

## ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 616.831-001-092:612.017+577.1

ЗВ'ЯЗОК АКТИВАЦІЇ ПРОТЕОЛІЗУ ТА  
МАКРОФАГАЛЬНОЇ ІНФІЛЬТРАЦІЇ  
ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ

Юзьків Я. С.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

*Матриксні металопротеїнази відіграють суттєву роль в реорганізації міжклітинного матриксу та регуляції проникності гемато-енцефалічного бар'єру при черепно-мозковій травмі. У роботі було визначено, що значний приріст MMP-9 з максимальним збільшенням на 7-му добу відбувався внаслідок вираженої макрофагальної інфільтрації гемато-лікворного бар'єру. Активація MMP-9 також була обумовлена недостатністю її інгібітору TIMP-1.*

**Ключові слова:** черепно-мозкова травма, макрофагальна інфільтрація, гемато-лікворний бар'єр, MMP-9, TIMP-1, CD68+

**Вступ.** Рівень травм головного мозку в Україні лишається високим у всьому світі, а в різних регіонах України коливається від 2 до 6 на 1000 населення [1, 2]. Найбільш високий рівень черепно-мозкової травми (ЧМТ) спостерігається у чоловіків віком від 20 до 40 років, тобто найбільш працездатного населення [2, 3]. Ключовим моментом розвитку пошкодження головного мозку при ЧМТ є порушення гемато-енцефалічного бар'єру (ГЕБ), яке призводить до клітинної інфільтрації, розвитку імуносупресії або надмірної активації імуніцитів [4]. Підвищення його проникності, лейкоцитарна інфільтрація ушкоджених тканин мозку, генерація прозапальних цитокінів, метаболітів арахідонової кислоти, активація системи комплементу запускають системну та місцеву імунну відповідь [5]. На наш погляд, це може запускати розвиток аутоімунної агресії, що є додатковим фактором патогенезу імунних розладів при ЧМТ. Особливого значення як в підвищенні проникності гемато-енцефалічного бар'єру, так і в процесі реорганізації тканинного матриксу, що супроводжується клітинною інфільтрацією, мають матриксні металопротеїнази (MMP) та їх тканинний інгібітор (TIMP) [6, 7].

**Мета роботи:** в експерименті дослідити взаємозв'язки матриксної металопротеїнази (MMP-9) та її тканинного інгібітору (TIMP-1) з макрофагальною інфільтрацією тканини головного мозку при ЧМТ.

**Матеріали та методи.** Експериментальна ЧМТ відтворена за моделлю В. М. Єльського, С. В. Зябіщева (2005) [8]. Для даного експерименту було використано 98 статевозрілих шурів-самців, що знаходилися в стандартних умовах віварію при вільному доступі до їжі та води. При моделюванні ЧМТ використовували пристрій, який дозволяв наносити по фіксованій голові тварини концентрований удар вантажем масою 67 г шляхом вільного падіння з висоти 65 см [8]. ЧМТ, що була

відтворена у тварин була закритою та мала середньоважкий ступінь. Контрольну групу склали 30 хібнотравмовані тварин. Всі експерименти на тваринах проводили з дотриманням вимог "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985 р.). Для визначення імуноферментним методом в зразках плазми крові вмісту MMP-9 та TIMP-1 використовували набори реактивів Bender Medsystems (Австрія). На 7 добу головний мозок, що отримали при декапітації під загальною анестезією, фіксували у розчині нейтрального забуференого формальдегіду (рН 7,4) та після заливки у парафін робили зрізи завтовшки 3-4 мкм. Зрізи досліджували за допомогою мікроскопу «Olympus BX 40» із цифровою камерою «Olympus C3030-ADU» та C200o ZOOM, «Olympus BX 43» з цифровою камерою «Olympus SC100» та програмним забезпеченням «Olympus DP-Soft». Для проведення імуногістохімічної (ІГХ) реакції на зрізі після «демаскування» антигенів та обробки протеїназою К наносили первинні антитіла – CD68+ (DAKO). Візуалізацію антитіл виконували за допомогою високочутливої полімерної системи детекції DAKO Poly Vue HRP/DAB. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA).

**Результати та обговорення.** Аналіз динаміки рівня MMP-9 у сироватці крові травмованих тварин в різні строки після ЧМТ показав, що вже з першої доби вміст протеїнази статистично значуще збільшився на 38,2 % ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контрольною групою (рис. 1).

