

# **Matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9) v populácii slovenských detí s poruchami autistického spektra**

Mgr. Marta Husseinová<sup>1</sup>

(normálna a patologická fyziológia)

Spoluautori: Mgr. Ivan Belica<sup>1</sup>, MUDr. Mária Vidošovičová<sup>1</sup>, Mgr. Katarína Janšáková, PhD.<sup>1</sup>, doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD.<sup>1,2</sup>

Školiteľ: doc. MUDr. Jana Radošinská, PhD.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fyziologický ústav LF UK v Bratislave, <sup>2</sup>Centrum experimentálnej medicíny, Slovenská akadémia vied, Bratislava

## **Úvod**

Poruchy autistického spektra (PAS) spadajú pod pervazívne vývojové poruchy. Predstavujú skupinu neurovývinových porúch s typickou triádou príznakov – deficit v sociálnej komunikácii a interakcii, repetitívne vzory správania, záujmov a aktivít, a senzorické abnormality (1). PAS sú centrom mnohých výskumov, nakoľko ich etiopatogenéza a teda ani kauzálna terapia nie je známa. Viaceré prevažne animálne experimenty poukázali na to, že matrixové metaloproteinázy (MMP), a najmä MMP-9, môžu byť zapojené v etiopatogenéze PAS.

MMP predstavujú skupinu proteáz, ktoré sú dôležité pri degradácii a remodelácii extracelulárneho matrixu za fyziologických aj patologických podmienok. U ľudí je známych vyše 20 MMP, rozdelených do šiestich skupín na základe ich štruktúry a substrátovej špecificity. V našej práci sme sa zamerali na MMP-9, ktorá patrí do skupiny želatináz. Tým, že degraduje proteíny medzibunkovej hmoty, zohráva významnú úlohu pri mnohých ochoreniach, ako aj pri vývoji CNS, neurogenéze a neuroinflammácii (2). Zmena expresie MMP bola zaznamenaná v nervovej sústave ako odpoveď na zranenie alebo neurologické ochorenie (3).

Úloha MMP sa však zatiaľ v súvislostiach s PAS skúmala málo. Prítomnosť želatináz v mozgu potvrdilo viacero animálnych štúdií (4,5). Neuronálna MMP-9 sa podieľa na synaptickej plasticite a pri jej nesprávnej regulácii môže dochádzať k poruchám funkcie mozgu. V štúdií Abdallah a kol. (2012) sa ukázalo, že zvýšené hladiny MMP-9 v plodovej vode matiek boli následne spojené s vyšším výskytom PAS u ich detí (6). Poruchy v regulácii MMP by mohli čiastočne vysvetliť výsledky štúdií, v ktorých sa ukázalo, že v niektorých prípadoch PAS sú narušené synaptické spojenia (7), resp. prebieha abnormálna tvorba neurónových spojení (8,9).

V animálnej štúdií bola aktivácia MMP-9 pozorovaná simultánne s mitochondriálnou dysfunkciou a zvýšením zápalového cytokínu TNF- $\alpha$  u potkanov s autistickým fenotypom. Autori poukázali na neurozápalový mechanizmus vo vývoji charakteristického behaviorálneho a biochemického profilu PAS (10).

Napokon aj Wen a kol. (2018) poukazujú na abnormality v komplexoch medzibunkovej hmoty pri poruchách CNS súvisiacich so zmenenými sieťovými funkciami a hladinami MMP-9. Zdôrazňujú potrebu práce zameranej na tieto komplexy v patofyziológii a terapii neurodegeneratívnych a neurovývinových porúch, vrátane PAS (11).

Cieľom nášho experimentu bolo porovnanie hladín MMP-9 medzi deťmi s PAS a neurotypickými deťmi a korelácia hladín MMP-9 v rámci populácie slovenských detí s PAS so stupňom klinického postihnutia, ako aj s hladinami vybraných cytokínov.

