

Матриксная металлопротеиназа-9, супероксиддисмутаза и перекисное окисление липидов у недоношенных новорожденных с перинатальной гипоксией

Кореновский Ю.В., Ельчанинова С.А., Фадеева Н.И.

Matrix metalloproteinase 9, superoxide dismutase and lipid peroxidation in preterm newborns with perinatal hypoxia

Korenovsky Yu.V., Elchaninova S.A., Fadeyeva N.I.

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

© Кореновский Ю.В., Ельчанинова С.А., Фадеева Н.И.

У недоношенных новорожденных перинатальная гипоксия (ПГ) ассоциируется с повышенными уровнями матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9), супероксиддисмутазы (СОД) и тиобарбитурат-реактивных продуктов в плазме пуповинной крови. Тяжесть ПГ по шкале Апгар коррелировала с СОД ($r = -0,40$; $p = 0,006$) и ММП-9 ($r = 0,36$; $p = 0,023$). Предполагается, что повышение СОД препятствует активации активными формами кислорода ММП-9, разрушающей коллаген базальной мембраны гематоэнцефалического барьера.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, супероксиддисмутаза, матриксная металлопротеиназа-9.

The perinatal hypoxia (PH) in preterm newborns is associated with elevated levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), superoxide dismutase (SOD) and thiobarbituric acid reactive substances in umbilical cord blood plasma. The severity of PH Apgar scores correlated with SOD ($r = -0,40$; $p = 0,006$) and MMP-9 ($r = 0,36$; $p = 0,023$). It is assumed that the SOD increase prevents the reactive oxygen species mediated activation of MMP-9, which destroy the collagen of the basement membrane of the blood-brain barrier.

Key words: perinatal hypoxia, superoxide dismutase, matrix metalloproteinase 9.

УДК 616-053.32-001.8:577.125:577.152.34

Введение

Перинатальная гипоксия (ПГ) остается одной из главных причин детской смертности и заболеваемости с возможными долговременными неврологическими нарушениями, такими как детский церебральный паралич, задержка умственного развития или эпилепсия [2, 6]. Внутрижелудочковые кровоизлияния и гипоксически-ишемическая энцефалопатия обусловлены главным образом гипоксически-ишемическим повреждением мозга новорожденного, в развитие которого вовлечено накопление активных форм кислорода (АФК) — оксидативный стресс [9].

В последние годы в экспериментальных исследованиях, направленных на раскрытие механизмов ги-

поксических повреждений гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), изучаются матриксные металлопротеиназы (ММП) — семейство ферментов, разрушающих белки внеклеточного матрикса [15]. Установлено, что ММП играют важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая эмбриогенез, заживление ран, воспаление, сердечно-сосудистые болезни, болезни легких и рак [3]. Один из ферментов этого семейства — ММП-9 разрушает коллаген IV типа, который является главным компонентом базальной мембраны церебрального эндотелия, и, таким образом, создает условия для миграции клеток через ГЭБ [17].

Активность ММП регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ [4]. Другими не менее важными регуляторами активности и синтеза ММП,

по данным экспериментальных исследований, являются АФК [18], эффекты которых ограничиваются энзимными и неэнзимными антиоксидантами [7]. Можно полагать, что фермент супероксиддисмутазы (СОД), инактивирующий супероксидный радикал, может предотвращать активацию и индукцию синтеза матриксных металлопротеиназ.

Цель работы — исследование взаимосвязи ММП-9 и оксидативного стресса в патогенезе перинатальной гипоксии у недоношенных новорожденных.

Материал и методы

Обследовано 66 недоношенных новорожденных с гестационным возрастом 28—34 нед, родившихся в Перинатальном клиническом центре Алтайского края (г. Барнаул). В исследование не включали новорожденных с врожденными аномалиями развития, врожденными нарушениями метаболизма, несовместимостью групп крови у матери и плода, сепсисом, сахарным диабетом у матери и родившихся в результате многоплодной беременности.

Перинатальную гипоксию диагностировали при наличии не менее двух следующих признаков: интранатальный дистресс (брадикардия плода менее 100 ударов в минуту, поздние децелерации или отсутствие вариабельности ритма сердца), не более 6 баллов по шкале Апгар на 5-й мин, необходимость в реанимационных мероприятиях в течение 1 мин [10]. В группу с ПГ вошли 47 младенцев, в контрольную — 19. Клиническая характеристика новорожденных представлена в табл. 1.

