

Ewa Pastuszka, Agata Pabin, Marek Radkowski

METALOPROTEINAZY W ZAPALENIACH OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH I MÓZGU

Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik Zakładu: Marek Radkowski

W pracy dokonano przeglądu najnowszych doniesień na temat żelatynaz stanowiących jedną z grup enzymów proteolitycznych znanych pod nazwą metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Przedstawiono ich budowę oraz rolę w patogenezie chorób zakaźnych, ze szczególnym uwzględnieniem bakteryjnych i wirusowych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu.

Słowa kluczowe: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, żelatynazy, bakteryjne/wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, bariera krew-mózg
Keywords: Matrix-metalloproteinases (MMP), gelatinases, bacterial/viral meningoencephalitis, blood-brain barrier

WSTĘP

Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (zomr) powstaje w sytuacji przetrwałej bakteriemii lub wiremii, na skutek przeniknięcia czynnika zakaźnego do przestrzeni podpajęczynówkowej. Ośrodkowy układ nerwowy, będący miejscem częściowo „uprzywilejowanym” immunologicznie, charakteryzuje się obecnością stosunkowo małej ilości komórek odpornościowych, co może prowadzić do szybkiej replikacji patogenu, a w konsekwencji do uszkodzenia tkanek (1). Zejście choroby, w tym powikłania neurologiczne pod postacią uszkodzenia mózgu i narządów zmysłu, padaczki czy wodogłowia, jak również śmiertelność, pozostają w ścisłym związku z czynnikiem etiologicznym (2). W ostrej fazie zomr dochodzi do nadmiernej produkcji cytokin pro-zapalnych takich jak: TNF- α , Il-6 czy Il-8. Przy jednoczesnym niedoborze cytokin przeciwzapalnych (Il-10, TGF- β 1) dochodzić może do niekorzystnego zejścia choroby (3).

Patogeny przedostają się do ośrodkowego układu nerwowego po przełamaniu barier fizjologicznych składających się ze ścisłych połączeń śródbłonka naczyń kapilarnych mózgu, komórek pajęczynówki oraz komórek nabłonkowych spłotu naczyńkowego (4).

W warunkach patologicznych dochodzi do uszkodzenia tych połączeń, wzmożonej mikropinocytozy, zwiększenia podatności układu błon cytoplazmatycznych, zmian w transporcie substancji odżywczych oraz tworzenia mikroporów (5). Modyfikacje te, będące wynikiem stanu zapalnego powstałego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, sprzyjają dalszemu rozprzestrzenianiu się patogenów i szerzeniu zakażenia.

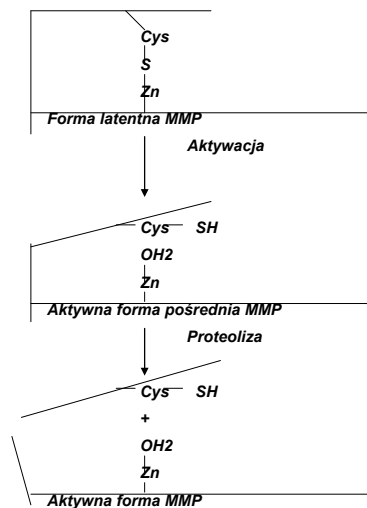
W prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr) stwierdza się nieznaczną aktywność opsonizacyjną wynikającą z niskiego stężenia komplementu, immunoglobulin oraz makrofagów prezentujących antygen (1). Dlatego też po przedostaniu się drobnoustrojów do pmr może dochodzić do ich gwałtownego namnażania się oraz rozwoju procesu zapalnego. Głównymi cytokinami uczestniczącymi w reakcji zapalnej są TNF - α (czynnik martwicy nowotworu - α ; *tumor necrosis factor* - α) i IL - 1 (interleukina - 1). TNF - α istnieje w dwóch biologicznie czynnych postaciach: rozpuszczalnej i błonowej. TACE (TNF - α - *converting enzyme*) jest enzymem o charakterze metaloproteinyazy, który przekształca TNF - α błonowy w jego formę rozpuszczalną, zaś rozpuszczalny TNF- α uwalnia i aktywuje metaloproteinyazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) w mózgu, działające proteolitycznie (6).

