοτήτων από το οποίο εξάχθηκαν ακριβείς πληροφορίες για τις ώρες κατάκλισης και αφύπνισης. Η έναρξη του νυχτερινού ύπνου ορίστηκε ως η ώρα της βραδινής κατάκλισης. Στους συμμετέχοντες συστήθηκε να ακολουθούν τις συνήθειες καθημερινές δραστηριοτήτες τους κατά την περίοδο της παρακολούθησης.

Οι συμμετέχοντες με φυσιολογικές τιμές ΑΠ εντάχθηκαν στη μελέτη κατά τη διάρκεια καρδιολογικής εκτίμησης στα πλαίσια προεγχειρητικού ελέγχου, ως επί το πλείστον για αντιμετώπιση ορθοπεδικών, οφθαλμολογικών ή παρόμοιων προβλημάτων. Περιλήφθηκαν στη μελέτη εφόσον ήταν νορμοτασικοί (φυσιολογικές τιμές κλινικής μέτρησης ΑΠ), χωρίς σοβαρά συνοδά νοσήματα και εφόσον δεν λάμβαναν φαρμακευτικούς παράγοντες

που ήταν γνωστό ότι θα επηρέαζαν τις παραμέτρους της μελέτης (πχ, ασπιρίνη, κλπ).

Τα δείγματα φλεβικού αίματος λήφθηκαν μεταξύ 08:00 και 09:00 πμ, χωρίς στάση, μετά από 10 min ηρεμίας των συμμετεχόντων, σε ύπτια θέση, με σκοπό τον υπολογισμό των επιπέδων πλάσματος της MMP-9, του TIMP-1 και TIMP-4. Οι συμμετέχοντες έλαβαν την οδηγία να μην υποβληθούν σε έντονη φυσική δραστηριότητα και να μην κάνουν χρήση καπνού προ της αιμοληψίας. Σε όλους τους συμμετέχοντες είχε προηγηθεί νηστεία τουλάχιστο 12 ωρών. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια συλλογής δειγμάτων αίματος χωρίς προσθήκη αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων και αφέθηκαν για 30 min σε θερμοκρασία 25° C ώσπου να σχηματιστεί θρόμβος. Ο θρόμβος εξαιρέθηκε δια φυγοκέντρησης σε 3000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία 4° C και το πλάσμα υποπολλαπλασιάστηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20° C μέχρι να λάβει χώρα η ανάλυσή του, περίπου 1 μήνα μετά τη συλλογή δειγμάτων.

### **Μέτρηση μεταλλοπρωτεϊνάσης στρώματος-9 και ιστικών αναστολέων της**

Οι μετρήσεις περιεκτικότητας τόσο της MMP-9 όσο και των αναστολέων της διενεργήθηκαν ταυτόχρονα, ώστε να εξαλειφθεί οποιαδήποτε επίδραση του κύκλου ψύξης-απόψυξης. Οι ποσοτικές μετρήσεις της MMP-9 και των TIMP-1 και TIMP-4 διενεργήθηκαν εις διπλούν με το διαθέσιμο στο εμπόριο kit ανοσοχημικής μέτρησης περιεκτικότητας (ELISA) της R & D Systems Inc., Minneapolis, USA. Οι έσω-υπολογιστικοί (intra-assay) και οι δια-υπολογιστικοί (inter-assay) συντελεστές διαφοροποίησης ήταν 2.3% και 7.5% για την MMP-9 και 4.4% και 4.2% για τον TIMP-1 αντίστοιχα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του συμπλέγματος MMP-9/TIMP-4 διενεργήθηκε εις διπλούν, με χρήση του ανθρώπινου MMP-9/TIMP-4 συμπλέγματος DuoSet της R & D Systems, Minneapolis, USA, σύμφωνα με το θεσπισμένο πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι TIMP-1 και TIMP-4 μπορούν να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα υψηλής συγγένειας με την MMP-9 με 1:1 στοιχειομετρία<sup>24-25</sup>. Κατά τη μέτρηση των επιπέδων πλάσματος της MMP-9, όπως αναφέρθηκε, υπολογίστηκαν τα επίπεδα του TIMP-4 με βάση την αναλογία MMP-9/TIMP-4. Οι ερευνητές που διενήργησαν τις μετρήσεις δεν ήταν ενήμεροι για την ταυτότητα των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως συγκεντρώσεις πλάσματος της

MMP-9 και των συμπλεγμάτων TIMP-1 και TIMP-4 (σε ng/ml) στα υπό μελέτη δείγματα.

### Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ± στατιστική διαφορά. Ο έλεγχος Student t test για μη συσχετιζόμενες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των διαφορών ανάμεσα στις δύο ομάδες. Οι διαφορές  $p < 0.04$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Όλες οι αναλύσεις διενεργήθηκαν με το εξειδικευμένο λογισμικό στατιστικής ανάλυσης SPSS, USA.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες σύμφωνα με την ηλικία, το φύλλο, το BMI ή τις άλλες παραμέτρους καρδιαγγειακού κινδύνου. Επίσης, δεν ανευρέθησαν διαφορές που να σχετίζονται με την κατανάλωση αλκοόλ (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, τα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 ήταν σημαντικά υψηλότερα, ενώ τα επίπεδα πλάσματος των TIMP-1 και TIMP-4 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα A, σε σύγκριση με την ομάδα B ((MMP-9  $569 \pm 135$  έναντι  $282 \pm 117$  ng/ml, TIMP-1  $169 \pm 42$  έναντι  $230 \pm 37$  ng/ml,  $p < 0.01$  και TIMP-4  $2.1 \pm 1.3$  έναντι  $4.2 \pm 1.98$  ng/ml,  $p < 0.04$ , αντίστοιχα).

**Πίνακας 1.** Δημογραφικά χαρακτηριστικά και εργαστηριακός έλεγχος του υπό μελέτη πληθυσμού

	Ομάδα A (n=24)	Ομάδα B (n=106)	p
Ηλικία (έτη)	46±7	44±6	NS
Φύλο (Α/Θ)	11/13	49/57	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.9±2.1	25.5±2.4	NS
Κλινική ΣΑΠ (mmHg)	125±8	124±7	NS
Κλινική ΔΑΠ (mmHg)	80±3	79±4	NS
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	234±26	232±25	NS
HDL (mg/dl)	43±6	42±4	NS
LDL (mg/dl)	160±30	156±27	NS
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	99±31	102±32	NS

ΣΑΠ = Συστολική Αρτηριακή Πίεση

ΔΑΠ = Διαστολική Αρτηριακή Πίεση

BMI = Body Mass Index, Δείκτης μάζας-σώματος

LDL = Low Density Lipoprotein, Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

HDL = High Density Lipoprotein, Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη

Α/Θ = Άρρεν/Θήλυ

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα και σύγκριση των ομάδων

	Ομάδα A (n=24)	Ομάδα B (n=106)	p
MMP-9 (ng/ml)	569±135	282±117	<0.01
TIMP-1 (ng/ml)	169±42	230±37	<0.01
TIMP-4 (ng/ml)	2.1±1.3	4.2±1.98	<0.04
Μέση Ημερήσια ΣΑΠ (mmHg)	138±6	122±7	<0.01
Μέση Ημερήσια ΔΑΠ (mmHg)	90±4	79±4	<0.01

ΣΑΠ = Συστολική Αρτηριακή Πίεση

ΔΑΠ = Διαστολική Αρτηριακή Πίεση

MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) = MMP-9 (Μεταλλοπρωτεϊνάση στρώματος-9)

TIMP-4 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-4) = TIMP-4 (Ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος-4)

TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1) = TIMP-1 (Ιστικός αναστολέας μεταλλοπρωτεϊνών στρώματος-1)

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι τα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 ήταν υψηλότερα και ότι τα επίπεδα πλάσματος των TIMP-1 και TIMP-4 ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με ΣΥ από εκείνα των συμμετεχόντων με φυσιολογικές τιμές ΑΠ, ακόμα και μετά την προσαρμογή για ηλικία, φύλλο, BMI και άλλων μεταβλητών καρδιαγγειακού κινδύνου στις δύο ομάδες.

