

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.16.018:611.813.12:616.12-008.331.1:599.323.4

Н. В. Захарчук¹, В. М. Черток², В. А. Невзорова¹, А. Г. Черток²

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЖЕЛАТИНАЗ И ИХ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ В КАПИЛЛЯРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА У НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

¹ Институт терапии и инструментальной диагностики (зав. — проф. В. А. Невзорова), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. М. Черток), ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Владивосток

Цель — изучить распределение матричных металлопротеиназ — желатиназ MMP-2 и MMP-9, а также их тканевых ингибиторов TIMP-2 и TIMP-1 в капиллярах головного мозга крыс при реноваскулярной гипертензии.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах линии Вистар (35 особей), у которых моделировали реноваскулярную гипертензию (РВГ) путем перевязывания левой почечной артерии и вены. Иммуногистохимическое исследование ферментов MMP-2, MMP-9, TIMP-2 и TIMP-1 проводили в капиллярах коры и белого вещества большого мозга через 2, 4, 6, 8, 12, 16 и 20 нед после развития РВГ (по 5 животных в каждой группе). Об уровне экспрессии каждого из исследуемых ферментов судили на основании концентрации иммунопозитивных капилляров, после чего рассчитывали величину показателя MMP-2/TIMP-2 и MMP-9/TIMP-1 в коре и белом веществе головного мозга.

Результаты. MMP-2 и TIMP-2 выявляются в капиллярах коры и белого вещества большого мозга как у контрольных животных, так и при развитии РВГ, в то время как MMP-9 и TIMP-1 — только у гипертензивных крыс. Число капилляров с экспрессией MMP-2 максимально возрастает на 2-й неделе, MMP-9 — на 12-й неделе развития РВГ, тогда как содержание TIMP-2- и TIMP-1-позитивных капилляров в указанные временные периоды сокращается до минимального уровня, что приводит к значительным изменениям показателей MMP/TIMP.

Выводы. При развитии РВГ нарушается баланс между металлопротеиназами и их тканевыми ингибиторами, показателем чего может служить изменение отношения MMP/TIMP в капиллярах коры и белого вещества большого мозга. Эти процессы могут привести к деструктивным изменениям гематоэнцефалического барьера и повышению риска развития осложнений при артериальной гипертензии.

Ключевые слова: капилляры большого мозга крыс, матричные металлопротеазы, тканевые ингибиторы металлопротеаз, реноваскулярная гипертензия

Согласно последним данным, внеклеточный матрикс участвует не только в ремоделировании клеточных образований мозга, но и в значительной степени определяет функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [1, 8, 14]. Описаны большое количество молекулярных индукторов, регуляторов и сигнальных систем, детерминирующих состояние внеклеточного матрикса, однако ведущая роль в этом процессе неизменно отводится двум группам белков: матричным металлопротеиназам (matrix metalloproteinases, MMP) и их тканевым ингибиторам (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMP) [5, 7]. Вызывая расщепление белка ZO-1 в эндотелии и деструкцию базальной мембраны, они повышают проницаемость ГЭБ, способствуют развитию отека и воспаления в нервной ткани [9, 15].

В настоящее время идентифицированы более тридцати представителей обширного семейства MMP, однако для некоторых из них до сих

пор не определена физиологическая роль, которая может зависеть не только от вида ткани, но и от локальной экспрессии конститутивной или индуцибельной форм этих энзимов. Активность конститутивных форм MMP наиболее высока во время эмбриогенеза, но после рождения быстро снижается и остается достаточно низкой на протяжении всей жизни [4]. Экспрессия индуцибельных MMP чаще всего ассоциируется с различными процессами, требующими модификации внеклеточного матрикса, биологическое значение которого в этих случаях сводится к локализации участка поражения [1, 6]. MMP модулируют деградацию компонентов внеклеточного матрикса посредством связывания со специфическими рецепторами, экспрессия которых, в свою очередь, опосредуется рядом провоспалительных цитокинов, нейропептидов, интегринов, факторов роста и индукторов апоптоза [11, 12].

Сведения об авторах:

Захарчук Наталья Владимировна (e-mail: zaharchuknat@mail.ru), Невзорова Вера Афанасьевна, Институт терапии и инструментальной диагностики, Черток Виктор Михайлович (e-mail: chertokv@mail.ru), Черток Алевтина Геннадьевна, кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

Матриксные металлопротеиназы — это универсальные эндопептидазы, среди которых желатиназы (ММР-2 и ММР-9) играют особенно важную роль в физиологических и патологических процессах в мозгу [3, 4, 13]. Все они синтезируются в виде профермента (про-ММР) и могут секретироваться в латентной форме. Активация профермента происходит с участием ряда протеаз вне клетки или на ее поверхности [12]. Представители желатиназ отвечают за деградацию коллагенов IV и V типов, эластина, фибронектина, ламинина и желатина, входящих в состав базальной мембраны капилляров и обеспечивающих механическую прочность и эластичность сосудистой стенки [11]. Концентрация желатиназ в тканях зависит как от уровня экспрессии их генов, так и активности тканевых ингибиторов — ТИМР-1, в большей степени ингибирующего ММР-9, и ТИМР-2 — ММР-2 [7]. Помимо ТИМР, чрезмерная экспрессия металлопротеиназ может подавляться гепарином, поступающим из тучных клеток наружной оболочки сосудов или периваскулярной ткани [2, 3], а также глюкокортикоидами, эстрогенами, прогестероном [10].