Таблица 1

Клиническая характеристика новорожденных			
Показатель	Группа новорожденных с ПГ	Контрольная группа	<i>p</i>
Гестационный возраст, нед	32,5 ± 1,68 (28—34)	33,3 ± 0,79 (32—34)	0,231
Пол:			0,293
мужской	18	10	
женский	29	9	
Масса тела при рождении, кг	1,99 ± 0,407 (1,3—2,5)	2,06 ± 0,325 (1,56—2,66)	0,680
Баллы по Апгар на 1-й мин	5,8 ± 1,38 (1,0—8,0)	6,3 ± 0,45 (6,0—7,0)	0,354
Баллы по Апгар на 5-й мин*	6,9 ± 0,82 (5,0—8,0)	6,9 ± 0,41 (6,0—8,0)	0,962
Число новорожденных, у которых проводилась искусственная вентиляция легких	24	0	—
Число способов родоразрешения:			0,247

кесарево сечение	25	10
вагинальные роды	22	9

* У двоих новорожденных с ПГ оценки состояния по шкале Апгар на 5-й мин не проводилось в связи с экстренным проведением реанимационных мероприятий.

В плазме пуповинной крови определяли активность СОД с использованием набора реактивов фирмы Dojindo (Япония); концентрацию ММП-9 иммуноферментным методом тест-системой фирмы Ray Biotech (США). Оксидативный стресс оценивали по концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — тиобарбитурат-реактивных продуктов (ТБРП) [1], которые измеряли с использованием реактивов фирмы ZeptoMetrix Corporation (США).

Статистический анализ проводили с помощью программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Межгрупповые различия количественных признаков анализировали с использованием *U*-теста Манна—Уитни. Межгрупповые различия качественных признаков оценивали с использованием критерия χ^2 . Корреляции признаков оценивали по *r*-критерию Спирмена. Результаты представлены в виде выборочного среднего *M* с указанием стандартного отклонения σ и интервала значений. Для всех использованных статистических критериев принят критический уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

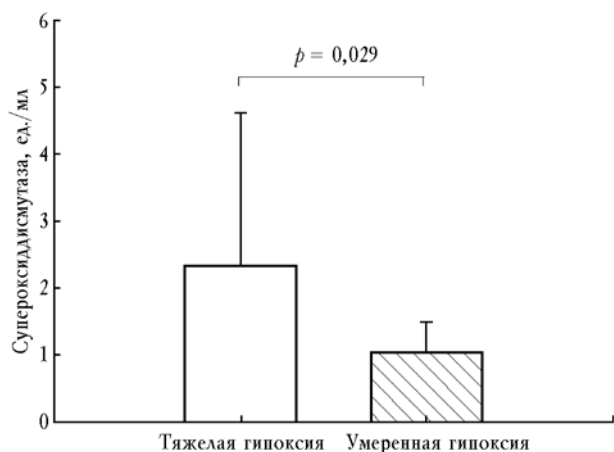
Уровни ММП-9, СОД и ТБРП в плазме пуповинной крови были повышены у новорожденных с ПГ по сравнению с новорожденными контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Уровни матриксной металлопротеиназы-9, супероксиддисмутазы и тиобарбитурат-реактивных продуктов в плазме пуповинной крови недоношенных новорожденных с перинатальной гипоксией			
Показатель	Группа новорожденных с ПГ	Контрольная группа	<i>p</i>
Матриксная металлопротеиназа-9, нг/мл	366 ± 83 (41 ребенок)	190 ± 30 (19 детей)	<0,001
Супероксиддисмутазы, ед./мл	1,55 ± 0,58 (46 детей)	0,52 ± 0,18 (19 детей)	<0,001
Тиобарбитурат-реактивные продукты, нмоль/мл	51,6 ± 20,5 (30 детей)	33,4 ± 20,1 (11 детей)	0,015

У новорожденных с ПГ активность СОД обратно коррелировала с тяжестью состояния по шкале Апгар на 1-й мин ($r = -0,40$; $p = 0,006$; $n = 46$), тогда как кон-

центрация ММП-9 положительно коррелировала с количеством баллов по шкале Апгар на 5-й мин ($r = 0,36$; $p = 0,023$; $n = 39$). С другой стороны, в плазме крови новорожденных с тяжелой ПГ (по шкале Апгар на 1-й мин не более 5 баллов) по сравнению с новорожденными с умеренной гипоксией была повышена и варьировала в большем диапазоне значений активность СОД (рисунок). У двоих новорожденных с тяжелой гипоксией уровни исследованных показателей были максимальными: у одного пациента — 1 балл по шкале Апгар на 1-й мин, ММП-9 501,8 нг/мл, СОД 4,65 ед./мл, ТБРП 62,3 нмоль/мл; у второго пациента — 4 балла по шкале Апгар на 1-й мин, ММП-9 474,9 нг/мл, СОД 3,84 ед./мл, ТБРП 69,8 нмоль/мл. Обоим новорожденным проводились экстренные реанимационные мероприятия.