## **Materiál a metódy**

Diagnostika detí prebiehala v Akademickom centre výskumu autizmu (ACVA) na Fyziologickom ústave LF UK v Bratislave. Diagnostika zahŕňa priame pozorovanie dieťaťa (metóda ADOS-2) a štruktúrované interview s rodičom (metóda ADI-R). Pri oboch metódach dosiahne testované dieťa v jednotlivých doménach dotazníkov bodové skóre, ktoré poukazuje na závažnosť symptomatológie. Okrem diagnostických metód ADOS-2 a ADI-R sa pre výskumné účely používa aj dotazník škály adaptívneho správania Vineland (Vineland adaptive behavior scale - VABS). Touto metódou sa pokrýva oblasť adaptívneho správania, oblasť fyzickej aktivity a oblasť problémového správania. Vyhodnotením VABS je možné vytvoriť individuálny špecifický profil dieťaťa.

V deň diagnostiky sa vykonáva aj odber venóznej krvi do K<sub>3</sub>EDTA. Ihneď po odbere sa centrifugáciou (3000 g, 10 min) oddelí krvná plazma, ktorá je zmrazená pri -80°C až do uskutočnenia ďalších analýz.

Koncentráciu MMP-9 v plazme sme stanovili prostredníctvom komerčne dostupných ELISA súprav (EliKine™ Human MMP-9 ELISA Kit, Abbkine, Wuhan, Čína). Postupovali sme podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Vzorky plazmy sme na základe dostupných štúdií riedili 200-krát.

Pracovali sme so súborom 138 detí s diagnostikovanou PAS. Pri vyšetrovacej metóde ADOS-2 sme namerané hladiny MMP-9 rozdelili do troch skupín na základe modulov, do ktorých deti patrili: M-1, M-2 a M-3 (vylúčený bol modul batoliat pre nízku senzitivitu a špecificitu vo vyšetrovacích testoch a M-4 pre nedostatok diagnostikovaných detí). Pri vyšetrovacej metóde ADI-R toto delenie nebolo nutné a pracovali sme so všetkými dátami ako s jednou skupinou. Dotazník VABS bol vypracovaný pre 48 detí z nášho súboru (Tabuľka 1). Kontrolná skupina obsahovala 14 vzoriek plazmy od neurotypických detí s priemerným vekom  $6,7 \pm 2,7$  roka.

K dispozícii sme mali aj dáta nameraných 33 cytokínov u 76 detí z nášho súboru PAS detí. Na analýzu cytokínov bola využitá multiplexová analýza, umožňujúca simultánne stanovenie koncentrácie väčšieho počtu analytov z malého množstva plazmy v jednej jamke mikrotitračnej doštičky (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel -Immunology Multiplex Assay, EMD Millipore Corporation, USA) na základe protokolu odporúčaného výrobcom.

Dáta sme analyzovali pomocou štatistického softvéru GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Normalita dát bola sledovaná D'Agostino & Pearson testom

normality. Rozdiel v hladinách MMP-9 medzi kontrolnou vzorkou a deťmi s PAS bol testovaný Mann-Whitney testom. Korelačný koeficient sme získali Pearsonovym, resp. Spearmanovym testom. Hladinu štatistickej významnosti sme určili na  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Skúmali sme závislosť hladín MMP-9 (Tabuľka 1) od rôznych faktorov. Faktor veku nepreukázal štatisticky významnú závislosť s MMP-9, rovnako ani faktor pohlavia a modulu.

**Tabuľka 1. Charakteristika súboru diagnostikovaných detí metódou ADOS-2, ADI-R a VABS**

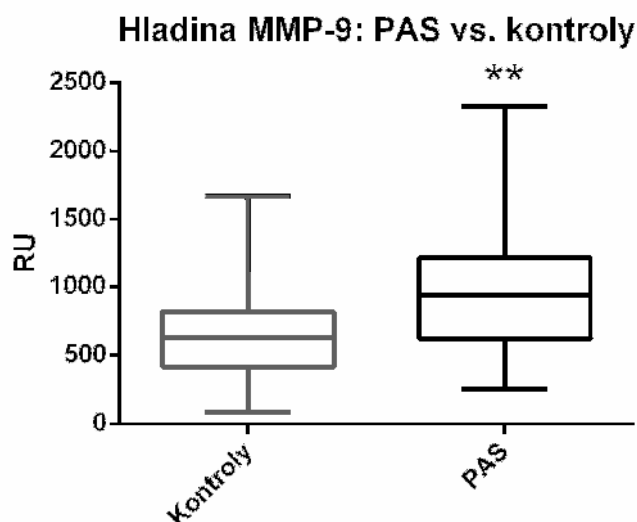
		počet detí	priemerný vek	chlapci	dievčatá	priemerná hladina MMP-9 (RU)	SD MMP-9
<b>ADOS-2</b>	<b>M-1</b>	81	3,8	68	13	1024,9	462,4
	<b>M-2</b>	22	5	17	5	1046,5	403,8
	<b>M-3</b>	35	8,6	28	7	871,3	373,8
<b>ADI-R</b>		138	5,2	113	25	989,4	435,1
<b>VABS</b>		48	5,7	44	4	960,8	413,9