Το ΕΚΣ είναι ένα ζωτικό συστατικό του συνδετικού ιστού που περιβάλλει τα κύτταρα συμπαγών οργάνων<sup>17</sup>. Αποτελείται από βασικά δομικά συστατικά, όπως κολλαγόνο και ελαστίνη, καθώς και από πιο εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπως ινιδίνη (fibrillin) και ινωδονεκτίνη (fibronectin), και πρωτεογλυκάνες<sup>17</sup>. Το κολλαγόνο τύπου I και III είναι το επικρατών συστατικό του καρδιαγγειακού ΕΚΣ. Η αποσύνθεση του κολλαγόνου και των άλλων συστατικών διαμεσολαβείται από τις MMPs<sup>16</sup>. Τα ένζυμα αυτά υπόκεινται σε ειδική ρύθμιση από τους TIMPs<sup>17,26</sup>. Ειδικά η υπέρταση σχετίζεται με αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου, ιδιαιτέρως των τύπων I, II και IV<sup>16</sup>.

Η MMP-9 είναι μέλος της ομάδας των γελατινών (gelatins). Ο TIMP-1 συντίθεται από τα περισσότερα είδη κυττάρων του συνδετικού ιστού και έχει μεγάλο εύρος δραστηριότητας έναντι των MMPs. Σε ενεργά απορροφητικούς ιστούς, ο TIMP-1 υπερεκφράζεται και σχηματίζει υψηλής συγγένειας και μη-αναστρέψιμα συμπλέγματα με

τις ενεργές MMPs<sup>16</sup>. Ο TIMP-4 είναι ο πιο πολυπληθής αναστολέας MMPs στο μυοκάρδιο ανθρώπων και ποντικών<sup>27,28</sup>. Η διαταραχή της MMP-9/TIMP-1 αναλογίας δραστηριότητας ενδέχεται να υποκρύπτεται στην παθογένεια καρδιαγγειακών νόσων, όπως το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής, των φλεβικών κιρσών, της υπέρτασης και της προελαμψίας<sup>19</sup>, καθώς και του εμφράγματος του μυοκαρδίου<sup>29</sup>, της καρδιακής ανεπάρκειας<sup>30</sup> και της διατατατικής μυοκαρδιοπάθειας<sup>30</sup>. Τα διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπους επέδειξαν μεγάλη συσχέτιση των επιπέδων πλάσματος της MMP-9, TIMP-1 και TIMP-4 και της ΑΠ σε υγιείς προϋπερτασικούς<sup>32</sup>. Επίσης, οι διαταραχές της ισορροπίας MMP-9/TIMP ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομική, λειτουργική και κλινική εκδήλωση της υπέρτασης<sup>33</sup>.

Ο Laviades και συν. παρατήρησαν υψηλότερες συγκεντρώσεις πλάσματος του TIMP-1 σε ασθενείς με υπέρταση<sup>34</sup>, ενώ έχει διατυπωθεί επίσης ότι τα αυξημένα επίπεδα πλάσματος του TIMP-1 ενδέχεται να αποτελούν χρήσιμο δείκτη της διαστολικής πλήρωσης και της δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας, καθώς και πιθανό μη-επεμβατικό δείκτη ίνωσης του μυοκαρδίου<sup>35</sup>. Οι τιμές της MMP-9 έχουν βρεθεί χαμηλότερες ή παραπλήσιες σε ασθενείς με υπέρταση κατά τη σύγκριση με νορμοτασικούς της ομάδας control<sup>36,37</sup>. Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν αυξημένες τιμές MMP-9 και TIMP-1 κατά την ίδια σύγκριση ασθενών<sup>38,39</sup>. Επιπρόσθετα, οι ίδιοι συγγραφείς παρατήρησαν ότι οι αυξημένες τιμές της MMP-9 σχετίζονται με αυξημένα scores καρδιαγγειακού κινδύνου κατά Framingham<sup>38</sup> και ότι τα αυξημένα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 και του TIMP-1 φαίνεται να μεταβάλλονται στην υπέρταση κήσης<sup>40</sup>. Επιπλέον, οι Tayebjee και συν. παρατήρησαν υψηλότερα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 και του TIMP-1 σε διαβητικούς ασθενείς κατά τη σύγκριση με μη-διαβητικούς<sup>41</sup>.

Σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας ανέδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων πλάσματος της MMP-9, όμως, σε αντίθεση με τα αναφερόμενα ευρήματα, τα αποτελέσματά μας επεσήμαναν μειωμένα επίπεδα πλάσματος του TIMP-1. Αυτή η ασυμφωνία ίσως να αντανακλά έναν πρώιμο προγνωστικό δείκτη για μελλοντική ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου, εφόσον οι MMPs έχουν έμμεση επίδραση στους διαύλους ιόντων των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, καθώς και σε άλλους μηχανισμούς αγγειακής

χάλασης και σύσπασης<sup>19,42-43</sup>.

Ο TIMP-4 ανακαλύφθηκε πρόσφατα και αποτελεί τον πολυπληθέστερο αναστολέα MMPs στο ανθρώπινο μυοκάρδιο<sup>27</sup>. Πρόσφατες πειραματικές μελέτες του υπέρτασικού μυοκαρδίου ανέδειξαν την παρουσία υπερέκφρασης του TIMP-4 στη μυελώδη μοίρα των νεφρών, που ενδέχεται να αναστέλλει την κολλαγονολυτική δραστηριότητα που συμβάλλει στη βλάβη των νεφρών και στο υπέρτασικό remodeling<sup>44</sup>. Τα διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο έδειξαν πως υπάρχει εκλεκτική προς τα κάτω ρύθμιση (downregulation) του TIMP-1 και ταυτόχρονη προς τα άνω ρύθμιση (upregulation) της MMP-9, καθώς και γελαινολυτική δραστηριότητα στο μυοκάρδιο υπό καρδιακή ανεπάρκεια. Οι μεταβολές αυτές ευνοούν την αποσύνθεση του στρώματος και την αναστροφή της σχέσης εναπόθεσης/αποσύνθεσης κολλαγόνου υπέρ της εναπόθεσης (collagen turnover). Αυτή η μεταβολή στην ισορροπία των επιπέδων πλάσματος της MMP-9 και του TIMP-4 είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Υποστηρίζει δε την πρακτική νέων θεραπευτικών στρατηγικών με σκοπό την αναστολή της διαδικασίας του remodeling και της διάτασης της αριστερής κοιλίας στην ανεπαρκή καρδιά<sup>31</sup>.

### Περιορισμοί της μελέτης

Περιορισμό στη μελέτη αποτελεί η έλλειψη δειγματοληψίας μυοκαρδιακού και αγγειακού ιστού στον υπό μελέτη πληθυσμό, που θα εδραίωνε ιδεωδώς τη συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας των MMP-9 και TIMP σε ιστικό επίπεδο και των κυκλοφορούντων επιπέδων τους στο πλάσμα. Ο μικρός αριθμός δείγματος ασθενών της μελέτης είναι ευρύτερα ισότιμος με εκείνο προηγούμενων μελετών<sup>35,38</sup>.

Επίσης, το απόλυτο επίπεδο (net level) της δραστηριότητας της MMP-9 εν μέρει εξαρτάται από τις σχετικές συγκεντρώσεις του ελεύθερου ενεργού ενζύμου και των αναστολέων του<sup>45</sup>. Οι MMPs και οι TIMPs κυκλοφορούν με ελεύθερη μορφή ή με τη μορφή συμπλέγματος. Η τελευταία μορφή δύσκολα διαχωρίζεται κατά τη μέτρηση με τα kit ELISA. Τέλος, δεν διενεργήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης λόγω του μικρού δείγματος ασθενών. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία σχετικά με τα επίπεδα των MMPs σε ασθενείς με ΣΥ.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα πλάσματος της MMP-9 είναι σημαντικά υψηλότερα, ενώ των TIMP-1 και TIMP-4 είναι σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΣΥ σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικές τιμές ΑΠ. Αυτή η διαταραχή στην ισορροπία έκφρασης της MMP-9 και των ιστικών αναστολέων της, TIMP-1 και TIMP-4, ενδεχομένως να σημαίνει την έναρξη και να προάγει το remodeling και τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με ΣΥ. Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίες για την κατανόηση των συγκεκριμένων ευρημάτων, ώστε να εκτιμηθεί ορθά στην κλινική πράξη ο καρδιαγγειακός κίνδυνος που διατρέχουν οι ασθενείς με συγκαλυμμένη υπέρταση.