Активность супероксиддисмутазы в плазме пуповинной крови недоношенных новорожденных с тяжелой (18 детей) и умеренной (28 детей) перинатальной гипоксией

Обсуждение

В состоянии гипоксии в организме недоношенных новорожденных развивается оксидативный стресс, обусловленный повышенной продукцией АФК и незрелостью антиоксидантной системы [5]. Установлено, что в развитии гипоксически-ишемической энцефалопатии и внутрижелудочковых кровоизлияний при ПГ важную роль играет вызванное АФК свободно-радикальное окисление биомолекул [9]. Кроме того, в последние годы показано, что АФК являются регуляторами активности ряда ферментов, включая ММП, а через окисление специфических тиольных групп белков могут изменять конформацию белковых факторов транскрипции, что приводит к их активации или инги-

бированию [7]. Так, прямое активирующее действие АФК на ММП наблюдалось при инкубации очищенных предшественников внеклеточных матриксных металлопротеиназ про-ММП-2 и про-ММП-9 гладких миоцитов человека с системой ксантин — ксантиноксидаза [20]. Показано, что пероксид водорода и другие АФК вызывают транслокацию в ядро активаторного протеина-1, ядерного фактора транскрипции κВ (NF-κВ) и фактора транскрипции ERK ½ с последующим повышением активности ММП. С другой стороны, сообщалось о том, что ММП-9 индуцировала отек мозга и постишемическое повреждение ГЭБ [13, 21, 24], а повышенная концентрация ММП-9 в плазме является предиктором неврологических нарушений у новорожденных с асфиксией [23]. И, напротив, ингибирование ММП-9 и нокаут гена *ММП-9* в эксперименте снижали постишемическое повреждение мозга [21, 24].

Учитывая эти факты, а также данные о подавлении активации ММП-9 неферментным антиоксидантом N-ацетилцистеином в системе *in vitro* [12], возникло предположение, что антиоксидантные ферменты, включая СОД, которая выполняет роль первой линии защиты тканей от АФК [11], способны ограничить возможно развивающуюся при ПГ неадекватную активацию и синтез ММП и тем самым предотвратить их повреждающее действие на ГЭБ при перинатальной гипоксии. Для проверки гипотезы о взаимодействии антиоксидантной системы с системой ММП в патогенезе перинатальной гипоксии были измерены концентрации ММП-9 и ТБРП одновременно с активностью СОД в плазме крови двух групп недоношенных новорожденных с ПГ и без клинических признаков ПГ.

Проведенные исследования подтвердили уже известные факты об активации перекисного окисления липидов при ПГ — выявлено повышение концентрации ТБРП в плазме крови недоношенных новорожденных с гипоксией. Увеличенные концентрации ММП-9 в плазме крови недоношенных новорожденных с гипоксией свидетельствуют об активации процессов разрушения внеклеточного матрикса кровеносных сосудов при ПГ у недоношенных новорожденных. Корреляция концентрации ММП-9 с баллами по шкале Апгар на 5-й мин может быть обусловлена зрелостью системы ММП, как известно, нарастающей в период развития

плода [22]. Повышенную активность СОД в плазме крови недоношенных новорожденных с гипоксией можно объяснить либо адаптивной индукцией синтеза этого антиоксидантного фермента АФК, либо выходом его из цитоплазмы поврежденных клеток. Высокая активность СОД была ассоциирована с низкими баллами по шкале Апгар на 1-й мин жизни новорожденного, что свидетельствует о недостаточности активации антиоксидантной системы в ответ на оксидативный стресс.