M-1 - M-3 – moduly ADOS-2 metódy, MMP-9 – matrixová metaloproteináza-9, RU – relatívne jednotky, SD – smerodajná odchýlka

Zistené štatisticky významné korelácie MMP-9 s niektorými položkami dotazníkov ADOS-2, ADI-R a VABS boli slabé (korelačný koeficient v rozmedzí 0,2 – 0,4) a klinicky nekonzistentné.

V dotazníku VABS hlavné položky (škála komunikácie, škála zručností každodenného života, škála socializácie) vykazovali negatívnu koreláciu s hladinami MMP-9. Celkové skóre dotazníka VABS s hladinami MMP-9 signifikantne nekorelovalo.

U detí s PAS sme zistili signifikantne vyššie hladiny MMP-9 v porovnaní s neurotypickou skupinou (Obrázok 1).



**Obrázok 1. Hladiny MMP-9 u kontrolných detí a detí s PAS.** \*\* reprezentujú štatistickú hladinu významnosti  $p < 0,01$ . RU – relatívne jednotky. Graf znázorňuje minimum, dolný kvartil, medián, horný kvartil a maximum daného súboru.

Hladiny cytokínov vykazovali pozitívne slabé korelácie s MMP-9 v dvanástich prípadoch (Tabuľka 2).

**Tabuľka 2. Signifikantné korelácie MMP-9 s jednotlivými meranými cytokínmi**

Cytokín	r	p
IL-1a	0,355	0,034
IL-2	0,299	0,017
IL-4	0,302	0,018
IL-7	0,392	0,001
IL-10	0,331	0,004
IL-12p40	0,239	0,049
IL-15	0,365	0,013
Exotaxín	0,252	0,028
G-CSF	0,249	0,030
GM-CSF	0,240	0,049
IFNg	0,258	0,025
MIP-1b	0,289	0,011

r – hodnota korelačného koeficientu, p – štatistická významnosť, IL – interleukín, G-CSF – faktor stimulujúci kolónie granulocytov, GM-CSF – faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov, IFNg – interferón gama, MIP - maktofágové zápalové proteíny

## Diskusia

Štúdií, ktoré sa zaoberajú plazmatickými MMP u jedincov s PAS je minimum, aj to sú najmä štúdie animálne. Preto považujeme našu štúdiu za exploratívnu. Cieľom bolo sledovať MMP-9

v skupine slovenských detí s PAS, ktorá obsahovala 138 jedincov. Namerané hladiny MMP-9 boli nezávislé od faktorov ako vek, pohlavie, alebo modul, do ktorého deti spadali. Pri skúmaní jednotlivých kategórií a položiek diagnostických výstupov z dotazníkov ADOS a ADI-R sme síce zaznamenali niekoľko významných pozitívnych korelácií hladín MMP-9 so závažnosťou symptomatológie, avšak významnosti neboli klinicky konzistentné. Čo sa v našom experimente ale jednoznačne potvrdilo je, že deti s PAS majú významne vyššie hladiny MMP-9 v porovnaní s neurotypickými kontrolami. Tento fakt neovplyvnil ani veľký rozptyl nameraných hladín MMP-9 v oboch skupinách. Zvýšené hladiny MMP-9 v porovnaní s neurotypickými kontrolami boli zistené aj v štúdiu Abdallah a kol. (2012), ktorí ich ale merali v plodovej vode (6). Zvýšená génová expresia MMP-9 u jedincov s PAS bola potvrdená v štúdiu Fiorentina a kol. (2016) v hematoencefalickej bariére (12).