BUDOWA I ROLA METALOPROTEINAZ

Metaloproteinyazy są enzymami proteolitycznymi należącymi do rodziny endoproteinaz. Enzymy te mają jednakową domenę strukturalną i zawierają cynk w miejscu aktywnym (7). Geny metaloproteinaz ulegają ekspresji w różnych typach komórek, m.in. fibroblastach, makrofagach, granulocytach obojętnochłonnych, komórkach synowialnych, nabłonkach, mięśni gładkich naczyń, jak również w neuronach, komórkach gleju i epitelialnych splotu naczyniowego. Wydzielanie MMP jest inicjowane przez czynniki wzrostu (czynnik aktywujący płytki krwi, *platelet-derived growth factor* - PDGF), IL-1, TNF- α i fagocytozę, a hamowane przez transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor* β - TGF- β) i glikokortykosteroidy. Metaloproteinyazy są wydzielane w formie nieaktywnych pro-metaloproteinaz, które z kolei mogą być aktywowane przez proteinyazy, plazminę, a *in vitro* również przez specyficzne czynniki chemiczne (jony metali, oksydanty, detergenty); (8). Niskie pH i wysoka temperatura otoczenia, czy obecność tlenu azotu (NO) również prowadzi do ich aktywacji (7). Dla zachowania kontroli funkcji aktywne MMP są inaktywowane przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (*tissue inhibitor of metalloproteinases* - TIMP), wytwarzane przez większość komórek, jak również przez połączenie z białkami surowicy np. z α -2-makroglobuliną (7). Proces aktywacji metaloproteinaz został schematycznie przedstawiony na ryc.1.

Biorąc pod uwagę ich specyfikę substratów oraz efekt biologiczny MMP możemy podzielić na 6 grup: kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), żelatynazy (MMP-2, MMP-9), stromelizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11), elastazy (MMP-7, MMP-26, MMP-12), metaloproteinyazy typu błonowego (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) oraz grupę kilku innych metaloproteinaz, których efekt biologiczny jest wciąż nieznyany. (7, 9).

Zdolność MMP do lizy błony podstawnej tkanki podśródłonkowej czyni MMP związkami biorącymi udział w uszkodzeniu bariery krew-mózg, prowadzącym do migracji leukocytów poza światło naczynia, narastania procesu zapalnego oraz hypoperfuzji



Ryc.1 Aktywacja nieczynnej formy MMP; (8, 25)

Fig.1 MMP latent form activation; (8, 25)

tkanki nerwowej (10, 11,12). Dotychczas prowadzone badania potwierdzają znaczącą rolę żelatynaz w chorobach zakaźnych i zapalnych ośrodkowego układu nerwowego (10, 13, 14). W prawidłowym pmr nie stwierdza się obecności MMP-9, natomiast obserwowano jej wzmożoną aktywność u pacjentów z wirusowym i bakteryjnym zomr i mózgu (13, 15, 10), stwardnieniem rozsianym (14) czy u chorych zakażonych HIV (16). Metaloproteinaza 9 prowadzi do uszkodzenia bariery krew mózg poprzez trawienie białek blaszki podstawnej, oddzielającej komórki endotelialne mózgu od przylegających perycytów i komórek astrogleju, co umożliwia dalszą penetrację bakterii i szerzenie się procesu zapalnego (17). Aktywność MMP-9 w pmr pacjentów z zomr pośrednio prowadzi do obrzęku mózgu i następstw neurologicznych pod postacią porażień, niedowładów, utraty słuchu, wtórnej padaczki czy zaburzeń poznawczych (18). Ponieważ degranulacja MMP-9 z granulocytów obojętnochłonnych jest procesem przebiegającym niezwykle szybko, jej aktywność proteolityczna jest wykrywalna już po 3-6 h od momentu wniknięcia bakterii do oun (15). W płynie mózgowo - rdzeniowym pacjentów z bakteryjnym zomr i zespołem Guillian-Barre, przy użyciu testów immunoenzymatycznych, odnotowano podwyższone stężenie MMP-9 i tkankowego inhibitora metaloproteinaz-1 (TIMP-1) (15).

Zakażenia wywołane przez prątki chorobotwórcze indukują aktywność MMP-9 i MMP-2 zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co umożliwia migrację limfocytów przez uszkodzoną barierę krew-mózg oraz przyczynia się do uszkodzenia tkanki nerwowej (19). Neutralizacja TNF- α , IL-18 znacząco redukuje produkcję MMP w odpowiedzi na obecność *M. tuberculosis* a immunoregulujący wpływ IFN- γ zmniejsza aktywność MMP (19). Chorzy z gruźlicą oun, u których obserwowano późne powikłania neurologiczne, wykazywali znacząco podwyższone wartości MMP-9 i MMP-2, w porównaniu z pacjentami bez następowych deficytów neurologicznych (20). U osób, z zakażeniem oun wywołanym przez *M. tuberculosis*, u których stwierdzono wzmożoną aktywność MMP-9 przy niskiej zawartości

TIMP-1, znacznie częściej dochodziło do uszkodzenia tkanki nerwowej, objawiającego się splątaniem, ogniskowym deficytem neurologicznym, utratą świadomości (wynik w skali Glasgow <11) (21).