На 3-ю добу рівень MMP-9 суттєво збільшився (більш ніж у 5 разів) і продовжував стрибкоподібно збільшуватися й на 7-му добу, коли він досяг свого максимуму (у 7,2 рази у порівнянні з контрольною групою). На наш погляд така реакція була пов'язана із значенням метало-

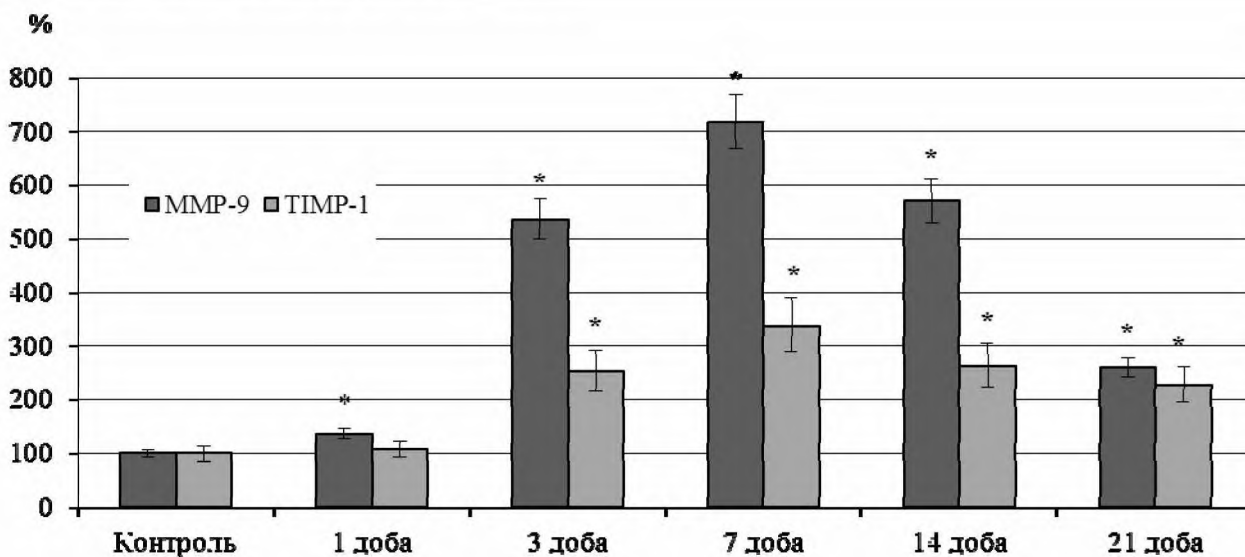


Рис. 1. Динаміка (у % до контрольних значень) рівнів MMP-9 та TIMP-1 після ЧМТ; \* –  $p < 0,05$  при порівнянні середніх величин з контрольною групою

ротейназу у реорганізації міжклітинного матриксу, особливо за умов нейрозапалення. Так, під дією MMP-9 відбувається реструктуризація базальної мембрани мікросудин і збільшення проникності гемато-енцефалічного бар'єру [9]. Компоненти базальної мембрани (фібронектин, ламінін, гепаран-сульфат) є біологічними субстратами для металопротеїназ. Крім того, збільшення MMP-9 має прямий зв'язок із ступенем проникності ГЕБ та визиває пряму деструкцію основного білку шваннівської оболонки – мієліну [10].

Протягом перших часів після травми відбувається залучення нейтрофілів з крові до місця ушкодження, а в подальші строки – відбувається активація макрофагів. Тож стрибкоподібний приріст MMP-9, необхідний для активної перебудови матриксу нервової тканини і міжклітинної кооперації в умовах ЧМТ, сприяє ще й активації макрофагів.

На наш погляд, компенсаторна на початку реакція активації протеїнази, що спрямоване на забезпечення міграції клітин в зону ушкодження, в подальшому може бути причиною посилення деструктивних процесів, що й може відбуватися на 7-му добу після травми.

На 14-у та 21-у добу спостерігалось прогресуюче зменшення MMP-9 але її рівень лишився суттєво вищим за контрольний. Це відображало, на наш погляд, затухання активації протеолітичних систем та свідчило, що максимум цієї реакції приходився саме на 7-му добу після травми.

Можливість гіперактивації протеоліза підтверджували дані по динаміці у крові рівню інгібітору матриксної металопротеїнази TIMP-1. Його рівень підвищується внаслідок збільшення активності MMP-9 й обмежує реакцію гіперактивації шляхом зв'язування з каталітичним сайтом та утворенням щільного комплексу з MMP-9 [10].

На 1-у добу (див. рис. 1) рівень TIMP-1 залишався в межах контрольних величин, можливо – у зв'язку з

відносно незначним збільшенням MMP-9. На 3-ю та 7-у добу стрибкоподібне збільшення металопротеїнази стало причиною відповідного зростання TIMP-1. Але рівень такого зростання суттєво відставав від зростання рівню MMP-9. Активність MMP-9 у ці строки «вислизала» від гальмуючого впливу TIMP-1. Отже, механізмом гіперактивації MMP-9 могло бути недостатність антипротеолітичної системи за умов ЧМТ.

Zhang H. зі співавторів (2010) допускають, що імовірним джерелом MMP-9 при ЧМТ є нейтрофіли, що надходять з системою циркуляції та інфільтрують уражену тканину мозку; на мембрані нейтрофілів є рецептори до проферменту про-MMP-9 і блокада даних рецепторів призводить до порушення міграції нейтрофілів [10]. Крім того, в експериментальній роботі J. Y. Hsu зі співавторів (2008) показано, що металопротеїнази, зокрема MMP-9, приймають участь в активації та міграції астроцитів та формуванні гліальних рубців при травматичному ушкодженні спинного мозку [11].

У зв'язку з цими міркуваннями було проведено вивчення результатів ІГХ-реакції з маркером макрофагів CD68+ на 7-му добу після травми. Результати показали, що мала місце відсутність специфічного забарвлення у тканині мозку у супраоптичному ядрі переднього гіпоталамусу (рис. 2). Також і в інших структурах головного мозку специфічного забарвлення виявлено не було. Це вказувало на те, що міграції макрофагів у нейропіль у посттравматичному періоді не відбувалося.

На відміну від цього, ІГХ-реакція на маркер CD68+ у судинному сплетінні показало наявність багаточисельних імунопозитивних клітин з вираженим специфічним забарвленням, які переважно візуалізувалися у просвіті судин (рис. 3).

Деякі імунопозитивні клітини виходили з судин у підендотеліальний шар. При цьому видно, що у клітинах

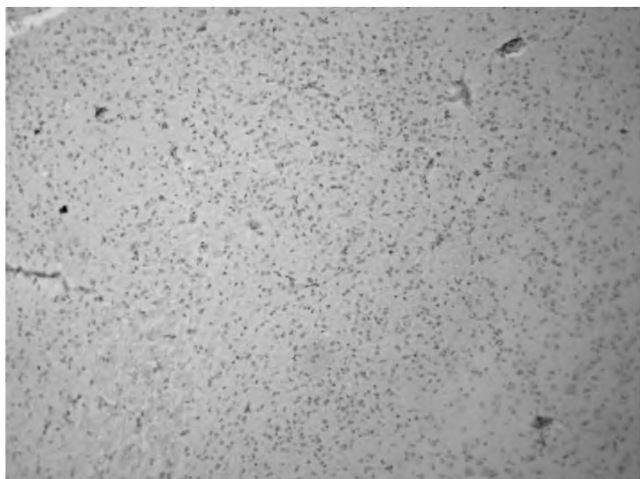


Рис. 2. Імуно-гістохімічне дослідження маркера CD68+ при ЧМТ; супротивне ядро гіоталамусу; відсутність специфічного забарвлення у тканині мозку; x100

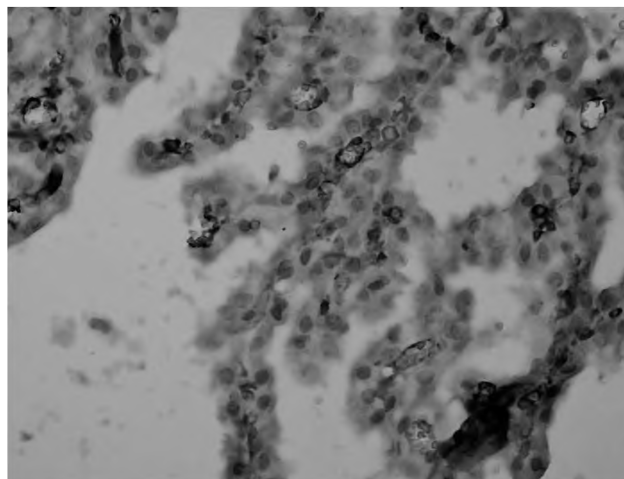


Рис. 3. Імуно-гістохімічне дослідження маркера CD68+ при ЧМТ; судинне спленіння; у просвіті судин багаточисельні імунопозитивні клітини; x100

ендотелію має місце виражений набряк, вони збільшені у розмірах, розташовуються не дуже щільно. Ядра також мають гідропічні зміни. Просвіти капілярів збільшені, судини «зіяють», має місце потовщення базальної мембрани та її набряк.

Всі ці зміни вказують на порушення структури та, відповідно, функції гемато-лікворного бар'єру на 7-му добу після травми. Має місце розривлення базальної мембрани, набухання ендотеліоцитів, що свідчить про підвищення його проникності. З наведених даних однозначно свідчить, що ці зміни пов'язані із макрофагальною інфільтрацією гемато-лікворного бар'єру, що, на наш погляд щільно пов'язано із активацією протеолізу внаслідок збільшення активності MMP-9 та недостатністю її інгібітору TIMP-1.