## SUMMARY

*Spyropoulos S, Papadopoulos D, Perrea D, Sanidas EA, Mpratsas A, Papazachou O, Makris T, Votteas V. Changes of matrix metalloproteinases in patients with masked hypertension. Arterial Hypertension 2009; 18: 32-39.*

Masked hypertension is a clinical condition with normal office blood pressure (BP) and ambulatory blood pressure monitoring readings (ABPM) within the hypertensive range. Several studies have demonstrated differences in MH prevalence and have indicated MH as a significant predictor of cardiovascular disease (CD). Hypertension is associated with vascular remodeling and vascular wall components rearrangement, including ECM proteins. Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc related endopeptidases with the ability to degrade all extracellular matrix (ECM) components at normal pH. MMPs activity is significantly regulated by their tissue inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs). The aim of this study was to investigate alterations in collagen degradation in patients with MH and possible associations with MMPs plasma concentration. Twenty-four (11 male, 13 female) patients with MH, mean age  $46 \pm 7$  years, body mass index (BMI)  $25.9 \pm 2.1$  Kg/m<sup>2</sup> (group A), and 106 healthy normotensives, (49 male, 57 female), mean age  $44 \pm 6$  years, BMI  $25.5 \pm 2.4$  Kg/m<sup>2</sup> (group B), without history of CD or diabetes mellitus (DM) were studied. The 2 groups were matched for age, sex and BMI. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), TIMP-1 and TIMP-4 were determined by ELISA.

Plasma MMP-9 levels were significantly higher, while TIMP-1 and TIMP-4 levels were significantly lower in-group A compared with group B (MMP-9  $569 \pm 135$  vs  $282 \pm 117$  ng/ml, TIMP-1  $1169 \pm 42$  vs  $230 \pm 37$  ng/ml  $p < 0.01$  and TIMP-4  $2.1 \pm 1.3$  vs  $4.2 \pm 1.98$  ng/ml  $p < 0.04$ , respectively). Patients with MH had significantly increased MMP-9 plasma levels and significantly decreased plasma levels of TIMP-1 and TIMP-4, compared with subjects with NBP. These findings indicate an MMPs/TIMPs ratio alteration, which may play a role in vascular and cardiac remodeling of patients with MH. Further studies are necessary, in order to estimate CV risk in MH.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pickering TG, Shimbo D, Haas D. Ambulatory blood-pressure monitoring. *N Engl J Med* 2006; 354: 2368-74.
2. McKay DW, Myers MG, Bolli P, Chockalingam A. Masked hypertension: a common but insidious presentation of hypertension. *Can J Cardiol* 2006; 22: 617-20.
3. Mancia G, Sega R, Bravi C, et al. Ambulatory blood pressure normality: results from the PAMELA study. *J Hypertens* 1995; 12 Pt 1: 1377-90.
4. Waerber B. What is behind masked hypertension? *Rev Med Suisse* 2005; 1: 2089-91.
5. Pickering TG. Effects of stress and behavioral interventions in hypertension: what is masked hypertension? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2003; 5: 171-4, 176.
6. Palatini P. Masked hypertension: how can the condition be detected? *Blood Press Monit* 2004; 9: 297.
7. Mancia G, Carugo S, Grassi G, et al. Prevalence of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients without and with blood pressure control: data from the PAMELA population. *Hypertension* 2002; 39: 744-9.
8. Sega R, Trocino G, Lanzarotti A, et al. Alterations of cardiac structure in patients with isolated office, ambulatory, or home hypertension: Data from the general population PAMELA Study. *Circulation* 2001; 104: 1385-92.
9. Tomiyama M, Horio T, Kamide K, et al. Reverse white-coat effect as an independent risk for left ventricular concentric hypertrophy in patients with treated essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21: 212-9.
10. Hara A, Ohkubo T, Kikuya M, et al. Detection of carotid atherosclerosis in individuals with masked hypertension and white-coat hypertension by self-measured blood pressure at home: The Ohasama Study. *J Hypertens* 2007; 25: 321-327.
11. Pierdomenico SD, Lapenna D, Bucci A, et al. Cardiovascular outcome in treated hypertensive patients with responder, masked, false resistant, and true resistant hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18: 1422-8.
12. Mancia G, Facchetti R, Bombelli M, Grassi G, Sega R. Long-term risk of mortality associated with selective

