

УДК 616.092.9

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 И ЕЕ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА В СОСУДАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ТАБАКОКУРЕНИЯ

Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Гончар Е.Ю., Мокшина М.В.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России», Владивосток, Россия (690002, Владивосток, пр-т Острякова, 2), e-mail: zaharchuknat@mail.ru

Изучено содержание матриксной металлопротеиназы-9 и ее тканевого ингибитора в условиях экспериментального моделирования табакокурения. Исследование проведено на крысах-самцах линии Vistar, разделенных на две группы. Контрольная группа животных дышала атмосферным воздухом, а экспериментальную группу ежедневно обкуривали табачным дымом в ингаляционной камере в течение 6 месяцев согласно протоколу Н. Zheng и колл. После декапитации животных изготавливались гистологические препараты головного мозга. Исследована экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и ее тканевого ингибитора (ТИМР-1) в церебральных артериях и нейроглии. Для оценки активности данных маркеров использован метод иммунопероксидазной реакции с моно- и поликлональными антителами против ММР-9 и ТИМР-1, также использованы вторичные антитела, меченые пероксидазой хрена. Количественную оценку ферментативной активности определяли, измеряя плотность преципитата гистохимической реакции в единицах оптической плотности (ЕОП). У животных экспериментальной группы установлено повышение экспрессии ММР-9 как в сосудистой стенке церебральных артерий, так и в капиллярах и межклеточном пространстве нейроглии, что может быть связано с системным соединительно-тканым дисбалансом при длительном воздействии табачного дыма. Одновременно с этим отмечено усиление экспрессии ТИМР-1, очевидно, вследствие компенсаторной реакции, направленной на подавление стимулированной активности ММР-9.

Ключевые слова: табакокурение, металлопротеиназы, головной мозг, нейроглия, крысы

THE EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE-1 IN CEREBRAL VESSELS IN EXPERIMENTAL SMOKING

Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Gonchar E.Y., Mokshina M.V.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia (690002, Vladivostok, Ostryakova street, e-mail: zaharchuknat@mail.ru

The expression of metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in cerebral vessels and neuroglia of rats in the experimental smoking was investigated. The investigation included Vistar male rats, divided into two groups. The first group was breathing ambient air, and the second group was breathing tobacco smoke for 6 months. The localization and expression of MMP-9 and TIMP-1 in cerebral vessels and neuroglia were analyzed by immunohistochemistry method with immunoperoxidase mono- and polyclonal antibodies against MMP-9 and TIMP-1. The density of precipitation in cross sections of cerebral vessels and neuroglia was measured in units of optical density. There was detected increasing expression of MMP-9 and TIMP-1. The results may reflected the level participation matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during of dysmetabolism of connective tissue in smoking.

Keywords: smoking, metalloproteinases, brain, neuroglia, rats

Курение является одним из наиболее значимых факторов риска развития сердечно-сосудистых, бронхолегочных и онкологических заболеваний. Никотинассоциированные болезни занимают лидирующие позиции в структуре смертности цивилизованного общества. Тем не менее механизмы и последствия действия продуктов сгорания табака являются не до конца изученными. Метаанализ 22 исследований,

посвященных изучению связи между курением и риском развития ишемического инсульта, показал, что при хроническом табакокурении происходит удвоение относительного риска развития ишемического инсульта [9]. Можно предположить наличие объединяющего механизма развития системной сосудистой дисфункции при хроническом табакокурении, в том числе ответственного за повреждение сосудов головного мозга. При этом нарушение церебрального кровотока происходит при срыве механизмов его ауторегуляции вследствие повреждения морфологической целостности эндотелиальной выстилки и разрушения межклеточного матрикса в сосудистой стенке. В ряде экспериментальных работ подтверждено, что агрессивные поллютанты табачного дыма (бензопирен, пероксинитрит, акролеин, цианиды, пероксиды и др.) способны прямо повреждать эндотелиоциты за счет экспрессии на их поверхности молекул адгезии и интенсификации процессов перекисного окисления липидов. В свою очередь окисленные липопротеиды в интиме сосуда играют роль аттрактантов для хемотаксиса лейкоцитов и моноцитов, которые начинают продуцировать в большом количестве провоспалительные цитокины ИЛ-1, 6, TNF- α [2]. Итогом этих процессов становятся запуск системного воспалительного ответа и дезорганизация гладкомышечного каркаса артерий.

В последние годы в экспериментальных исследованиях, направленных на раскрытие механизмов гипоксических повреждений гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), изучаются матриксные металлопротеиназы (ММП) — семейство ферментов, разрушающих белки внеклеточного матрикса. Установлено, что ММП играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, воспаление, сердечно-сосудистые болезни, болезни легких и рак. Один из ферментов этого семейства ММП-9 разрушает коллаген IV типа, который является главным компонентом базальной мембраны церебрального эндотелия, и, следовательно, создает условия для миграции клеток через ГЭБ [5].