#### Висновки

З першої доби після травми відбувається ініціація збільшення MMP-9 з максимумом на 7-му добу після травми. Це пов'язано з вираженою макрофагальною інфільтрацією гемато-лікворного бар'єру та недостатністю антипротеолітичної системи. При цьому макрофагальної інфільтрації нервової тканини відмічено не було.

Немає ніякого конфлікту інтересів який міг би завдати шкоди неупередженості дослідження. Дане дослідження не отримало ніякої фінансової підтримки від державної, громадської чи комерційної організації.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Григорова І. А. Аспекти використання протисудомних препаратів у лікуванні хворих, які перенесли черепно-мозкову травму / І. А. Григорова, Н. С. Куфтеріна // *Міжнародний неврологічний журнал*. – 2014. – № 1 (63). – С. 134-138.
2. Победенный А. Л. Распространенность и структура черепно-мозговой травмы в крупном промышленном регионе // *Укр. нейрохірургічний журн.* – 2011. – № 3. – С. 32-35.
3. Peeters W. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe / W. Peeters, R. van den Brande, S. Polinder et al. // *Acta Neurochir.* – 2015. – Vol. 157, № 10. – P. 1683-1696.
4. Зяблицев С. В. Патогенетическая значимость иммунологических нарушений при сочетанной черепно-мозговой травме и турникетной токсемии / С. В. Зяблицев, Ю. Я. Крюк, С. Е. Золотухин, А. В. Нечепорчук // *Патология*. – 2013. – № 3. – С. 56-60.
5. Guilfoyle M. R. Matrix metalloproteinase expression in confusional traumatic brain injury: A Paired Microdialysis Study / M. R. Guilfoyle, K. L. Carpenter, A. Helmy et al. // *J. Neurotrauma*. – 2015. – Vol. 32, № 20. – P. 1553-1559.
6. Рогова Л. Н. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) / Л. Н. Рогова, Н. В. Шестернина, Т. В. Замечник, И. А. Фастова // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2011 – Т. XVIII, № 2 – С. 86-89.
7. Guilfoyle M. R. Matrix metalloproteinase expression in confusional traumatic brain injury: A Paired Microdialysis Study / M. R. Guilfoyle, K. L. Carpenter, A. Helmy et al. // *J. Neurotrauma*. – 2015. Vol. 32, № 20. P. 1553-1559.
8. Ельський В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельський, С. В. Зяблицев – Донецк: Изд-во «Новый мир», 2008. – 140 с.
9. Lorente L. New prognostic biomarkers in patients with traumatic brain injury / Lorente L. // *Arch. Trauma Res.* – 2015. – Vol. 4, № 4. – e30165. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848476>
10. Zhang H. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes / H. Zhang, H. Advanikar, Z. Werb, L. J. Noble-Haeusslein // *Neuroscientist*. – 2010. – Vol. 16 (2). – P. 156-170.
11. Hsu J. Y. Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord / J. Y. Hsu, L. Y. Bourguignon, C. M. Adams et al. // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28, № 50. – P. 13467-13477.

**СВЯЗЬ АКТИВАЦИИ ПРОТЕОЛИЗА  
И МАКРОФАГАЛЬНОЙ ИНФИЛЬТРАЦИИ  
ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

Юзькив Я. С.

*Национальный медицинский университет  
имени А. А. Богомольца, г. Киев, Украина*

Матриксные металлопротеиназы играют существенную роль в реорганизации межклеточного матрикса и регуляции проницаемости гемато-энцефалический барьер при черепно-мозговой травме. В работе было определено, что значительный прирост MMP-9 с максимальным увеличением на 7-е сутки происходило вследствие выраженной макрофагальной инфильтрации гемато-ликворного барьера. Активация MMP-9 также была обусловлена недостаточностью ее ингибитора TIMP-1.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, макрофагальная инфильтрация, гемато-ликворный барьер, MMP-9, TIMP-1, CD68 +

**CONTACT ACTIVATION PROTEOLYSIS AND  
MACROPHAGE INFILTRATION IN TRAUMATIC  
BRAIN INJURY**

Ya.S. Yuzkiv

*National Medical Bogomolets University, Kiev, Ukraine*

Matrix metalloproteinases play a significant role in the reorganization of the extracellular matrix and regulation of the blood-brain barrier permeability in traumatic brain injury. In this work it was found that a significant increase in MMP-9 as large as possible on the 7th day was due to marked macrophage infiltration of the blood-CSF barrier. Activation of MMP-9 was also due to its lack of TIMP-1 inhibitor.

**Keywords:** traumatic brain injury, macrophage infiltration, the blood-cerebrospinal fluid barrier, of MMP-9, of TIMP-1, CD68 +