

## ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9 И ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ-1 В ПЕЧЕНИ У НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ СВА И С57В1/6, ПЕРЕНЕСШИХ ХРОНИЧЕСКУЮ ВНУТРИУТРОБНУЮ ГИПОКСИЮ

**С.П. Мозолева<sup>1</sup>, А.П. Надеев<sup>1, 2</sup>, С.В. Позднякова<sup>1</sup>, Т.А. Агеева<sup>1</sup>, П.А. Елясин<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии;

<sup>2</sup>НИИ экспериментальной и клинической медицины при Федеральном исследовательском центре «Фундаментальная и трансляционная медицина»

В исследовании изучена экспрессия матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и ее тканевого ингибитора 1 (TIMP-1) в гепатоцитах и непаренхиматозных клетках печени у новорожденных мышей двух противоположных линий СВА и С57В1/6 после перенесенной хронической внутриутробной гипоксии. Суммарный уровень экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в клетках гепатоцитов был более выраженный у мышей линии СВА в сравнении с мышами линии С57В1/6.

**Ключевые слова:** матриксная металлопротеиназа-9, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1, хроническая внутриутробная гипоксия, печень, новорожденные, мыши линий СВА и С57В1/6.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-3(67)-89-92

## EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASES-1 IN THE LIVER IN NEONATAL MICE OF CBA AND C57B1/6 LINES, WHICH UNDERWENT CHRONIC INTRAUTERINE HYPOXIA

**S.P. Mozoleva<sup>1</sup>, A.P. Nadeev<sup>1, 2</sup>, S.V. Pozdnyakova<sup>1</sup>, T.A. Ageeva<sup>1</sup>, P.A. Elyasin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>FSBEI HE «Novosibirsk State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Department of Pathological Anatomy;

<sup>2</sup>SRI of Experimental and Clinical Medicine at the Federal Research Center «Fundamental and Translational Medicine»

The aim of the study was to study the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its tissue inhibitor 1 (TIMP-1) in hepatocytes and nonparenchymal liver cells in neonatal mice of two opposing lines of CBA and C57B1/6 after chronic intrauterine hypoxia. In The total expression level of MMP-9 and TIMP-1 in hepatocyte cells was more pronounced in CBA mice, in compared with mice of the C57B1/6 line.

**Key words:** matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1, chronic intrauterine hypoxia, liver, newborns, mice of CBA and C57B1/6 lines.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить экспрессию матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) и ее тканевого ингибитора 1 (TIMP-1) в гепатоцитах и непаренхиматозных клетках печени у новорожденных мышей двух противоположных линий СВА и С57В1/6, после перенесенной хронической внутриутробной гипоксии (ХВУГ).

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на мышах противоположных по ряду структурно-функциональных параметров органов и систем линий СВА и С57В1/6 и их потомстве [2, 4]. Животные-производители (массой 20–22 г) были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). ХВУГ моделировали помещением беременных самок на 13-й день беременности в барокамеру с «подъемом» на высоту 9000 м, в течение 4 часов, ежедневно 7 дней [7].

Новорожденные мышата линий СВА и С57В1/6 были разделены на 4 группы по 10 животных в каждой:

1-я (линия СВА) и 2-я (линия С57В1/6) группы – новорожденные мышата, перенесшие ХВУГ; 3-я (линия СВА) и 4-я (линия С57В1/6) группы – животные контрольных групп. Новорожденных мышей в течение первых суток после рождения выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

Все манипуляции с лабораторными животными проводили, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Страсбург, 1986), принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС), «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 53434-2009 от 01.03. 2010 г идентичен GLP OECD).

В соответствии со стандартизированными протоколами и рекомендациями фирм-производителей антител в парафиновых срезах печени проведены иммуногистохимические исследования с использованием моноклональных антител Rabbit MMP-9, clone E127 («ThermoFisherScientificInc.», США), Mouse-human TIMP-1, clone 102D1 («ThermoFisherScientificInc.»),

США) и системы визуализации DAKO EnVision+ System («ДАКО», Дания) с диаминобензидином (DAB).

Для количественной оценки экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в каждом наблюдении определяли процент положительно окрашенных гепатоцитов и непаренхиматозных клеток печени в 10 полях зрения с подсчетом среднего значения.

Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензированного пакета программ статистики «Microsoft-Excel 2010» с определением средней величины (M), стандартной ошибки средней (m). Достоверность статистически значимых различий средних величин в сравниваемых группах рассчитывали по t-критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показано, что воздействие ХВУГ привело к значительным деструктивным изменениям в паренхиме печени новорожденных мышат линий СВА и С57В1/6, более выраженным у мышей линии С57В1/6. Процессы репаративной регенерации паренхимы печени у мышей линии С57В1/6, перенесших ХВУГ, были меньшими, чем у мышей линии СВА, и не соответствовали масштабам деструктивных изменений в паренхиме печени [2, 3].