Несмотря на то, что ММР-2 и ММР-9 относятся к одному подсемейству металлопротеиназ и обладают сходной субстратной специфичностью, в организме они выполняют разные функции. При патологии активируется ММР-9, которая относится к индуцибельным ферментам [1, 8]. При поражении головного мозга усиление экспрессии ММР-9 отмечено во всех элементах, составляющих нейрососудистые единицы: эндотелиоцитах, нейронах, глии [4, 15]. ММР-2 представляет собой конститутивную форму желатиназ и, по некоторым данным, не является значимым фактором в патогенезе заболеваний нервной системы [13]. Однако при ишемическом инсульте в эндотелии капилляров коры и глиальных клетках наблюдается повышение экспрессии ММР-2 и сокращение ТИМР-2 [13].

Цель настоящей работы состояла в изучении распределения ММР-2 и ММР-9, а также их тканевых ингибиторов (ТИМР-2 и ТИМР-1) в капиллярах головного мозга крыс при развитии реноваскулярной гипертензии.

Материал и методы. Исследование проведено на половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–240 г с вызванной реноваскулярной гипертензией (n=35). В качестве контроля использовали ложнопериорированных крыс (n=5) с нормальными показателями (108,6±4,9 мм рт. ст.) артериального давления (АД), содержащихся на стандартном рационе в одинаковых условиях лабораторного вивария. Для моделирования реноваскулярной гипертензии (РВГ) у крыс под эфирным наркозом выделяли правую и левую почки, под сосудистую ножку левой почки заводили лигатуру

и перевязывали почечные артерию и вену. Правую почку прошивали восьмьюобразным хирургическим швом на границе верхней и средней трети. Затем рану ушивали и проводили ее послеоперационную обработку. Крыс с РВГ изучали через 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 нед (по 5 животных в каждой группе) после операции, когда АД достигало устойчиво высокого уровня (135–168 мм рт. ст.). АД измеряли при помощи неинвазивного мониторинга кровяного давления у крыс ML U/4c501 методом хвостовой манжеты (MedLab, China). Крыс анестезировали внутривенным введением рометара (Xylazinum, Spora, Praha) в концентрации 5,5 мг/кг, после чего выводили из эксперимента путем декапитации. Головной мозг извлекали из полости черепа, фиксировали при 4 °С в течение 4 ч в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М натрийфосфатном буфере (рН 7,4) и заливали в парафин. Объектом исследования служили капилляры коры и прилежащего к ней белого вещества теменной доли конечного мозга. Экспериментальные манипуляции производили в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и Хельсинкской декларации 1975 г., в том числе с ее пересмотренным вариантом от 2008 г. Протокол исследования был одобрен на заседании Междисциплинарного комитета по этике ГБОУ ВПО ТГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.06.2014 г.

Для изучения капилляров использовали метод иммунопероксидазной реакции для выявления ММР-2, ММР-9, ТИМР-1 и ТИМР-2. Для этих целей применяли первичные антитела anti-MMP-2 и -9 (rabbit polyclonal, ThermoScientific, rb-9234-p, 1:200, США), anti-TIMP-1 и -2 (rabbit polyclonal, Abcam, ab61224, 1:100, Великобритания), биотинилированные вторичные антитела (ThermoScientific, США), стрептавидинпероксидазу (ThermoScientific, США) и хромоген (Peroxidase Substrate Kit, Vector NovaRED, SK-4800, США). Инкубацию с первичными антителами осуществляли при 4 °С, обработку вторичными антителами и хромогеном выполняли в соответствии с рекомендациями фирм-производителей. Для оценки специфичности реакции окрашивание отдельных срезов проводили без первичных или вторичных антител. На контрольных срезах иммунопозитивная реакция отсутствовала. Иммуногистохимическое исследование выполняли на серийных депарфинированных срезах мозга толщиной 7 мкм. Срезы монтировали таким образом, чтобы на стекле одновременно находились образцы, полученные от контрольных и экспериментальных животных каждой группы. Препараты просматривали под микроскопом AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Об уровне экспрессии каждого из исследуемых ферментов в капиллярных сетях судили на основании удельной плотности иммунопозитивных капилляров (число фрагментов из расчета на 1 мм²) в 5 неперекрывающихся полях зрения микроскопа (об. 40) в одноименных полушариях мозга, после чего производили расчет отношения ММР-2/ТИМР-2, как это было описано ранее [5]. Для корректировки освещенности изображения использовали попиксельное вычитание снимка фона из фотографии. Количественную обработку проводили на 5 последовательных срезах каждого образца с использованием автоматизированной системы анализа изображения ImageScore (Leica, Германия). Данные количественного анализа представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке образцов каждого животного. Для оценки значимости циф-

ровых данных применяли *t*-критерий Стьюдента. Различия между средними показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Иммуногистохимический маркер ММР-2 и ТИМР-2 выявляется в капиллярах коры и белого вещества мозга как у контрольных животных (рис. 1, а, б), так и при развитии у них РВГ (см. рис. 1, в, г), ММР-9 и ТИМР-1 — только у гипертензивных крыс (см. рис. 1, д–з). В иммунопозитивных сосудах преципитат откладывается в виде мелких гранул, окрашивая стенку капилляров в различные оттенки коричневого цвета. Подсчеты показывают, что у контрольных животных между капиллярами, маркированными ММР-2 и ТИМР-2, не определяется значимых отличий удельной плотности ни в коре, ни в белом веществе (рис. 2, а, б), в связи с чем показатель ММР-2/ТИМР-2 в соответствующих образованиях мозга колеблется около единицы (рис. 3, а).

Развитие гипертензии у крыс сопровождается разнонаправленными процессами изменений количественных показателей: увеличением ММР-2 и сокращением ТИМР-2 (см. рис. 2, а, б). В первые 4 нед наблюдений установлены особенно выраженные отклонения обоих показателей от контрольных цифр. В этот период на срезах теменной доли можно видеть многочисленные фрагменты ММР-2-позитивных капилляров, часть из которых, окрашенных в темно-коричневый цвет, отличаются высокой интенсивностью реакции (см. рис. 1, в). Изменения в большей степени затрагивают капилляры коры, в результате чего на 2–4-й неделе развития РВГ различия величины количественных показателей между ММР-2-позитивными капиллярами коры и белого вещества достигают наиболее высокого уровня (см. рис. 2, а, б). С 6-й недели величина обоих показателей в коре и белом веществе быстро уменьшается, а начиная с 8-й недели и до конца наблюдений в большинстве случаев значимо не отличается от контроля ($p > 0,05$). Удельная плотность среди ТИМР-2-позитивных капилляров на 4-й неделе РВК сокращается до минимальных цифр, причем так же как и ММР-2, в большей степени в коре (см. рис. 2, а). В этот период в немногочисленных капиллярах, маркированных ТИМР-2, определяется тонкий и рыхлый слой гранул преципитата, окрашивающий их стенку в желтовато-коричневый цвет (см. рис. 1, г). Затем число ТИМР-2-позитивных капилляров увеличивается и с 8-й по 20-ю неделю РВГ с небольшими колебаниями удерживается на уровне контрольных значений ($p > 0,05$).

ММР-9-позитивные капилляры в количестве, достаточном для морфометрии, начинают выявляться на 6-й неделе РВГ, хотя большинство из них в этот период отличаются невысокой интенсивностью реакции (см. рис. 1, д). Наибольшие значения удельной плотности капилляров, содержащих ММР-9, определяются на 12-й неделе наблюдений, при этом значения обоих показателей в коре выше, чем в белом веществе (см. рис. 2, в, г). В данный период в теменной доле выявляются многочисленные иммунопозитивные капилляры, в большинстве из которых наблюдается плотное отложение продукта реакции (см. рис. 1, е). Начиная с 16-й недели, удельная плотность ММР-9-позитивных капилляров уменьшается, хотя и остается до конца наблюдений существенно выше значений, установленных на 6-й неделе РВГ (см. рис. 2, в, г). Позитивная реакция фермента в этот период определяется также в нейронах, глиальных клетках и отдельных нейтрофилах (см. рис. 1, ж).

Среди капилляров, маркированных ТИМР-1, наибольшая величина исследованных показателей определяется на 6-й неделе РВГ (см. рис. 2, в, г). В этот период на срезах видны многочисленные фрагменты капилляров, некоторые из которых, лежащие в проекции коры, отличаются плотным отложением продукта реакции (см. рис. 1, з). Однако, начиная с 8-й недели РВГ, удельная плотность капилляров, содержащих ТИМР-1, после небольшого снижения до конца наблюдений удерживается на относительно стабильном уровне (см. рис. 2, в, г).

Локальные особенности экспрессии каждого из указанных ферментов приводят к значительным колебаниям величины показателя ММР/ТИМР в капиллярах коры и белого вещества мозга в разные временные периоды развития РВГ (см. рис. 3, б). Его значения в отношении ММР-2/ТИМР-2 в капиллярах коры на 2–4-й неделе РВК превышают исходный уровень более чем в 4 раза, на 6-й — в 2,5–3 раза и лишь между 16–20-й неделями, снижаясь, достигают контрольных цифр ($p > 0,05$). Выраженные колебания установлены и при вычислении показателя ММР-9/ТИМР-1. В капиллярах коры на 12-й неделе РВГ он более чем вдвое, а на 20-й — почти в 1,5 раза превышает его значения, установленные на 6-й неделе ($p < 0,05$). В белом веществе в соответствующие периоды развития РВГ наблюдаются также существенные ($p < 0,05$), хотя и менее выраженные преобразования отношения ММР-9/ТИМР-1 (см. рис. 3, б).

Обсуждение полученных данных. Матриксные металлопротеиназы относятся

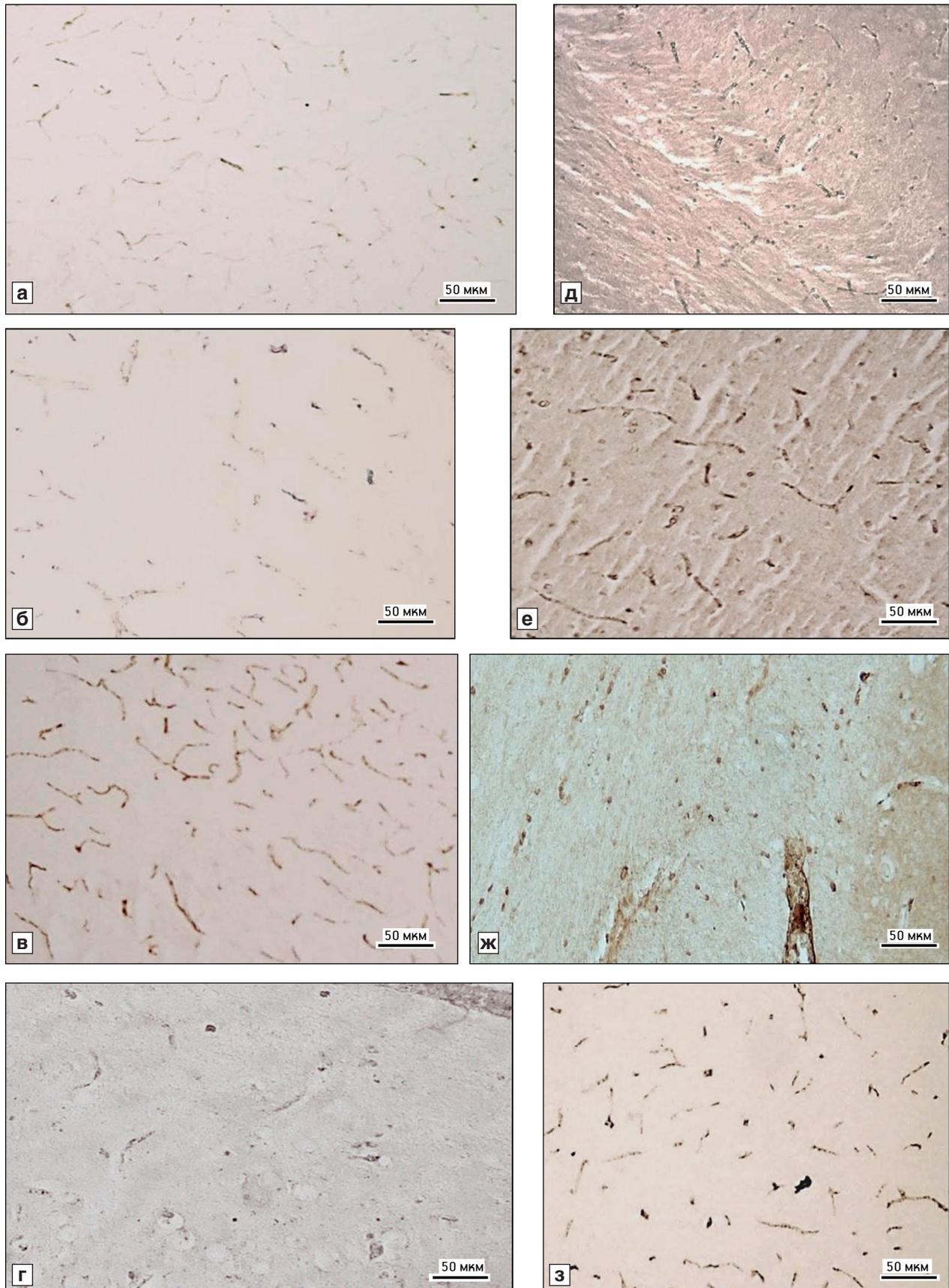


Рис. 1. ММР-2- (а, в) и ТИМР-2-позитивные (б, г) капилляры у контрольной группы крыс (а, б) и на 4-й неделе РВГ (в, г). ММР-9-позитивные структуры на 6- (д), 12- (е) и 20-й неделе (ж), ТИМР-2-позитивные — на 6-й неделе реноваскулярной гипертензии (з).

Иммунпероксидазная реакция

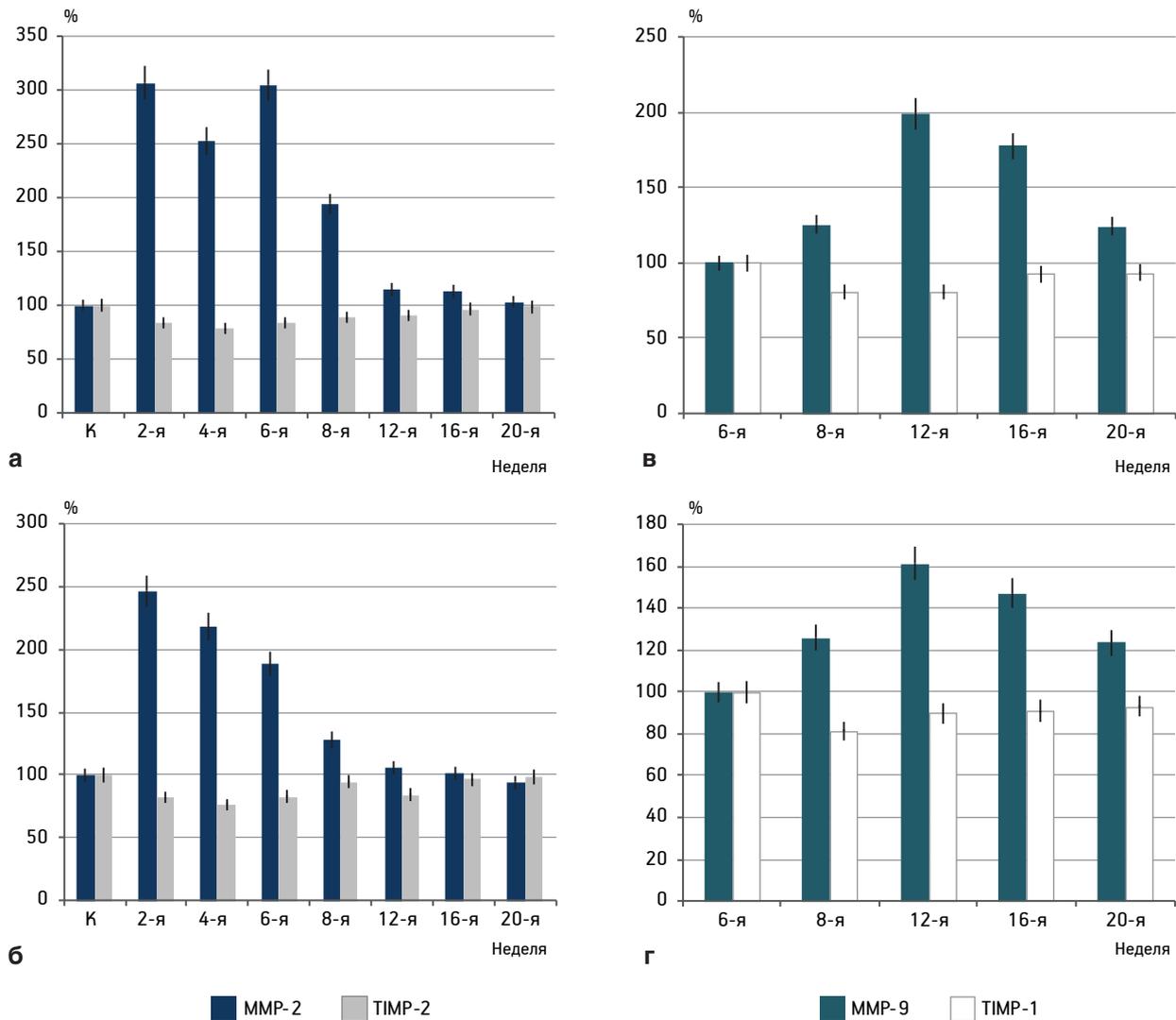


Рис. 2. Динамика удельной плотности капилляров коры (а, в) и белого вещества (б, г) головного мозга, маркированных MMP-2 и TIMP-2 (а, б), MMP-9 и TIMP-1 (в, г), при развитии реноваскулярной гипертензии (РВГ) у крыс.

При исследовании MMP-2 и TIMP-2 (а, б) за 100 % принята величина соответствующих показателей у контрольных животных (К), MMP-9 и TIMP-1 (в, г) — на 6-й неделе развития РВГ

к семейству цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, вовлекающих внеклеточный матрикс в процессы ремоделирования, т.е. деградации и протеолиза различных его компонентов [1, 4, 13]. Получено большое количество доказательств, что ряд физиологических (ангиогенез, морфогенез, возрастные преобразования нейронных и капиллярных сетей) и патологических процессов сопровождаются активацией специфических ферментов межклеточного матрикса — желатиназ [3, 15]. Разнообразные и тяжелые изменения церебральной гемодинамики, которые наблюдаются при артериальной гипертензии, могут быть обусловлены дисбалансом, возникающим между желатиназами и их тканевыми ингибиторами в мозгу, что приводит к нарушению проницаемости ГЭБ, способствует развитию отека и воспаления в нервной ткани [5, 6, 15].

Полученные нами данные показывают, что MMP-2 и TIMP-2, которые относятся к конститутивным ферментам, выявляются в капиллярах мозга у интактных и оперированных животных. Важно отметить, что в коре и белом веществе мозга у контрольных крыс удельная плотность капилляров, содержащих эти ферменты, примерно одинакова. Поэтому значения MMP-2/TIMP-2 в том и другом случае колеблются около единицы, что свидетельствует о поддержании базового уровня обмена белков матрикса, поскольку в физиологических условиях MMP и TIMP взаимодействуют между собой в эквимолярном соотношении посредством сильной нековалентной связи [1, 4, 7]. С белками межклеточного матрикса MMP-2 взаимодействует при помощи своего фибронектиноподобного фрагмента, получая таким образом информацию

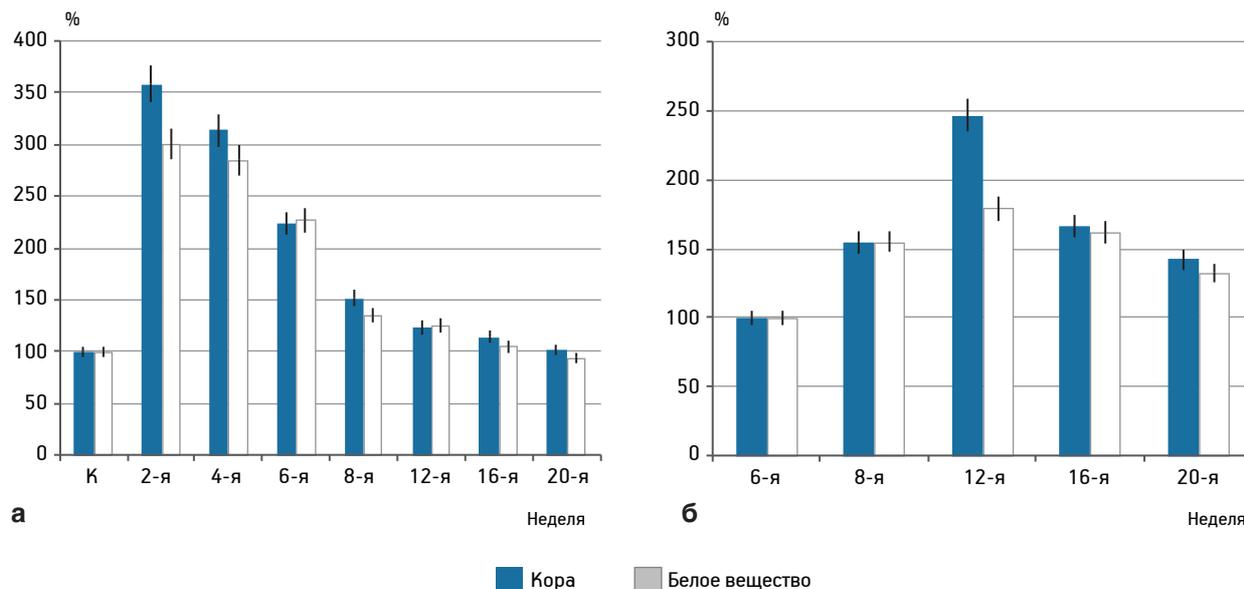


Рис. 3. Изменение величины соотношения MMP-2/TIMP-2 (а) и MMP-9/TIMP-1 (б) в капиллярах коры и белого вещества головного мозга крыс в ходе развития реноваскулярной гипертензии.

При исследовании MMP-2/TIMP-2 (а) за 100 % принята величина соответствующего показателя у контрольных животных (К), MMP-9/TIMP-1 (б) — на 6-й неделе развития у них реноваскулярной гипертензии

о состоянии метаболизма окружающей ткани и при необходимости своевременно корректируя этот процесс. Поддержание равновесия между активностью ММР и ТИМР обеспечивает нормальное функционирование сосудов.

Развитие патологии, как правило, сопровождается нарушением баланса между металлопротеиназами и их ингибиторами [5, 7]. Представлены весомые доказательства прямых корреляций, существующих между уровнем экспрессии ММР и глубиной деградации матрикса [13]. По нашим данным, при гипертензии наблюдается увеличение удельной плотности ММР-2-позитивных капилляров и сокращение числа сосудов, маркированных ТИМР-2. Изменения в большей степени затрагивают капилляры коры, в результате чего в первые 4 нед РВГ различия концентрации иммунопозитивных капилляров между корой и белым веществом достигают наиболее высокого уровня. Однако величина этого показателей относительно быстро возвращается к исходному уровню: уже с 8-й недели и до конца наблюдений концентрация ММР-2- и ТИМР-2-позитивных капилляров как в коре, так и белом веществе, существенно не отличается от контрольных цифр. В результате этих процессов показатель ММР-2/ТИМР-2 в капиллярах коры на 2–4-й неделе РВК превышает исходный уровень более чем в 4 раза, на 6-й — в 2,5–3 раза и лишь на 16-й неделе возвращается к контрольным значениям. Соответствующие, хотя и менее выраженные изменения отношения ММР-2/ТИМР-2 наблюда-

ются в белом веществе мозга. Дисрегуляторные процессы, возникающие в результате нарушения равновесия между металлопротеиназами и их эндогенными ингибиторами в коре и белом веществе мозга, стимулируют развитие деструктивных изменений внеклеточного матрикса, повышая вероятность неблагоприятного исхода при патологии [6, 7].

В отличие от предыдущей группы ферментов, ММР-9 и ТИМР-1 в капиллярах коры и белого вещества мозга у контрольных крыс выявляются крайне редко. По-видимому, их экспрессия наблюдается лишь в сосудах с деструкцией внеклеточного матрикса, которые в небольшом количестве присутствуют и у интактных животных [8]. Обычно такие сосуды находятся в процессе реализации ремоделирования, миграции или пролиферации клеток, т.е. тех механизмов, в которых металлопротеиназы и их ингибиторы играют особенно важную роль [3, 10, 12]. Однако при развитии РВГ число капилляров, маркированных ММР-9, быстро возрастает, достигая максимальных значений на 12-й неделе после операции. В этот период выявляются многочисленные фрагменты капилляров, некоторые из которых отличаются высокой интенсивностью реакции. Чаще они находятся в проекции коры мозга. Начиная с 16-й недели РВГ, удельная плотность ММР-9-позитивных капилляров хотя и сокращается, но до конца наблюдений остается существенно выше значений, установленных на 6-й неделе РВГ. В этот период осадок, маркирующий имму-

нолокализацию фермента, наблюдается также в нейронах, глиальных клетках и отдельных нейтрофилах. Известно, что синтез MMP-9 всегда возрастает после повреждения мозга, а инъекции этого фермента в мозг мышей вызывают гибель клеток и воспаление нервной ткани [6]. У мышей, лишенных гена, кодирующего MMP-9, объем повреждения мозга существенно меньше, чем у мышей дикого типа. При инсульте в зоне пенумбры появляются лейкоциты, экспрессирующие MMP-9, а в плазме крови значительно повышается концентрация указанного фермента, что позволяет рассматривать его в качестве одного из важных молекулярных маркеров разрушения ГЭБ [13, 15].

Усиление деградации внеклеточного матрикса при различных заболеваниях является результатом сложного каскада реакций, в которых, помимо MMP-2 и MMP-9, участвуют многие другие металлопротеиназы (MMP-3, MMP-7, MMP-14, MT-MMP-1 и т.д.), действующие синергично [1, 8]. Эти протеиназы относятся к индуцируемым ферментам, синтез которых контролируется на уровне транскрипции и посттранскрипционном уровне рядом ростовых факторов, провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6, ФНО- α), нейропептидов, интегринов, индукторов апоптоза (NF- κ B, AP-1, MAPK), физического и оксидантного стресса. MMP, связываясь со специфическими рецепторами, модулируют преобразования различных компонентов внеклеточного матрикса, в том числе базальных мембран капилляров, вызывая нарушение проницаемости ГЭБ и развитие инсульта — одного из наиболее частых осложнений артериальной гипертензии [4, 9].

Иная динамика прослеживается в отношении капилляров, маркированных TIMP-1, наибольшая концентрация которых определяется на 6-й неделе РВГ. В этот период на срезах видны их многочисленные фрагменты, некоторые из которых, лежащие в проекции коры, отличаются плотным отложением продукта реакции, что можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции, направленной на подавление избыточной активности MMP-9. Фармакологическая или генетическая индукция TIMP уменьшает отек и объем деструктивных изменений нервной ткани [6]. Но уже после 8-й недели РВГ удельная плотность капилляров, содержащих маркер TIMP-1, снижается, причем быстрее в коре мозга. В результате этих процессов нарушается естественный баланс не только между MMP и TIMP, например, капилляров коры, но и между капиллярами коры и белого вещества. По данным иммуноци-

тохимических исследований, в капиллярах мозга MMP-9 выявляется главным образом в эндотелии и перицитах, MMP-2 — в ножках астроцитов [13]. Экспрессия MMP-9 определяется также в клетках глии, отдельных нейронах, лежащих около внутримозговых артериол и капилляров. Из этого следует, что при гипертензии страдают все элементы нейрососудистых единиц, повышая риск развития осложнений и инициируя тяжелые изменения метаболизма мозга.

Таким образом, физиологические процессы обновления и восстановления внеклеточного матрикса в капиллярах обеспечивают преимущественно MMP-2 и TIMP-2, динамическое равновесие между которыми позволяет поддерживать оптимальный уровень тканевого метаболизма мозга. Значительное повышение АД индуцирует экспрессию желатиназ (в большей степени MMP-9) в капиллярах при сокращении концентрации их тканевых ингибиторов, что приводит к значительным колебаниям показателя MMP/TIMP в разные временные периоды развития РВГ. Не исключено, что дисрегуляторные явления, возникающие в результате этих процессов, в первую очередь, в системе «MMP-9 — TIMP-1», приводят к деструктивным изменениям ГЭБ, повышая риск развития осложнений.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: В. М. Ч.

Сбор и обработка материала: Н. В. З.

Статистическая обработка данных: А. Г. Ч.

Анализ и интерпретация данных: В. М. Ч., В. А. Н.

Написание текста: В. М. Ч., Н. В. З.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. 2010. № 5. С. 7–17 [Poteryaeva O.N. Matrix metalloproteinases: structure, regulation, role in pathological states development (literature review) // Meditsina i obrazovanie v Sibiri. 2010. № 5. P. 7–17. In Russ.].
2. Черток В.М. Тучные клетки наружной оболочки артерий основания головного мозга // Морфология. 1980. Т. 79, вып. 11. С. 72–79 [Chertok V.M. Mast cells of the outer coat of the arteries of the basis cerebri // Morfologiya. 1980. Vol. 79, № 11. P. 72–79. In Russ.].
3. Черток В.М., Захарчук Н.В., Черток А.Г. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117, № 8–2. С. 43–55 [Chertok V.M., Zakharchuk N.V., Chertok A.G. The cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation in the brain // Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S. S. Korsakova. 2017. Vol. 117, № 8–2. P. 43 – 55. In Russ.]. doi.org/10.17116/jnevro20171178243-55.

4. Черток В.М., Черток А.Г. Регуляторный потенциал капилляров мозга // Тихоокеанский медицинский журнал. 2016. Т. 64, № 2. С. 72–80 [Chertok V.M., Chertok A.G. Regulatory capacity of the brain capillaries // *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal*. 2016. Vol. 64, № 2. P. 72–80. In Russ.]. doi.org/10.17238/pmj1609-1175.2016.2.72-81.
5. Черток В.М., Черток А.Г., Захарчук Н.В., Невзорова В.А. Динамика распределения капилляров, содержащих матричную металлопротеиназу-2 и ее тканевой ингибитор, в головном мозге крыс с экспериментальной гипертензией // Бюл. экпер. биол. и мед. 2017. Т. 164, № 9. С. 385–389 [Chertok V.M., Chertok A.G. Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A. Special patterns of matrix metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor distribution in cellular capillaries of rat brain in case of experimental hypertension // *Bulletin' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2017. Vol. 164, № 9. P. 385–389. In Russ.].
6. Candelario-Jalil E., Yang Y., Rosenberg G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia // *Neuroscience*. 2009. Vol. 158, № 3. P. 983–994. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.025.
7. Cunningham L.A., Wetzel M., Rosenberg G.A. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia // *Glia*. 2005. Vol. 50, № 4. P. 329–339. https://doi.org/10.1002/glia.20169.
8. Falzone L., Salemi R., Travali S., Scalisi A., McCubrey J., Candido S., Libra M. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma // *Aging*. 2016. Vol. 8, № 5. P. 933–944. https://doi.org/10.18632/aging.100951.
9. Florczak-Rzepka M., Grond-Ginsbach C., Montaner J., Steiner T. Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update // *Cerebrovasc Dis*. 2012. Vol. 34, № 4. P. 249–262. https://doi.org/10.1159/000341686.
10. Grandas O.H., Mountain D.H., Kirkpatrick S.S., Rudrapatna V.S., Cassada D.C., Stevens S.L., Freeman M.B., Goldman M.H. Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure // *J. Vasc. Surg.* 2009. Vol. 49, № 1. P. 185–191. https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.07.080.
11. Hiller O., Lichte A., Oberpichler A., Kocourek A., Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII // *J. Biol. Chem.* 2000. № 275. P. 33 008–33 013.
12. Johnson C., Galis Z.S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. № 24. P. 54–60. https://doi.org/10.1161/01.atv.0000100402.69997.c3.
13. Lakhani Sh.E., Kirchgessner A., Tepper D., Leonard A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke // *Front Neurol*. 2013. № 4. P. 32–56. https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00032.
14. Ramachandran R.K., Sorensen M.D., Aaberg-Jessen C., Hermansen S.K., Kristensen B.W. Expression and prognostic impact of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in astrocytomas // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 2. P. e0172234. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172234.
15. Rempe R.G., Hartz A.M., Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016. Vol. 36, № 9. P. 1481–1507. https://doi.org/10.1177/0271678x16655551

Поступила в редакцию 20.12.2017

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF GELATINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN BRAIN CAPILLARIES IN NORMO- AND HYPERTENSIVE RATS

N. V. Zakharchuk¹, V. M. Chertok², V. A. Nevzorova¹, A. G. Chertok²

Objective — to study the distribution of MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitors (TIMP-2 and TIMP-1) in the capillaries of rat brain in renovascular hypertension (RVHT).

Materials and methods. The research was conducted on 35 Wistar rats with RVHT modelled by a surgical method (ligature on the left renal artery and vein). The immunohistochemical study of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and TIMP-1 in brain capillaries was conducted 2, 4, 6, 8, 12, 16 and 20 weeks after surgery (5 animals in each group). Level of an expression of each enzyme was estimated on the basis of concentration of the corresponding immunopositive capillaries. Then a ratio of MMP-2/TIMP-2 and MMP-9/TIMP-1 was calculated in cerebral cortex and white matter.

Results. MMP-2 and TIMP-2 were found in the capillaries of the cortex and white matter, both in control animals, and during RVHT development, while MMP-9 and TIMP-1 were detected only in rats with RVHT. The number of MMP-2-positive capillaries considerably increased in the 2nd week, that of MMP-9-positive capillaries — in the 12th week of RVHT development, while the content of TIMP-2 and TIMP-1-positive capillaries was reduced to the minimal level during the specified periods, leading to significant changes of MMPs/TIMPs ratio.

Conclusion. The balance between MMPs and TIMPs was disturbed during RVHT development, which is indicated by the changes of MMPs/TIMPs ratio in capillaries of the cortex and white matter. These processes may result in the destructive alterations of the blood-brain barrier, thus increasing the risk of complications in arterial hypertension.

Key words: brain capillaries, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, renovascular hypertension

¹ Institute of Therapy and Instrumental Diagnostics;

² Department of Human Anatomy, Pacific State Medical University, 2 Prospekt Ostryakova, Vladivostok 690002