Syndróm fragilného chromozómu X je typickým správaním, ktoré je podobné PAS.

Na myšacom modeli tohto ochorenia sa podávaním minocyklínu dosiahla inhibícia MMP-9 a redukcia symptómov (13). Zmiernenie symptómov tohto ochorenia sa dosiahlo aj v štúdiu, kde MMP-9 expresiu znížilo podávanie metformínu (14).

Zaujímavým poznatkom je to, že v našej štúdiu všetky položky dotazníka VABS vykazovali negatívne korelácie s hladinami MMP-9, aj keď štatisticky nevýznamné. Najnižšiu hodnotu  $p = 0,059$  (pre  $r = -0,297$ ) vykazovala položka hrubej motoriky.

Ako sme predpokladali, namerané hladiny MMP-9 významne pozitívne korelovali s hladinami viacerých cytokínov, čo potvrdzuje prepojenie MMP-9 a zápalovej signalizácie u detí s PAS.

Naš experiment ukázal, že plazmatické hladiny MMP-9 sú vyššie u detí s PAS v porovnaní s neurotypickými deťmi, ale nereprezentujú mieru PAS symptómov, a teda ani mieru závažnosti klinického postihnutia. Môže to byť spôsobené malou vzorkou detí, ale aj tým, že nami merané hladiny MMP-9 boli merané v plazme, zatiaľ čo doterajšie experimenty hovoria o úlohe MMP-9 hlavne priamo v mozgu (3,8,9). Či by sa podávaním inhibítorov MMP-9 dosiahla redukcia PAS symptomatológie bude pravdepodobne predmetom ďalšieho výskumu.

*Podporené čiastočne grantom Lekárskej fakulty UK v Bratislave: UK/99/2019.*

## Zoznam použitej literatúry

1. Lai M-C, Lombardo M V, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet* 2014;383:896–910.
2. Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: Synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 2007;85(13):2813–2823.
3. Abdallah MW, Michel TM. Matrix metalloproteinases in autism spectrum disorders. *J Mol Psychiatry* 2013;1(1):16.
4. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:502.
5. Swarnakar S, Paul S, Singh LP, Reiter RJ. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *J Pineal Res* 2011;50(1):8–20.
6. Abdallah MW, Pearce BD, Larsen N, Greaves-Lord K, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Mortensen EL, Grove J. Amniotic Fluid MMP-9 and Neurotrophins in Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Autism Res* 2012;5(6):428–433.
7. Betancur C, Sakurai T, Buxbaum JD. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci* 2009;32(7):402–412.
8. Møller AR. Plasticity diseases. *Neurol Res* 2009;31(10):1023–1030.
9. Nickl-Jockschat T, Habel U, Michel TM, Manning J, Laird AR, Fox PT, Schneider F, Eickhoff SB. Brain structure anomalies in autism spectrum disorder--a meta-analysis of VBM studies using anatomic likelihood estimation. *Hum Brain Mapp* 2012;33(6):1470–1489.
10. Bhandari R, Kuhad A. Neuropsychopharmacotherapeutic efficacy of curcumin in experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Life Sci* 2015;141:156–169.
11. Wen TH, Binder DK, Ethell IM, Razak KA. The Perineuronal ‘Safety’ Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Front Mol Neurosci* 2018;11(August):1–17.
12. Fiorentino M, Sapone, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, Kelly DL, Cascella N, & Fasano A. (2016). Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular autism*, 2018;7, 49.
13. Toledo MA, Wen TH, Binder DK, Ethell IM, Razak KA. Reversal of ultrasonic vocalization deficits in a mouse model of Fragile X Syndrome with minocycline treatment or genetic reduction of MMP-9. *Behav Brain Res*. 2019 Oct 17;372:112068.
14. Gantois I, Khoutorsky A, Popic J, Aguilar-Valles A, Freemantle E, Cao R, Sharma V, Pooters T, Nagpal A, Skalecka A, Truong VT, Wiebe S, Groves IA, Jafarnejad SM, Chapat C, McCullagh EA, Gamache K, Nader K, Lacaille JC, Gkogkas CG, Sonenberg N. Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat Med*. 2017 Jun;23(6):674-67.