Целью нашего исследования явилось изучение длительного воздействия табачного дыма на экспрессию матриксной металлопротеиназы ММП-9 и ее тканевого ингибитора TIMP-1 в головном мозге при экспериментальном моделировании хронического табакокурения.

Материалы и методы исследования

Для реализации поставленной цели нами была воспроизведена экспериментальная модель длительного табакокурения *in vivo* у крыс в соответствии с протоколом Н. Zheng и колл. [3]. Материалом исследования послужили крысы-самцы линии Вистар 8-недельного возраста, разделенные произвольно на 2 группы. Контрольная группа дышала атмосферным воздухом, а животных экспериментальной группы обкуривали табачным дымом в

специальной камере для ингаляций в течение 1 ч утром и 1 ч днем ежедневно в течение 6 месяцев. Для ингаляции использованы коммерческие нефильтрованные сигареты (торговая марка Прима, Россия), содержащие 16 мг смолы и 1,2 мг никотина в одной сигарете. Эксперименты проводились в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом от 2008 г. Через 6 месяцев после ингаляции табачного дыма животных фиксировали и анестезировали путем внутрибрюшинного введения рометара (Xylazinum, «Spora», Praha) в концентрации 5,5 мг/кг. Затем производилась декапитация животных и изготавливались гистологические препараты головного мозга. Для оценки локализации и экспрессии матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и ее тканевого ингибитора (ТИМР-1) использовался непрямой иммуногистохимический метод. Была проведена иммунопероксидазная реакция с моно- и поликлональными антителами против ММР-9 и ТИМР-1, а в качестве вторичных антител использованы антитела, помеченные пероксидазой хрена. Количественную оценку степени экспрессии ММР-9 и ТИМР-1 проводили путем измерения суммарной плотности преципитата иммуногистохимической реакции, результат выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Гистологические препараты головного мозга просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Обработку результатов осуществляли с помощью программ Adobe Photoshop 7.0 и Image J. Достоверность различий между группами (при $p < 0,05$) оценивали с помощью коэффициента Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Нам представилось интересным изучить содержание ММР-9 и ТИМР-1 в различных структурах головного мозга, а именно в церебральных сосудах и нейроглии.

ММР-9 относится к коллагеназам IV типа и является протеолитическим ферментом, способным денатурировать фибриллярные коллагены и поддерживать баланс в составе экстрацеллюлярного матрикса за счет участия в деградации эластина, фибронектина и коллагена IV типа, главного компонента базальных мембран. [4].

Согласно полученным результатам ММР-9 локализуется как в сосудистой стенке, так и в нейроглии. При этом установлено достоверное повышение гистохимической активности ММР-9 в церебральных артериях у животных экспериментальной группы по сравнению с контролем (17,98 ЕОП и 11,07 ЕОП соответственно при $p < 0,05$) (рис. 1).