W zakażeniach oun źródłem MMP-9 są zarówno neurony, komórki gleju jak i napływające makrofagi i granulocyty obojętnochłonne. Granulocyty mogą dodatkowo aktywować MMP-9 na drodze tlenowo-zależnej (23). W doświadczalnym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu u zwierząt wywołanym *Coccidioides immitis* obserwowano wzrost aktywności MMP-9 korelujący z nasilonym stanem zapalnym w obrębie oun oraz współistniejącym zapaleniem naczyń mózgowych (22). W doświadczeniach przeprowadzanych na szczurach, którym podano intratekalnie inaktywowany szczep *Neisseria meningitidis* stwierdzano uszkodzenie bariery krew - mózg (w histopatologicznej ocenie skrawków mózgu stwierdzano obecność barwnika, uprzednio podanego dożylnie, w przestrzeni podpajęczynówkowej), wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego oraz pleocytozę płynu mózgowo - rdzeniowego korelujące z aktywnością MMP-9 (15). Podanie BB-94 (inhibitor metaloproteinaz - batimastat) powodowało znaczącą redukcję uszkodzenia bariery krew - mózg, nie wpływało natomiast na zmniejszenie liczby komórek zapalnych w płynie mózgowo - rdzeniowym (11). W podobnym eksperymencie na szczurach, u których doświadczalnie wywołano zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu podając szczep *Streptococcus pneumoniae*, zaobserwowano znaczącą redukcję uszkodzenia kory mózgu (oceniając w badaniu histopatologicznym) po podaniu GM6001 - inhibitora MMP-9 (23). Zastosowanie TNF484 - rozpuszczalnego w wodzie inhibitora MMP i TACE, wykazywało neuroprotektoryjny wpływ na komórki kory mózgowej jak również zmniejszało częstość napadów padaczkowych u szczurów z pneumokokowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu (24).

PODSUMOWANIE

Mięszkowe uszkodzenie tkanki nerwowej jest głównym powikłaniem zomr. Prowadzi ono do wielu następstw neurologicznych, między innymi: zaburzeń percepcji, wodogłowia, padaczki, zaburzeń psychicznych czy niedowładów. Jedną z przyczyn prowadzących do powikłań pochorobowych jest działalność enzymów proteolitycznych: żelatynaz. Szereg doświadczeń potwierdziło aktywność MMP-2 i MMP-9 w chorobach oun, których charakterystyczną cechą jest uszkodzenie bariery krew-mózg i migracja leukocytów wydzielających żelatynazy do oun. Rodzaj uczestniczących w zapaleniu białych krwinek, jak również rodzaj choroby wpływa na aktywność MMPs w płynie mózgowo - rdzeniowym. Z uwagi na różnicę stężeń enzymów w poszczególnych okresach choroby, mogą one być przydane w monitorowaniu przebiegu schorzenia oraz leczenia. Na podstawie licznych doświadczeń wysoko oceniono korzyści wynikające z zastosowania syntetycznych inhibitorów MMP w chorobach oun, co rzuca nowe światło na możliwość skutecznego leczenia.

E Pastuszka, A Pabin, M Radkowski

METALLOPROTEINASES IN MENINGOENCEPHALITIS

SUMMARY

Meningoencephalitis remains a devastating disease with high morbidity and mortality. Despite advances in antibiotic treatment and critical care, mortality rate in bacterial meningoencephalitis is close to 25%. Moreover, neurological and neuropsychological sequelae emerge in up to 50% of survivors. Adverse outcome is significantly associated with events secondary to meningitis and damage of the blood-brain barrier. Several studies conducted on animals confirmed that matrix-metalloproteinases (MMP), a family of enzymes with major actions in the remodeling of extracellular matrix components facilitate this process which results in acute neurological complications. Gelatinases (MMP-2, MMP-9), the most complex family member, through degradation of gelatine and collagen IV play an important role in the pathogenesis of brain's inflammatory diseases (e.g. Guillian-Barre syndrome) and contribute to spreading the disease beyond the central nervous system. Infection (bacterial, viral or fungal) can lead to increased concentration and activity of metalloproteinases due to excessive enzyme's secretion or decrease in level of its natural inhibitors. A detailed analysis of those enzymes could help in developing new diagnostic and prognostic markers for meningoencephalitis and could facilitate new treatment approaches.