При иммуногистохимическом исследовании цитоплазматической экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в печени у новорожденных мышат линий СВА и С57В1/6, после перенесенной ХВУГ, регистрировали положительные реакции на MMP-9 и TIMP-1 в клетках очагов гемопоэза и синусоидальных клетках (крупнозернистый продукт реакции), редко в гепатоцитах (гетерогенно в виде мелкодисперсного осадка), с различной выраженностью экспрессии (рис.). У контрольных животных иммуногистохимическая реакция в клетках печени отсутствовала.

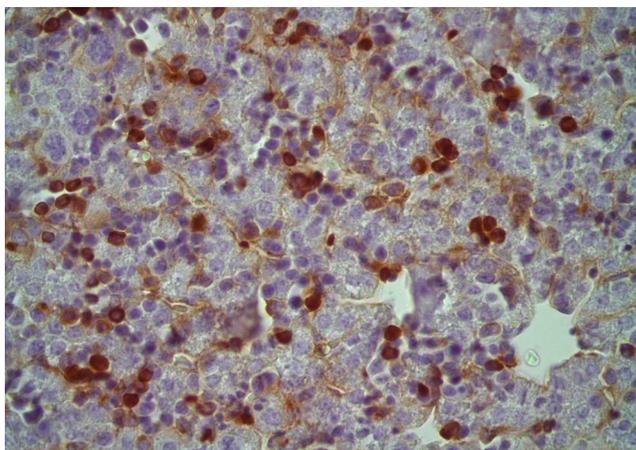


Рис. Экспрессия MMP-9 в клетках печени новорожденных мышат линии СВА, перенесшей ХВУГ: MMP-9 окрашенный продукт визуализируется гомогенно в клетках очагов экстрамедуллярного кроветворения, синусоидальных клетках. Докраска гематоксилином. Ув.  $\times 400$

Более высокий уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 и TIMP-1 был выявлен в клетках печени мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, в сравнении с мышами линии С57В1/6, перенесших ХВУГ. Так, суммарный уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в клетках гемопоэза, синусоидальных клетках и гепатоцитах у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, в 10,1 раз превышал аналогичный показатель у мышей линии С57В1/6. Одновременно с увеличением цитоплазматической экспрессии MMP-9 отмечено повышение экспрессии TIMP-1 в тех же клетках (табл.).

Суммарный уровень цитоплазматической экспрессии TIMP-1 у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, был большим в 21,2 раза, чем аналогичный показатель у мышей линии С57В1/6. Выявленное одновременное повышение экспрессии TIMP-1 и MMP-9 может рассматриваться как компенсаторная реакция, направленная на подавление TIMP-1 гиперстимулированной активности MMP-9. Как результат значительной экспрессии MMP-9 и ее ингибитора у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, соотношение MMP-9 / TIMP-1 составило  $< 1,0$  (в норме соотношение MMP / TIMP составляет 1:1 [10]). В свою очередь, низкие значения экспрессии TIMP-1 в клетках печени у мышей линии С57В1/6, перенесших ХВУГ, привели к тому, что соотношение MMP-9 / TIMP-1 было  $> 1$  (табл.).

### Экспрессия MMP-9 и TIMP-1 в клетках печени мышат линий СВА и С57В1/6, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию ( $M \pm m$ )

Локализация	Линия мышат	
	СВА	С57В1/6
MMP-9		
Гепатоциты	0,78 $\pm$ 0,37	0,02 $\pm$ 0,01
Клетки очагов гемопоэза	13,44 $\pm$ 0,70*	0,68 $\pm$ 0,05*
Синусоидальные клетки, включая клетки Купфера	3,08 $\pm$ 0,33*	0,62 $\pm$ 0,07*
Суммарный показатель	17,32 $\pm$ 0,68*	1,71 $\pm$ 0,22*
TIMP-1		
Гепатоциты	0,39 $\pm$ 0,12	0,04 $\pm$ 0,01
Клетки очагов гемопоэза	15,04 $\pm$ 0,40*	0,51 $\pm$ 0,07*
Синусоидальные клетки, включая клетки Купфера	3,48 $\pm$ 0,19*	0,35 $\pm$ 0,07*
Суммарный показатель	18,89 $\pm$ 0,42*	0,89 $\pm$ 0,14*
MMP-9/ TIMP-1		
Гепатоциты	2,08 $\pm$ 1,31	0,49 $\pm$ 0,18
Клетки очагов гемопоэза	0,89 $\pm$ 0,02*	1,42 $\pm$ 0,15*
Синусоидальные клетки, включая клетки Купфера	0,88 $\pm$ 0,06*	2,18 $\pm$ 0,43*
Суммарный показатель	0,92 $\pm$ 0,02*	1,74 $\pm$ 0,20*

\*Достоверные межлинейные различия средних величин соответствующих параметров,  $p < 0,05$ .