- and combined elevation in office, home, and ambulatory blood pressure. *Hypertension* 2006; 47: 846-53.
13. *Tomiyama M, Horio T, Yoshii M.* Masked hypertension and target organ damage in treated hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2006; 19: 880-6.
  14. *Kato T, Horio T, Tomiyama M, et al.* Reverse white-coat effect as an independent risk for microalbuminuria in treated hypertensive patients *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 911-6.
  15. *Woessner JF.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 2145-54.
  16. *Donnelly R, Collinson DJ, Manning G.* Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens* 2003; 1627-30.
  17. *Nagase H, Woessner JF Jr.* Matrix metalloproteinases *J Biol Chem* 1999 30; 274(31): 21491-4.
  18. *Liu P, Sun M, Sader S.* Matrix metalloproteinase's in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006 Suppl B: 25B-30B.
  19. *Raffetto JD, Khalil RA.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2007 Jul 7; [Epub ahead of print].
  20. *Papadopoulos DP, Moyssakis I, Makris TK, et al.* Clinical significance of matrix metalloproteinases activity in acute myocardial infarction *Eur Cytokine Network* 2005; 16: 52-160.
  21. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003; 21(6): 1011-53.
  22. *Seidell JC, Cigolini M, Deslypere JP, Charzewska J, Ellsinger BM, Cruz A.* Body fat distribution in relation to physical activity and smoking habits in 38 year old European men. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 257-65.
  23. Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007; 25(6): 1105-87.
  24. *Nagase H, Brew K.* Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem Soc Symp* 2003; 70: 201-12.
  25. *Nagase H, Brew K.* Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S51-61.
  26. *Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Lip GY.* Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *J Hypertens* 2003; 21(12): 2211-8.
  27. *Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE.* Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996; 271: 30375-80.
  28. *Leco KJ, Apte SS, Taniguchi GT, et al.* Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997; 401: 213-7.
  29. *Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT.* Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(6): 1281-92.
  30. *Li YY, Feldman AM, Sun Y, McTiernan CF.* Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation* 1998; 98: 1728-34.
  31. *Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, et al.* Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eu J Heart Fail* 1999; 1(4): 337-52.
  32. *Papadopoulos DP, Makris T, Krespi P, et al.* Changes of Metalloproteinases in Healthy Normotensives with High Normal Blood Pressure. *Eur Cytokine Network* 2005; 16: 211-214.
  33. *Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, et al.* 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: 2089-96.
  34. *Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I.* Diez Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* 1998; 98: 535-40.
  35. *Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG.* TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension* 2002; 40: 136-41.
  36. *Zervoudaki A, Economou E, Stefanadis C, et al.* Plasma levels of active extracellular matrix metalloproteinases 2 and 9 in patients with essential hypertension before and after antihypertensive treatment. *J Hum Hypertens* 2003; 17: 119-24.
  37. *Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, Beevers DG, Lip GY.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. Relationship to left ventricular mass and anti-hypertensive therapy. *Int J Cardiol* 2000; 75: 43-7.
  38. *Tayebjee MH, Nadar S, Blann AD, Gareth Beevers D, MacFadyen RJ, Lip GY.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT) *Am J Hypertens* 2004; 17: 764-9.
  39. *Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, et al.* Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium* 2006; 13: 227-31.
  40. *Tayebjee MH, Karalis I, Nadar SK, Beevers DG, MacFadyen RJ, Lip GY.* Circulating matrix metalloprotei-

- nase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 levels in gestational hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18: 325-9.
41. *Tayebjee MH, Lim HS, MacFadyen RJ, Lip GY*. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes: effect of 1 year's cardiovascular risk reduction therapy. *Diabetes Care* 2004; 27: 2049-51.
42. *Mujumdar VS, Tyagi SC*. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens* 1999; 17: 261-70.
43. *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: 298-306.
44. *Camp TM, Smiley LM, Hayden MR, Tyagi SC*. Mechanism of matrix accumulation and glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003; 21: 1719-27.
45. *Dollery CM, McEwan JR, Henney AM*. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995; 77: 863-8.