

Uticaj vitamina D na ekspresiju matriks metaloproteinaza u mozgu pustinjskih miševa izloženih prolaznoj ishemiji mozga

Ispitivana su protektivna dejstva vitamina D na matriks metaloproteinazu-9 u izolovanim struktura mozga korteksa i hipokampusa kod pustinjskih miševa (Meriones Unguiculatus, Mongolski džerbil). Ekspresija matriks metaloproteinaze-9 indukovana je globalnom prolaznom moždanom ishemijom. Izvršena je Western blot analiza proteina iz uzoraka korteksa i hipokampusa koja omogućava detekovanje matriks metaloproteinaze-9 i merenje njene ekspresije. Dobijeno je da u uzorcima mozga miševa koji su bili izloženi ishemiji dolazi do povećanja ekspresije matriks metaloproteinaze-9. Predtretman vitaminom D, u trajanju od 7 dana pre izlaganja ishemiji, bio je praćen odsustvom promene u ekspresiji matriks metaloproteinaze-9 nakon prolazne moždane ishemije. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na povećanu ekspresiju matriks metaloproteinaza prilikom ishemije, ali i na brojna povoljna svojstva i dejstva vitamina D u različitim patološkim stanjima.

Uvod

Matriks metaloproteinaze (MMP) su cink zavisne endopeptidaze koje pripadaju široj porodici proteaza. Kao proteolitički enzimi, raskidaju peptidne veze unutar molekula proteina, degradiraju proteine vanćelijskih tečnosti i receptore površine ćelije, oslobađaju molekule uključene u apoptozu, učestvuju u deobi, diferencijaciji i migraciji ćelija, odnosno u interakciji ekstracelularnog matriksa i ćelije. Prilikom različitih patoloških stanja dolazi do poremećaja u njihovoj ekspresiji i aktivnosti.

Globalna prolazna moždana ishemija je stanje u kome je, u kraćem vremenskom periodu, sprečen dotok krvi u mozak. Oksidativni stres odnosno povećanje koncentracije slobodnih radikala, aktivacija apoptotskih faktora i proteolitičkih enzima su glavne posledice oštećenja ćelije prilikom ishemije (Hong *et al.* 2012). Istraživanja pokazuju da je globalna prolazna moždana ishemija obično praćena povećanjem aktivnosti MMP (Lo *et al.* 2002), što se povezuje sa povećanom sa povećanom koncentracijom intracelularnog Ca^{2+} .

U ishemiji dolazi do prekomernog oslobađanja ekscitatornog neurotransmitera glutamata koji dovodi do izraženog povećanja Ca^{2+} jona i povećanja aktivnosti kalcijum zavisnih proteolitičkih enzima (ekscitotoksičnost). Intracelularni Ca^{2+} masovno se oslobađa otvaranjem kalcijumovih kanala na endoplazmatičnom retikulumu pomoću inozitol trifosfata (IP_3). IP_3 nastaje hidrolizom fosfatidilinozitol bifosfata (PIP_2), lipida unutrašnjeg sloja plazmine membrane, pomoću fosfolipaze C- β . Drugi produkt hidrolize PIP_2 je diacilglicerol (DAG). Diacilglicerol čine po lanac zasićene i nezasićene masne kiseline i glicerol. Nakon hidrolize pod uticajem fosfolipaze, ostaje ugrađen u membrani. Njegova glavna uloga je aktivacija protein kinaze C (PKC). Međutim, da bi PKC bila aktivirana, kao Ca^{2+} zavisna kinaza, Ca^{2+} joni indukovani pomoću IP_3 je pomeraju iz citosola do unutrašnjeg dela plazmine membrane, gde je aktivira DAG (Alberts *et al.* 2002; Kohn *et al.* 1994). Određena istraživanja su pokazala da je aktivacija PKC praćena povećanjem aktivacije i ekspresije MMP (Sokolova *et al.* 2012).