Известно, что MMPs секретируются как проферменты различными клетками: нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками и активируются путем протеолитического расщепления [6]. Вероятно, выявленная

динамика значений MMP-9 и TIMP-1 у новорожденных мышей разных линий с ХВУГ сопряжена с ведущей ролью лейкоцитов, являющихся одними из основных продуцентов MMP-9 [8]. Так, в клетках очагов гемопоэза у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в 19,8 раза превышал аналогичный показатель у мышей линии С57В1/6, уровень цитоплазматической экспрессии TIMP-1 – в 29,5 раза. Соотношение MMP-9 / TIMP-1 ( $< 1,0$ ) в клетках очагов гемопоэза у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, было меньшим в 1,6 раза в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей линии С57В1/6 (MMP-9 / TIMP-1  $> 1,0$ ). В то время как экспрессия MMP-9 и TIMP-1 в гепатоцитах у мышей обеих линий, перенесших ХВУГ, была незначительной и значимых межлинейных различий не имела (табл.). В синусоидальных клетках, в состав которых входят клетки Купфера, являющиеся продуцентами металлопротеиназ [9], у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, уровень цитоплазматической экспрессии MMP-9 в 4,97 раз превышал величину аналогичного показателя у мышей линии С57В1/6, уровень цитоплазматической экспрессии TIMP-1 – в 9,94 раза, а соотношение MMP-9 / TIMP ( $< 1,0$ ) у мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, было меньшим в 2,48 раза аналогичного показателя у мышей линии С57В1/6 (где MMP-9 / TIMP  $> 1,0$ ) (табл.).

Одним из механизмов усиления экспрессии MMP-9 в клетках очагов гемопоэза и синусоидальных клетках мог стать оксидативный стресс, обусловленный хронической внутриутробной гипоксией [5].

Разная выраженность экспрессии MMP-9 и ее ингибитора TIMP-1 обусловило различную динамику деструктивных процессов в печени у мышей противоположных линий на фоне ХВУГ [2]. Выраженные деструктивные изменения в печени у мышей линии С57В1/6, вероятно, обусловлены более выраженной экспрессией MMP-9 (соотношение MMP / TIMP составило более 1,0) в клетках печени. Разнонаправленная динамика значений MMP-9 и TIMP-1 у новорожденных мышей разных линий с ХВУГ может быть сопряжена с ведущей ролью лейкоцитов, являющихся одними из основных продуцентов MMP-9 и TIMP-1, что, вероятно, у мышей линий СВА и С57В1/6, перенесших ХВУГ, имеет место разное соотношение видов и степени зрелости клеток в очагах гемопоэза и синусоидальных клеток [1].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У новорожденных мышей линии С57В1/6, перенесших ХВУГ, выявлена слабая экспрессия MMP-9 и еще более низкий уровень экспрессии TIMP-1 в клетках очагов гемопоэза, синусоидальных клетках, что обусловило соотношение MMP-9 / TIMP более 1.

2. У новорожденных мышей линии СВА, перенесших ХВУГ, отмечена выраженная экспрессия MMP-9 и более высокий уровень экспрессии TIMP-1 в клетках очагов гемопоэза, синусоидальных клеток, что обусловило соотношение MMP-9 / TIMP менее 1.

3. Суммарный уровень экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в клетках гепатоцитов был более выраженным у мышей линии СВА, в сравнении с мышами линии С57В1/6.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аникина А.Г., Потапова О.В., Шкурупий В.А., Шаповалов А.М. Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибитора в развитии раннего фиброза легких при гриппе А / H5N1 A/Goose/Krasnoozersoye/627/05 у мышей // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2013. – Т. 156, № 7. – С. 17–20.
2. Мозолева С.П., Надеев А.П., Позднякова С.В., Залавина С.В. Структурная организация печени и звездчатых макрофагов у новорожденных мышей линии СВА и С57В1/6 // Морфология. – Т. 152, № 4. – С. 44–48.
3. Мозолева С.П., Надеев А.П., Позднякова С.В. и др. Структурная организация печени и клеток Купфера у новорожденных мышей противоположных линий СВА и С57В1/6, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию // Уральский медицинский журнал. – 2018. – Т. 157, № 2. – С. 115–120.
4. Надеев А.П., Шкурупий В.А., Маринкин И.О. Печень и плацента в пре- и постнатальный периоды при патологии: Клинико-экспериментальное исследование. – Новосибирск: Наука, 2014. – 242 с.
5. Пинаева О.Г., Лебедько О.А., Яковенко Д.В. и др. Влияние антенатальной гипоксии на некоторые показатели тканевого гомеостаза печени белых крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2014. – Т. 157, № 3. – С. 301–304.
6. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. – 2010. – № 5. – С. 7–17.
7. Уткина Л.И., Тимошин С.С. Изменение печени потомства белых крыс под влиянием внутриутробной хронической гипоксии // Бюл. эксперим. биол. мед. – 1990. – № 11. – С. 541–543.
8. Chaundary A.K., Pandya S., Ghosh K., Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: An overview // *Mutat. Res.* – 2013. – Vol. 1, № 753. – P. 7–23.
9. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies // *Cell. Mol. Immunol.* – 2016. – Vol. 13. – P. 316–27.
10. Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., et al. Matrix metalloproteinases // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 17, № 31. – P. 3751–3768.