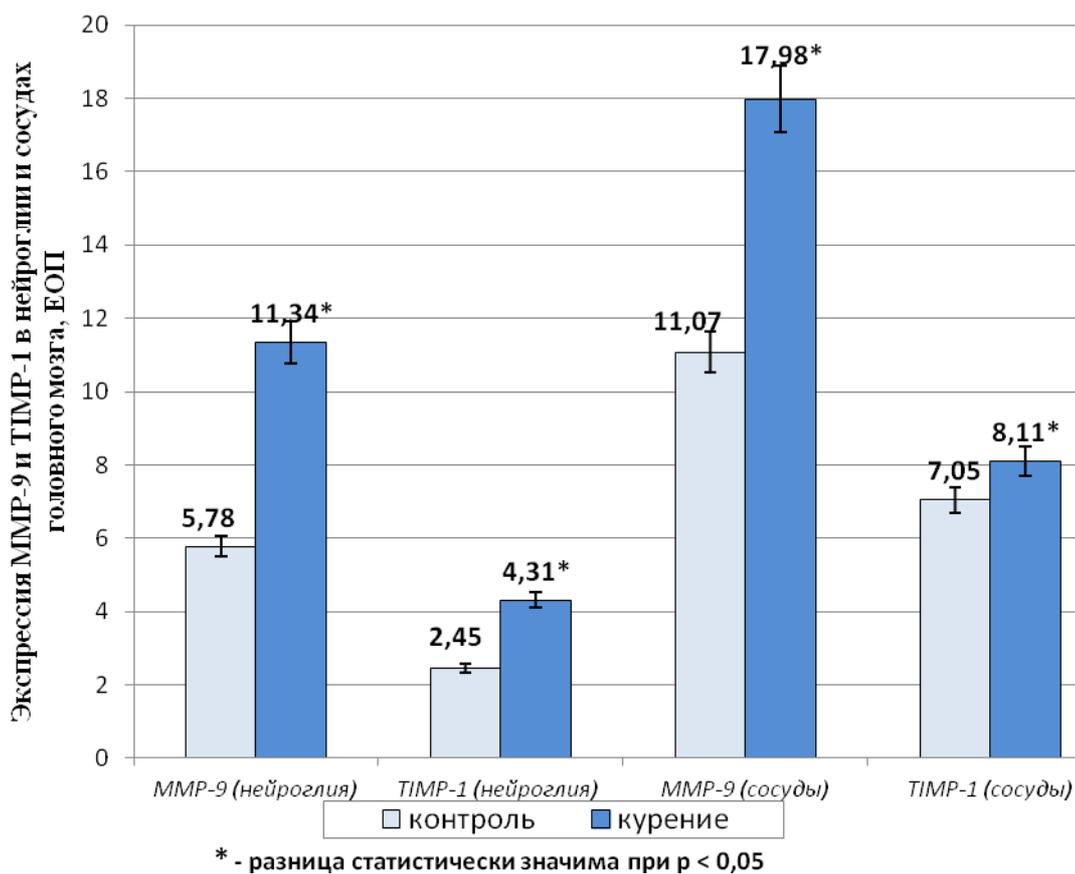


Рис. 1. Экспрессия MMP-9 и TIMP-1 в церебральных сосудах и нейроглии

Полученные результаты могут свидетельствовать об участии MMP-9 в ремоделировании сосудистой стенки церебральных артерий за счет деградации коллагена и нарушении межклеточного матрикса. Одним из механизмов повышения экспрессии MMP-9 в данном случае может быть оксидативный стресс, вызванный накоплением свободно-радикальных форм кислорода при длительном воздействии табачного дыма [6]. Активные формы кислорода не только вызывают свободно-радикальное окисление биомолекул, но и являются регуляторами активности ряда ферментов, включая матриксные металлопротеиназы, а через окисление специфических тиольных групп белков могут изменять конформацию белковых факторов транскрипции, что приводит к их активации или ингибированию. Так, прямое активирующее действие активных форм кислорода на матриксные металлопротеиназы наблюдалось при инкубации очищенных предшественников внеклеточных матриксных металлопротеиназ про-MMP-2 и про-MMP-9 гладких миоцитов человека с системой ксантин — ксантинооксидаза [8].

Нами также обнаружено, что у крыс экспериментальной группы содержание MMP-9 повышено не только в церебральных сосудах, но и в капиллярах и межклеточном веществе нейроглии (рис. 2).

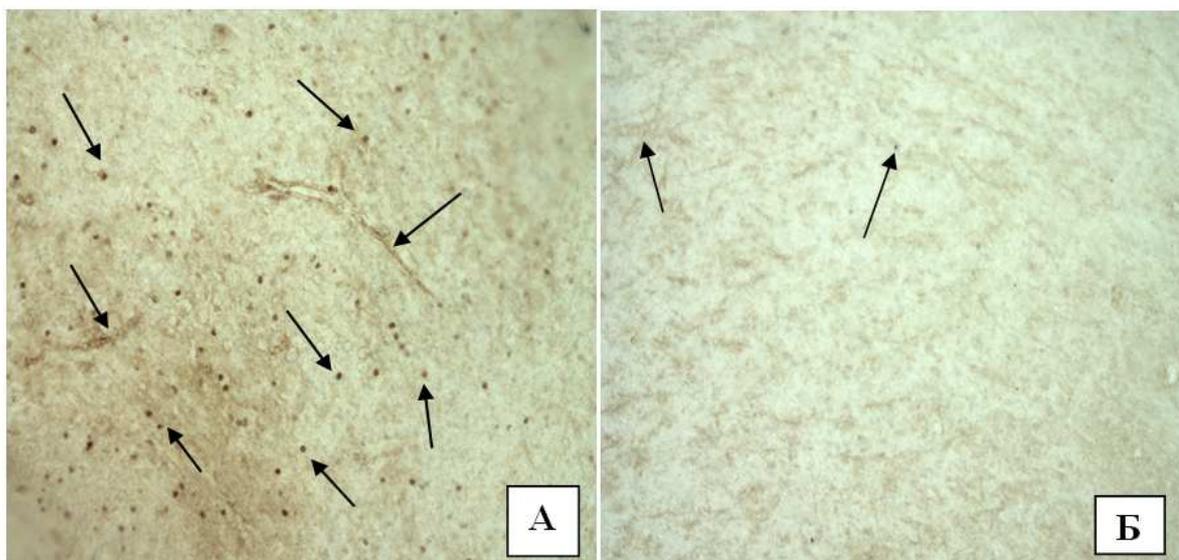


Рис. 2. Экспрессия MMP-9 в головном мозге крыс контрольной группы (Б) и у животных с моделью табакокурения (А), ув.х20. Стрелками указана локализация маркера к MMP-9 в межклеточном пространстве нейроглии и капиллярах