Postoje brojni rezultati koji ukazuju na protektivna svojstva vitamina D u moždanom tkivu *in vivo*. Vitamin D deluje inhibitory na ulazak Ca^{2+} jona (Harms *et al.* 2011). Pokazano je da vitamin D povećava nivo antioksidanasa, kao što je glutation i

Ana Petronijević (1995), Beograd, Prvoboraca 30G/7, učenica 2. razreda Treće beogradske gimnazije

MENTOR: Luka Mihajlović, diplomirani biohemičar, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

štiti od ekscitotoksičnosti glutamata. Druga istraživanja pokazuju da je nizak nivo vitamina D faktor koji utiče na razvoj brojnih hroničnih kardiovaskularnih i autoimunih bolesti, kancera, infekcija i brojnih drugih patoloških stanja. Deficit vitamina D pogoršava eksperimentalno izazvanu ishemiju (Bal-den *et al.* 2012).

Cilj ovog rada je bio da se ispita poremećaj u ekspresiji MMP-9 kao i dejstvo vitamina D na MMP-9 u mozgu pustinjskog miša (*Meriones Unguiculatus*, Mongolski džerbil) prilikom globalne prolazne moždane ishemije.

Materijal i metode

Tretiranje životinja i pripremanje uzorka

Istraživanje je vršeno na pustinjskim miševima (*Meriones Unguiculatus*, Mongolski džerbil), mužjacima, starim dva meseca, odgajanim u standardnim laboratorijskim uslovima, na sobnoj temperaturi i sa dnevnim ciklusom svetlo mrak, hrana i voda ad libitum. Miševi su bili razvrstani u tri grupe:

1. (kontrolna) grupa – podvrgnuta operativnom zahvatu bez zatvaranja karotidnih arterija;
2. grupa – podvrgnuta zatvaranju karotidne arterije, odnosno ishemiji, tokom 10 minuta; životinje su žrtvovane 24 časa kasnije;
3. grupa je tokom sedam dana pre operacije primala intraperitonealno injekcije sa vitaminom D₃, a tek potom su životinje bile podvrgnute ishemiji tokom 10 minuta, i isto žrtvovane nakon 24 časa.

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, odnosno dekapitacijom, a glave su odmah nakon toga zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C. Ovaj deo eksperimenta je urađen na Vojnomedicinskoj akademiji.

Izolovane su strukture korteksa i hipokampusa i homogenizovane po metodi Asahi i saradnika (2000) na ledu sa 10 volumena pufera za liziranje (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.1% deoksiholna kiselina), koji sadrži proteazne inhibitore (2 µg/mL leupeptin, 2 µg/mL aprotinin, 1 mM PMSF). Nakon centrifugiranja, odvojeni su supernatanti koji su korišćeni za dalja ispitivanja.

Određena je ukupna koncentracija proteina u homogentu metodom po Bradfordu, uz upotrebu Coomassie blue G-250 boje koja se specifično vezuje

za pojedine aminokiseline. Standardna kriva je pravljena pomoću različitih razblaženja BSA (bovine serum albumin), a apsorbancija je čitana na 595 nm.

Priprema uzoraka za elektroforezu za Western blot

Na osnovu utvrđene koncentracije proteina u uzorcima preračunata je zapremina koju je bilo potrebno uzeti da bi bilo 50 µg proteina u svakom uzorku koji je se koristiti za forezu. Toj zapremini je dodat sample pufer (Lemli 2× (4% SDS, 10% glicerol, 0.004% bromfenol plavo, 0.125M TRIS HCl pH 8.8) u odnosu 1:1. SDS se vezuje za proteine i daje im negativno naelektrisanje, glicerol povećava gustinu uzorka i omogućava puštanje u bunarić na gelu, a bromfenol plavo je boja koja omogućava da se prati migracija pojedinih komponenti u gelu. Boja je anjonska i male molekulske mase zbog čega se kreće pre svih ostalih komponenti (Asahi *et al.* 2001). Ovakvi uzorci prokuvani su na 100°C tokom 3 minuta, a zatim stavljeni na led i čuvani u zamrzivaču do daljeg ispitivanja. Ovaj deo projekta urađen je na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Western blot