PIŚMIENNICTWO

1. Stokłosa T. Psychoneuroimmunologia. W: Gołąb J, Jakubisiak M, Lasek W. Immunologia. Warszawa: Wydaw. Nauk. PWN, 2004: 326-337.
2. Przyjałkowski W. Objawy neurologiczne w chorobach zakaźnych. *Neurologica* 2003; 4: 53-56.
3. Sato M, Hosoya M, Honzumi K, i in. Cytokine and Cellular Inflammatory Sequence in Enteroviral Meningitis. *Pediatrics* 2003; 112 (5): 1103-1107.
4. Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone 2005: 1079-1164.
5. Hirst R, Gosai B, Rutman A, i in. *Streptococcus pneumoniae* Damages the Ciliated Ependyma of the Brain During Meningitis. *Infect Immun* 2003: 6095-6100.
6. Leib S, Clements J, Lindberg R, i in. Inhibition of Matrix Metalloproteinases and Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme as Adjuvant Therapy in Pneumococcal Meningitis. *Brain* 2001; 124: 1734-1742.
7. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* 2003; 92: 827.
8. Mirowska D, Członkowska A. Rola metaloproteinaz w patogenezie chorób układu nerwowego. *Neur Neurochir Pol* 2001; 35(1): 101-110.
9. Hoekstra R, Eskens F, Verweij J. Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Current Developments and Future Perspectives. *The Oncologist* 2001; 6: 415-427.
10. Azeh I, Mader M, Smirnov A, i in. Experimental Pneumococcal Meningitis in Rabbits: the Increase of Matrix Metalloproteinase-9 in Cerebrospinal Fluid Correlates with Leucocyte Invasion. *Neurosci Lett* 1998; 256 (3): 127-30.
11. Lorenzl P, Paul R, Koedel U, i in. Matrix Metalloproteinases Contribute to the Brain-Barrier Disruption During Bacterial Meningitis. *Ann Neurol* 1998, 44 (4): 592-600.
12. Rosenberg G Matrix Metalloproteinases in Neuroinflammation. *GLIA* 2002, 39: 279-291.
13. Leib S, Leppert D, Clements J, i in. Matrix Metalloproteinases Contribute to Brain Damage in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Infect Immun* 2000, 615-620.

14. Leppert D, Leib S, Grygar C, i in. Matrix Metalloproteinases: Multifunctional Effectors of Inflammation in Multiple Sclerosis and Bacterial Meningitis. *Brain Res* 2001;36(2- 3): 249-57.
15. Kieseier B, Paul R, Koedel U, i in. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases in Bacterial Meningitis *Brain* 1999; 122: 1579-1587.
16. Sporer BR. Presence of Matrix Metalloproteinase-9 Activity in the Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *J Infect Dis* 1998; 178:854.
17. Mun-Bryce S, Rosenberg G, Gelatinase B. Modulates Selective Opening of the Blood-Brain Barrier During Inflammation *Am J Physiol* 1998; 274: 1203-1211.
18. Leppert D, Lindberg R, Kappos L, i in. Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in Cerebrospinal Fluid During Bacterial Meningitis: Association with Blood-Brain Barrier Damage and Neurological Sequelae. *Clin Infect Dis* 2000; 31:80-4.
19. Quiding-Jarbrink M, Smith D, Bancroft J Production of Matrix Metalloproteinases in Response to Mycobacterial Infection. *Infect Immun* 2001; 69 (9): 5661-5670.
20. Lee K, Kim E, Yang W, i in. Persistent Increase of Matrix Metalloproteinases in Cerebrospinal Fluid of Tuberculous Meningitis. *J Neurol Sci* 2004; 220 (1-2): 73-78.
21. Price N, Farrar J, Chau T, i in Identification of a Matrix-Degrading Phenotype in Human Tuberculosis In Vitro and In Vivo. *J Immunol* 2000; 166: 4223-4230.
22. Williams P, Leib S, Kamberi P, i in. Levels of Matrix Metalloproteinase-9 Within Cerebrospinal Fluid in a Rabbit Model of Coccidioidal Meningitis and Vasculitis. *J Infect Dis* 2002; 186: 1692-1695.
23. Meli D, Christen S, Leib S. Matrix Metalloproteinase-9 in Pneumococcal Meningitis: Activation via an Oxidative Pathway. *J Infect Dis* 2003; 187: 1411-5.
24. Nau R, Bruck W. Neuronal Injury in Bacterial Meningitis: Mechanisms and Implications for Therapy. *Trends Neurosci* 2002; 25(1): 38-45.
25. Kotulska-Wolwender K, Larysz-Brysz M, Fus Z, i in. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej - perspektywy ich wykorzystania w medycynie. *Wiad Lek* 2002; 55 (7-8): 463-471.

Otrzymano: 132.02.2008 r.

Adres Autorów:

Ewa Pastuszka
Zakład Immunopatologii
Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Akademii Medycznej w Warszawie
Ul.Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa
e-mail:evp@vp.pl
tel. 0667 792 553