Заключение

Обнаружен феномен корреляции между биохимическими признаками усиления процессов повреждения тканей новорожденных с ПГ (повышенный уровень ММП-9 и ТБРП) и антиоксидантным ферментом (СОД), а также связи между уровнем этих молекул в пуповинной крови с клиническим состоянием новорожденных. Представляется перспективным дальнейшее изучение этих взаимосвязей патогенетически значимых повреждающих и протективных факторов ПГ, направленное на создание основы для развития новых стратегий терапии индуцированных гипоксией неврологических нарушений.

Литература

1. *Armstrong D., Browne R.* The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory // *Free Radic. Diagnostic Med.* 1994. V. 366. P. 43—58.
2. *Boichot C., Walker P.M., Durand C. et al.* Term neonate prognoses after perinatal asphyxia: contributions of MR imaging, MR spectroscopy, relaxation times, and apparent diffusion coefficients // *Radiology* 2006. V. 239. P. 839—848.
3. *Chakraborti S., Mandal M., Das S. et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: an overview // *Mol. Cell Biochem.* 2003. V. 253. P. 269—285.
4. *Cunningham L.A., Wetzel M., Rosenberg G.A.* Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia // *Glia.* 2005. V. 50. P. 329—339.
5. *Dennerly P.A.* Role of redox in fetal development and neonatal diseases // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. V. 6. P. 147—153.
6. *Dilenge M.E., Majnemer A., Shevell M.I.* Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates // *J. Child Neurol.* 2001. V. 16. P. 781—792.
7. *Dröge W.* Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 47—95.
8. *Fattman C.L., Schaefer L.M., Oury T.D.* Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 35, № 3. P. 236—256.

9. *Ferriero D.M.* Neonatal brain injury // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 351. P. 1985—1995.
10. *Florio P., Perrone S., Luisi S. et al.* Increased plasma concentrations of activin A predict intraventricular hemorrhage in preterm newborns // *Clin. Chem.* 2006. V. 52, № 8. P. 1516—1521.
11. *Fridovich I.* Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, № 30. P. 18515—18517.
12. *Galis Z.S., Khatri J.J.* Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly // *Circ. Res.* 2002. V. 90. P. 251—262.
13. *Gasche Y., Fujimura M., Morita-Fujimura Y. et al.* Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood—brain barrier dysfunction // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999. V. 19. P. 1020—1028.
14. *Gazzolo D., Abella R., Marinoni E. et al.* Circulating biochemical markers of brain damage in infants complicated by ischemia reperfusion injury // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2009. V. 7. P. 108—126.
15. *Greenlee K.J., Werb Z., Kheradmand F.* Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. P. 69—98.
16. *Lacraz S., Nicod L.P., Chicheportiche R. et al.* IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 96. P. 2304—2310.
17. *Lukes A., Mun-Bryce S., Lukes M. et al.* Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases // *Mol. Neurobiol.* 1999. V. 19. P. 267—284.
18. *Nelson K.K., Melendez J.A.* Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. V. 37, № 6. P. 768—784.
19. *Peskin A.V., Winterbourn C.C.* A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1) // *Clinica Chimica Acta.* 2000. V. 293. P. 157—166.
20. *Rajagopalan S., Meng X.P., Ramasamy S. et al.* Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro: implications for atherosclerotic plaque stability // *J. Clin. Invest.* 1996. V. 98. P. 2572—2579.
21. *Romanic A.M., White R.F., Arleth A.J. et al.* Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size // *Stroke.* 1998. V. 29. P. 1020—1030.
22. *Schulz C.G., Sawicki G., Lemke R.P. et al.* MMP2 and MMP9 and their tissue inhibitors in the plasma of preterm and term neonates // *Pediatr. Res.* 2004. V. 55. P. 794—801.
23. *Sunagawa S., Ichiyama T., Honda R. et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia // *Brain & Development.* 2009. V. 31. P. 588—593.
24. *Svedin P., Hagberg H., Savman K. et al.* Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia—ischemia // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 1511—1518.

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Утверждена к печати 16.02.2011 г.

Сведения об авторах

Кореновский Ю.В., Ельчанинова С.А., Фадеева Н.И.

ММП-9, СОД и ПОЛ у недоношенных новорожденных с ПГ

Ю.В. Кореновский — канд. мед. наук, ассистент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики АГМУ (г. Барнаул).

С.А. Ельчанинова — д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики АГМУ (г. Барнаул).

Н.И. Фадеева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии № 1 АГМУ (г. Барнаул).

Для корреспонденции

Кореновский Юрий Владимирович, тел.: (3852) 26-07-02, e-mail: timidin@gmail.com