Elektroforeza. Elektroforeza uzoraka svih triju grupa izvršena je na 10% poliakrilamidnom gelu za razdvajanje (4 mL H₂O, 3.3 mL 30% akrilamid/bisakrilamid, 2.5 mL Tris pH 8.8, 100 µL SDS, 100 µL APS, 4 µL TEMED), sa gornjim 4% gelom za koncentrovanje (3.4 mL H₂O, 830 µL 30% akrilamid/bisakrilamid, 630 µL Tris pH 6.8, 50 µL APS, 5 µL TEMED), na naponu od 100 V i 30 mA (po dve ploče) u standardnom puferu sa elektroforezu 1 × Running buffer (900 mL H₂O, 100 mL 10 × Running buffer (Tris 30.275 g, glicin 144.135 g, SDS 10 g, H₂O do 1 L)).

Transfer. Nakon elektroforeze izvršen je „Semi-dry” transfer proteina na nitroceluloznu membranu. Gelovi su bili postavljeni u sendvič između filter papira (tri filter papira/membrana/gel/tri filter papira), gde su i gelovi i filter papiri prethodno bili potopljeni u transfer pufer (250 mL 4 × Transfer pufer, 200 mL Metanol, 550 mL H₂O). Po završetku transfera, membrane su obojene Ponceau S bojom (u 5% sirćetnoj kiselini) tako da se prikažu trake transferovanih proteina.

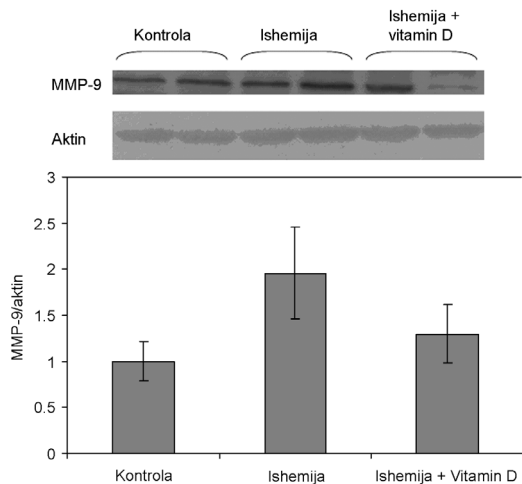
Detekcija MMP-9

Membrane su prvobitno ispirane u TBS-T puferu (TBS 100 mL, H₂O 900 mL, Tween-20 0.5 mL). Nakon toga je izvršeno blokiranje nespecifičnih mesta mlekom (nemasno mleko u prahu; 1 g mleka u 20 mL TBS-T) 60 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je inkubirana sa zečjim primarnim antitelom za MMP-9 (1:1000, poliklonsko, Sigma-Aldrich, Germany) preko noći na +4°C uz mešanje. Narednog dana membrane su inkubirane 60 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom (1:2000, kozje, Southern Biotech, USA) koje je konjugovano sa peroksidazom rena. Nakon ispiranja (5 puta po 5 minuta TBS-T) membrane su prelivene luminol radnim rastvorom koji je prethodno aktiviran pomoću 30% H₂O₂. Na ovaj način aktivirana je hemiluminiscencija (enhanced chemiluminescence – ECL) koja omogućava vizuelizaciju, a bazira se na emisiji svetlosti u toku oksidacije luminola koja se odigrava u toku reakcije između peroksidaze rena i vodonik peroksida. Emitovana svetlost je registrovana na filmu. Membrane su kasnije stripovane i nakon ponovnog blokiranja mlekom, 90 minuta su inkubirane sa primarnim antitelom na aktin (1:10000, mišje, monoklonsko, Sigma-Aldrich, Germany) da bi se proverilo da su svi bunarići bili podjednako napunjeni. Na filmu, dobijene trake MMP-9 u uzorcima ustanovljene su pomoću markera (smeše proteina koje se na gelu odvajaju na osnovu tačno određenih molekulskih masa) i njihove poznate mase od 92 kDa. Kvantifikacija je vršena pomoću programa ImageQuant 5.2.