При этом в группе курения отмечено двукратное превышение MMP-9 по сравнению с контролем (11,34 ЕОП и 5,78 ЕОП соответственно при $p < 0,05$) (рис. 1). По-видимому, это связано с тем, что MMP-9 является протеолитическим ферментом, с помощью которого лимфоциты повреждают базальную мембрану ГЭБ и проникают в ткань мозга [10]. Так, в ряде экспериментальных работ показано, что MMP-9 является молекулярным маркером прорыва ГЭБ у пациентов с инсультом. При этом в плазме крови его в два раза больше, чем у здоровых людей [7]. В других работах показано, что повышение MMP-9 в сыворотке крови также ассоциировано с разрушением ГЭБ в остром периоде ишемического инсульта [1].

В свою очередь изменять и контролировать активность матриксных металлопротеиназ могут их эндогенные регуляторы и специфические тканевые ингибиторы (TIMP). TIMP различаются по их специфическому действию на MMP. Так, например, TIMP-1 значительно лучше ингибирует MMP-9, в то время как TIMP-2 подавляет активность MMP-2.

Одновременно с увеличением экспрессии MMP-9 нами зарегистрировано повышение плотности преципитата TIMP-1 как в сосудах головного мозга, так и в нейроглии у животных экспериментальной группы. Так, содержание TIMP-1 в сосудах и нейроглии при табакокурении составило 8,11 ЕОП и 4,31 ЕОП соответственно, что достоверно отличалось от группы контроля — 7,05 ЕОП и 2,45 ЕОП соответственно при $p < 0,05$ (рис. 1). TIMP-1 является одним из главных эндогенных ингибиторов MMP-9 в тканях и имеет центральную функцию в поддержании этого баланса.

Заключение

Установленный в нашем исследовании факт повышенной экспрессии MMP-9 свидетельствует о нарушении процессов деградации коллагена как в сосудистой стенке церебральных артерий, так и в капиллярах и межклеточном пространстве нейроглии и отражает системный характер соединительно-тканного дисбаланса при длительном воздействии табачного дыма. Выявленное одновременно с этим повышение TIMP-1 может рассматриваться как компенсаторная реакция, направленная на подавление стимулированной активности MMP-9.

Список литературы

1. Castellanos M. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Castellanos M., Leira R., Serena J., Pumar J.M., Lizasoain I., Castillo J. et al. *Stroke*. — 2003. Vol. 34. — P. 40–46.
2. Circu M.L. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Circu M.L., Aw T.Y. *Free Radic. Biol. Med.* — 2010. Vol. 48. — P. 749–762.
3. Hongao Zheng. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. Hongao Zheng, Yuening Liu, Tian Huang et al. *Toxicology Letters*. — 2009. Vol. 189. — P. 225–234.
4. Johnson C. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. Johnson C., Galis Z.S. *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* — 2004. — Vol. 24. P. 54–60.
5. Lukes A. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. Lukes A., Mun-Bryce S., Lukes M. et al. *Mol. Neurobiol.* — 1999. V. 19. P. 267–284.
6. Mazzone P. Pathophysiological Impact of Cigarette Smoke Exposure on the Cerebrovascular System with a Focus on the Blood-brain Barrier: Expanding the Awareness of Smoking Toxicity in an Underappreciated Area. Mazzone P., Tierney W., Hossain M. et al. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. — 2010. — Vol. 7. P. 4111–4126.
7. Moro M.A. The Prediction of Malignant Cerebral Infarction by Molecular Brain Barrier Disruption Markers. Moro M.A., Leira R., Lizasoain I., Jose Castillo et al. *Stroke*. — 2005. — Vol. 36. — P. 1921–1926.
8. Rajagopalan S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability. Rajagopalan S., Meng X.P., Ramasamy S. et al. *J. Clin. Invest.* — 1996. V. 98. P. 2572–2579.

9. Shinton R. Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. Shinton R., Beevers G. *BMJ* 1989. Vol. 298. P. 789–94.
10. Xia M. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. Xia M., Leppert D., Hauser S.L. et al. *J Immunol.* – 1996. Vol. 156. P. 160–167.

Рецензенты

Соляник Е.В., д.м.н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток;

Суровенко Т.Н., д.м.н., профессор кафедры госпитальной педиатрии ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток.