

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ОБЩЕЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА СИСТЕМУ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ПЛОДА КРОЛЬЧИХ НА 27-28-Е СУТКИ БЕРЕМЕННОСТИ

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.

Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск

Короновский Ю.В.<sup>1</sup>, Удут В.В.<sup>2</sup>

*Исследовано влияние гипоксической гипоксии на концентрацию матриксной металлопротеиназы-1 (ММП-1), концентрацию тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (ТИМП-1) в амниотической жидкости (АЖ) крольчих на 27-28-е сутки беременности. Крольчихи были разделены на две группы: опытную (n=9) и контрольную (n=6). Крольчихи опытной группы помещались в гипоксическую камеру, содержащую 10±2% кислорода и 90±2% азота, на 1 ч, после чего забивались, а у плодов (опыт – n=35, контроль – n=35) забиралась амниотическая жидкость. Результаты представлены в виде медианы (25–75%). Острая общая гипоксическая гипоксия повышала концентрацию ММП-1 в АЖ [опыт – 2,14 (2,03–2,29) нг/мл, контроль – 1,18 (0,98–1,38) нг/мл, p=0,019], повышала концентрацию ТИМП-1 в АЖ [опыт – 1,96 (1,80–2,09) нг/мл, контроль – 1,74 (1,61–1,88) нг/мл, p<0,001] и отношение ММП-1/ТИМП-1 в АЖ [опыт – 1,10 (1,02–1,18), контроль – 0,70 (0,58–0,83), p<0,001]. Вывод: острая общая гипоксическая гипоксия на поздних сроках беременности вызывает изменения биохимического состава АЖ, характеризующиеся дисбалансом между уровнями ММП-1 и ТИМП-1, что свидетельствует об активации системы матриксных металлопротеиназ плода.*

**Ключевые слова:** гипоксия, пренатальный период, амниотическая жидкость, ММП-1, ТИМП-1.

*The influence of hypoxic hypoxia on the concentration of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), the concentration of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) in amniotic fluid (AF) of rabbits on the 27-28th day of pregnancy was studied. The rabbits were divided into two groups: experimental (n=9) and control (n=6). Rabbits of the experimental group were placed in a hypoxic chamber containing 10±2% of oxygen and 90±2% of nitrogen for 1 hour, after which they were killed, and the amniotic fluid (experiment – n=35, control – n=35) was taken from fetuses. The results are presented in the form of a median (25–75%). Acute general hypoxic hypoxia increased the concentration of MMP-1 in AF [experience – 2.14 (2.03–2.29) ng/ml, control – 1.18 (0.98–1.38) ng/ml, p=0.019], increased the concentration of TIMP-1 in AF [experience – 1.96 (1.80–2.09) ng/ml, control – 1.74 (1.61–1.88) ng/ml, p<0.001] and MMP-1/TIMP-1 ratio in AF [experience – 1.10 (1.02–1.18), control – 0.70 (0.58–0.83), p<0.001]. Conclusion: acute general hypoxic hypoxia in late pregnancy causes changes in the biochemical composition of AF, characterized by an imbalance between the levels of MMP-1 and TIMP-1, which indicates the activation of the system of matrix metalloproteinases of the fetus.*

**Key words:** hypoxia, prenatal period, amniotic fluid, MMP-1, TIMP-1.

Перинатальный период включает пренатальный (дородовой), интранатальный и ранний неонатальный периоды. Перинатальная гипоксия (ПГ) является одной из главных причин детской смертности и заболеваемости. Среди факторов, обуславливающих повреждение при перинатальной гипоксии, выделяют активацию системы матриксных металлопротеиназ – Zn-содержащих внеклеточных протеаз [1]. С другой стороны, пренатальная гипоксия ассоциирована с повышенной частотой преждевременных родов, которые часто обусловлены разрывом околоплодных оболочек с излитием околоплодных вод и преждевременной активацией родовой деятельности [2]. Наиболее значимыми регуляторами активности ММП являются тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП), наиболее универ-

сальный из которых – ТИМП-1 [3]. Целью исследования было изучение влияния общей гипоксической гипоксии на ключевые компоненты системы матриксных металлопротеиназ (ММП-1 и ТИМП-1) в амниотической жидкости.

### Материалы и методы

**Объект исследования.** Исследование проведено на первобеременных крольчихах (n=15) массой 4-5 кг на сроке беременности 27-28 суток (при нормальной длительности беременности – 31 сутки). Оплодотворение проводили разными случайно выбранными самцами, после чего крольчихи находились в одиночных клетках на свободном питании. Крольчихи случайно были разделены на две группы: опытную (n=9) и контрольную (n=6).

*Общая острая гипоксическая гипоксия.* Крольчих из опытной группы на 60 мин помещали в индивидуальную герметичную проточную камеру, куда компрессором нагнеталась газовая смесь, содержащая 10±2% кислорода и 90±2% азота. Контроль газового состава в камере производили при помощи газоанализатора Microlux O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> (ООО «Микролюкс», Екатеринбург, Россия). Крольчихи из контрольной группы помещались на 60 мин в эту же камеру, содержащую атмосферный воздух.

*Получение образцов амниотической жидкости.* Животных забивали методом цервикальной дислокации, через 15 мин проводили средин-

ную лапаротомию и удаляли матку. Из полости матки выделяли и извлекали амниотические мешки с плодами и разделяли материнскую и плодную части плаценты, не нарушая целостности амниотического мешка. Одноразовым шприцем из амниотического мешка извлекалась амниотическая жидкость. Общая характеристика плодов представлена в таблице 1. Образцы амниотической жидкости центрифугировали в течение 15 мин при 1200 g, замораживали и хранили при температуре -20°C не более одного месяца до проведения биохимического исследования.

Таблица 1

Масса плода и плаценты на 27-28 сутки жизни

	Гипоксическая гипоксия (n=35)	Контроль (n=35)	P
Масса плода, г	36,7 (28,8–42,3)	39,6 (31,0–44,3)	0,388
Масса плодной части плаценты, г	3,14 (2,70–3,72)	3,47 (3,12–3,90)	0,144

Примечание: данные представлены в виде медианы (25–75%), P – достоверность межгрупповых различий по U-тесту Манна-Уитни.

*Биохимические исследования.* Концентрацию ММП-1 в амниотической жидкости крольчих определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа Elabscience® Rabbit MMP-1 (Matrix Metalloproteinase 1) ELISA Kit (кат. № E-EL-RB0349, Elabscience, США). Концентрацию ТИМП-1 в амниотической жидкости крольчих определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа LSBio Rabbit TIMP1 ELISA Kit (Sandwich ELISA) (кат. № LS-F5382, LSBio, США). Измерение оптической плотности реакционной смеси осуществляли с помощью вертикального фотометра Multiscan (Labsystem, Финляндия).

*Статистический анализ* данных проводили в программе JMP 7.0 (SAS Institute, США). Рассчитывали медиану, 25 и 75 перцентили, достоверность межгрупповых различий по критерию Манна-Уитни, множественный корреляционный анализ по критерию Спирмена. Уровень статистической значимости был принят за 5% (p<0,05).

Настоящая работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

### Результаты и обсуждение

Матриксные металлопротеиназы участвуют в различных физиологических (рост, развитие, дифференцировка клеток) и патологических процессах (воспаление, метастазирование опухолей) [4]. Через протеолиз субстратов матриксных металлопротеиназ (компоненты внеклеточного матрикса – коллаген, фибронектин, протеогликаны) и внеклеточных доменов

мембранных рецепторов клеток эти ферменты активно влияют на межклеточные коммуникации, регулируя стабильность внеклеточного матрикса, высвобождение депонированных во внеклеточном матриксе цитокинов и чувствительность мембранных рецепторов к внеклеточным медиаторам. Механизм регуляции матриксных металлопротеиназ реализуется через действие их специализированных ингибиторов ТИМП, блокирующих активный центр фермента [3], частичного протеолиза, включая аутоактивацию [5] и депонирование во внеклеточном матриксе [6].

Важным фактором преждевременных родов является активация системы матриксных металлопротеиназ, поскольку вызывает деструкцию оболочек плода, нарушение целостности плодного пузыря с излитием околоплодной жидкости и активацией родовой деятельности. Примечательно, что преждевременная родовая деятельность часто ассоциирована со страданием плода от гипоксии [2]. В то же время, связь между гипоксией и активацией системы матриксных металлопротеиназ плода имеет небольшое количество свидетельств.

Острая общая пренатальная гипоксическая гипоксия у крольчих на 27-28-е сутки беременности вызвала повышение концентрации ММП-1 на 81,4% и повышение концентрации ТИМП-1 на 12,6%, что совместно с повышенными отношениями концентраций ММП-1/ТИМП-1 с 0,7 до 1,10 указывает на активацию системы матриксных металлопротеиназ в амниотической жидкости при острой общей гипоксической гипоксии и переход состояния системы

матричных металлопротеиназ от антипротеолитического (из-за превалирования ТИМП-1 над ММП-1) к протеолитическому.

Концентрация ММП-1 в амниотической жидкости плодов крольчих после острой общей пренатальной гипоксической гипоксии коррелировала с массой плода ( $r=0,58$ ,  $p<0,001$ ,  $n=35$ ), чего не наблюдалось в контрольной группе ( $r=-0,172$ ,  $p=0,324$ ,  $n=35$ ). В то же время, корреляционная связь концентрации ММП-1 в амниотической жидкости с массой плаценты не выявлена ни в группе беременных крольчих, подвергнутых острой общей гипоксической гипоксии ( $r=0,14$ ,  $p=0,425$ ,  $n=35$ ), ни в контрольной группе ( $r=-0,16$ ,  $p=0,358$ ,  $n=35$ ). Таким образом, уровень накопления ММП-1 в амниотической жидкости, по-видимому, определяется массой плода, а не массой плаценты.

Примечательно обнаружение концентрации ММП-1 и ТИМП-1 в амниотической жидкости крольчих при острой общей пренатальной гипоксической гипоксии ( $r=0,37$ ,  $p=0,028$ ,  $n=35$ ), чего не наблюдалось в амниотической жидкости крольчих контрольной группы ( $r=0,01$ ,  $p=0,957$ ,  $n=35$ ). Это свидетельствует, что система матричных металлопротеиназ не только активировалась при острой общей пренатальной гипоксической гипоксии, но и регулируется через ограничение активности ММП-1 посредством ТИМП-1.

Учитывая относительную краткость гипоксического воздействия на организм плода, эти результаты можно интерпретировать как активацию системы матричных металлопротеиназ, обусловленную декомпартиментализацией компонентов системы матричных металлопротеиназ с выходом их в амниотическую жидкость, а не активацией экспрессии генов. Ввиду того, что концентрация ММП-1 в амниотической жидкости после острой общей гипоксической гипоксии оказалась выше, чем концентрация ТИМП-1, можно полагать, что ММП-1 является более мобильным элементом системы, чем его ингибитор, и быстрее высвобождается в амниотическую жидкость.

Возможными источниками ММП-1 и ТИМП-1 могут быть легкие плода, содержимое кишечника и оболочки плода [7]. По-видимому, более длительное гипоксическое воздействие через нарастание дисбаланса между уровнями ферментов и их ингибиторов системы матричных металлопротеиназ может ускорить деградацию компонентов внеклеточного матрикса плода, разрыв плодных оболочек и роды.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список литературы:

1. Bednarek N, Svedin P, Garnotel R. et al. Increased MMP-9 and TIMP-1 in mouse neonatal brain and plasma and in human neonatal plasma after hypoxia-ischemia: a potential marker of neonatal encephalopathy. *Pediatr Res.* 2012;71(1):63-70. doi: 10.1038/pr.2011.3.
2. Ecevit A, Anuk-İnce D, Yapaççı E. et al. Association of respiratory distress syndrome and perinatal hypoxia with histologic chorioamnionitis in preterm infants. *Turk J Pediatr.* 2014;56(1):56-61.
3. Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):659-72. doi: 10.1007/s00018-013-1457-3.
4. Hannocks MJ, Zhang X, Gerwien H. et al. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol.* 2019;75-76:102-113.
5. Makowski GS, Ramsby ML. Autoactivation profiles of calcium-dependent matrix metalloproteinase-2 and -9 in inflammatory synovial fluid: effect of pyrophosphate and bisphosphonates. *Clin Chim Acta.* 2005;358(1-2):182-91.
6. Swetha R, Gayen C, Kumar D. et al. Biomolecular basis of matrix metalloproteinase-9 activity. *Future Med Chem.* 2018;10(9):1093-1112. doi: 10.4155/fmc-2017-0236.
7. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007; 87:69-98.

#### Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Кореновский Юрий Владимирович, заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: timidin@gmail.com

#### Информация об авторах

Удуд Владимир Васильевич, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной и лечебной работе Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, г. Томск.

634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

Тел.: (3822) 418375.

E-mail: pharm@tnimc.ru