## REFERENCES

1. Anikina A.G., Potapova O.V., SHkurupij V.A., SHapovalov A.M. Rol' matriksnyh metaloproteinaz i ih ingibitora v razvitiu rannego fibroza legkih pri grippe A / H5N1 A / Goose / Krasnoozersoye / 627 / 05 u myshej [The role of matrix metalloproteinases and their inhibitor in the development of early fibrosis of the lungs with influenza A / H5N1 A / Goose / Krasnoozersoye / 627 / 05 in mice]. *Byull. ehksperim. biol. i med.* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2013, Vol. 156, no. 7, pp. 17–20. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Mozoleva S.P., Nadeev A.P., Pozdnyakova S.V., Zalavina S.V. Strukturnaya organizatsiya pecheni i zvezdchatykh makroflagov u novorozhdennykh myshej linii SVA i S57V1/6 [Structural organization of the liver and stellate macrophages in neonatal mice of the CBA and C57B1 / 6 lines].

*Morfologiya* [Morphology], Vol. T. 152, no. 4, pp. 44–48. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Mozoleva S.P., Nadeev A.P., Pozdnyakova S.V. et al. Strukturnaya organizatsiya pecheni i kletok Kupfera u novorozhdennykh myshej oppozitnykh linij SVA i S57V1/6, perenessih hronicheskuyu vnutriutrobnuyu gipoksiyu [Structural organization of the liver and Kupffer cells in neonatal mice of opposing lines SVA and C57B1 / 6, who underwent chronic intrauterine hypoxia]. *Ural'skij medicinskij zhurnal* [The Urals Medical Journal], 2018, Vol. 157, no. 2, pp. 115–120. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Nadeev A.P., SHkurupij V.A., Marinkin I.O. Pechen' i placenta v pre- i postnatal'nyj periody pri patologii: Kliniko-ehksperimental'noe issledovanie [Liver and placenta in pre- and postnatal periods in pathology: Clinical and experimental study]. Novosibirsk: Nauka, 2014. 242 p.

5. Pinaeva O.G., Lebed'ko O.A., YAkovenko D.V. i dr. Vliyanie antenatal'noj gipoksii na nekotorye pokazateli tkanevogo gomeostaza pecheni belyh krysov [Influence of antenatal hypoxia on some indices of tissue homeostasis in liver of white rats]. *Byull. ehksperim. biol. i med.* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2014, Vol. 157, no. 3, pp. 301–304. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Poteryaeva O.N. Matriksnye metalloproteinazy: stroenie, regulyatsiya, rol' v razvitiy patologicheskikh sostoyanij (obzor literatury) [Matrix metalloproteinases: structure, regulation, role in the development of pathological conditions (literature review)]. *Medicina i obrazovanie v Sibiri* [Medicine and Education in Siberia], 2010, no. 5, pp. 7–17. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Utkina L.I., Timoshin S.S. Izmenenie pecheni potomstva belyh krysov pod vliyaniem vnutriutrobnoj hronicheskoy gipoksii [Changes in the liver of offspring of white rats under the influence of intrauterine chronic hypoxia]. *Byul. ehksperim. biol. med.* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 1990, no. 11, pp. 541–543. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Chaundary A.K., Pandya S., Ghoh K., Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: An overview. *Mutat. Res.*, 2013, Vol. 1, no. 753, pp. 7–23.

9. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 13, pp. 316–27.

10. Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., et al. Matrix metalloproteinases. *Curr. Med. Chem.*, 2010, Vol. 17, no. 31, pp. 3751–3768.

## Контактная информация

**Надеев Александр Петрович** – д. м. н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии, Новосибирский государственный медицинский университет, e-mail: [nadeevngma@mail.ru](mailto:nadeevngma@mail.ru)