Rezultati i diskusija

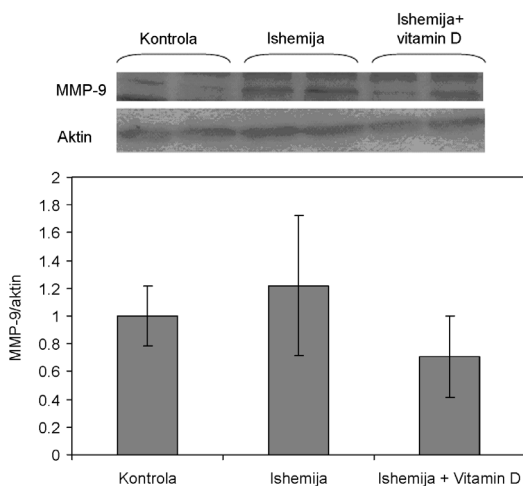
Merenja su pokazala da je ekspresija MMP-9 povećana prilikom globalne prolazne moždane ishemije kod miševa koji su joj bili izloženi. Kod miševa koji su pre ishemije bili tretirani vitaminom D, došlo je do smanjenja ekspresije MMP-9 u odnosu na miševu koji su bili izloženi samo ishemiji. Ekspresija MMP-9 i aktina u uzorcima korteksa i hipokampusa prikazane su na slikama 1 i 2.

Smanjenje MMP-9 nakon pretretmana vitaminom D dopunjuje nalaze o njegovim brojnim protektivnim svojstvima, koja ispoljava prilikom zapaljenja ili oksidativnog stresa, koji nastaju kao posledica ishemije. Jang i saradnici (2012) su pokazali da regulatori slobodnih radikala kao što su kvercetin i



Slika 1. Western blot analiza ekspresije MMP-9 i aktina u uzorcima korteksa. Histogram predstavlja vrednosti očitane u programu ImageQuant sa proteinskih traka (iznad).

Figure 1. Western blot of MMP-9 expressions and actin in cortex samples. The histogram above shows values obtained from protein strips in the ImageQuant program.



Slika 2. Western blot analiza ekspresije MMP-9 i aktina u uzorcima hipokampusa. Histogram predstavlja vrednosti očitane u programu ImageQuant sa proteinskih traka (iznad).

Figure 2. Western blot of MMP-9 expressions and actin in hippocampus samples. The histogram above shows values obtained from protein strips in the ImageQuant program.

melatonin imaju inhibitorno dejstvo na MMP-9, dok su Ekici i saradnici (2009) pokazali da Vitamin D₃ u kombinaciji sa dehidroaskorbinskom kiselinom reaguje kao antioksidans i smanjuje nivo malondialdehida, sekundarnog proizvoda lipidne peroksidacije, kao posledice oksidativnog stresa u korteksu miševa. Chen i saradnici (2003) su pokazali da vitamin D povećava nivo antioksidanasa kao što je glutathion. Luong i Nguyen (2012) su u svom istraživanju pokazali da su poremećaj u metabolizmu i disfunkcija vitamina D prisutni kod pacijenata sa virusnim hepatitisom. Takođe, pokazano je da se deficit vitamina D smatra faktorom rizika u razviću neuropsihijatrijskih poremećaja kao što je šizofrenija (Eyles *et al.* 2012).

Interesantno je napomenuti, da osim što može biti posledica, druga istraživanja pokazuju da MMP-9 može biti i uzrok raznih patoloških poremećaja. Debalans između MMP i njenih inhibitora, odnosno povećanje njene ekspresije može biti uzrok reumatičnog artritisa i osteoartritisa, akutnih i hroničnih kardiovaskularnih bolesti (Beurden *et al.* 2005). Ulrich *et al.* (2012) su pokazali da je ekspresija i aktivnost MMP-9 u krvi povećana kod pacijenata sa akutnom ishemijom mozga.

Zaključak

Ispitivanjem uticaja predtretmana vitaminom D na ekspresiju MMP-9 indukovanu prolaznom moždanom ishemijom, pokazano je da je kod miševa koji su bili izloženi prolaznoj moždanoj ishemiji, a bili su tretirani vitaminom D, nivo ekspresije MMP-9 smanjen u odnosu na miševe koji nisu bili tretirani vitaminom D. Dakle, dobijeni rezultati potvrđuju protektivna svojstva vitamina D u odnosu na patofiziološke procese koji se pokreću u ishemiji mozga. Značajan doprinos bi donela dalja istraživanja o delovanju vitamina D na aktivatore i inhibitore matriks metaloproteinaza.

Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science

Asahi M., Asahi K., Jung J. C., del Zoppo G. J., Fini M. E., Lo E. H. 2000. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition

with BB-94. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, **20**: 1681.

Asahi M., Wang X., Mori T., Sumii T., Jung J. C., Moskowitz M. A., Fini M. E., Lo E. H. 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, **21**: 7724-32.

Balden R., Selvamani A., Sohrabji F. 2012. Vitamin D deficiency exacerbates experimental stroke injury and dysregulates ischemia-induced inflammation in adult rats. *Endocrinology*, **153**: 2420.

Chen K. B., Lin A. M., Chiu T. H. 2003. Systemic vitamin D₃ attenuated oxidative injuries in the locus coeruleus of rat brain. *Annual New York Academy of Science Journal*, **993**: 313.

Ekici F., Ozyurt B., Erdogan H. 2009. The combination of vitamin D₃ and dehydroascorbic acid administration attenuates brain damage in focal ischemia. *Journal of Neural Science*, **30**: 207

Eyles D. W., Burne T. H., McGrath J. J. 2012. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **34**: 4.

Harms L. R., Burne T. H., Eyles D. W., McGrath J. J. 2011. Vitamin D and the brain. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, **25**: 657.

Hong J. S., Chu Y. K., Lee H., Ahn B. H., Park J. H., Kim M. J., Lee S., Ryoo H. S., Jang J. H., Lee S. R., Park J. W. 2012. Effects of berberine on hippocampal neuronal damage and matrix metalloproteinase-9 activity following transient global cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, **90**: 489.

Jang J. W., Lee J. K., Lee M. C., Piao M. S., Kim S. H., Kim H. S. 2012. Melatonin reduced the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a rat photothrombotic stroke model. *Journal of Neural Science*, **323**: 221.

Kohn E. C., Jacobs W., Kim Y. S., Alessandro R., Stetler-Stevenson W.G., Liotta L. A. 1994. Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 21505.

Luong K. V., Nguyen L. T. 2012. Theoretical basis of a beneficial role for vitamin D in viral hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, **18**: 5338.

Lo E. H., Wang X., Cuzner M.L. 2002. Extracellular proteolysis in brain injury and

inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *Journal of Neuroscience Research*, **69**: 1.

Sokolova O., Vieth M., Naumann M. 2012. Protein kinase C isozymes regulate matrix metalloproteinase-1 expression and cell invasion in *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, **62**: 358.

Snoek-van Beurden P. A., Von den Hoff J. W. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, **38**: 73.

Ulrich N. H., Dehmel T., Wittsack H. J., Kieseier B. C., Seitz R. J. 2012. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinase-9 predict lesion volume in acute stroke. *Neural Science*, **34**: 379.

Ana Petronijević

Effects of Vitamin D on the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Ischemia Performed in Mice Brain

Matrix metalloproteinases are zinc-dependent endopeptidases. They take part in many processes,

such as degrading matrix proteins, cell migration, differentiation, apoptosis and other. They are considered as a risk factor for many diseases, but also as a consequence of many conditions, such as ischemia. It has been shown that vitamin D has many protective effects in various disorders and diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, inflammation and others.

In this work the effect of Vitamin D on the expression of MMP-9, induced by ischemia, in isolated structures of mice cortex and hippocampus, has been investigated.

Western blot analyses were performed on cortex and hippocampus samples. Electrophoresis was done on a 10% polyacrylamide gel, and after that proteins from the gel were transferred to a nitrocellulose membrane. After the detection of MMP-9 with primary and secondary antibodies, their expressions were measured. The results suggested that mice which faced ischemia had an increased level of MMP-9, which is in line with the literature. The mice which were treated with vitamin D but also faced ischemia had a normalized level of MMP-9 as expected. This suggests the protective effects of vitamin D on MMP-9 expression in the ischemic brain after global brain ischemia. 