

УДК 616.233/24-007.17-053.2

РОЛЬ МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ С НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Мурсалова З.Ш.

*Научно-исследовательский институт педиатрии имени К.Я. Фараджевой,
Баку, e-mail: zenamursalova@gmail.com*

Целью настоящего исследования явилось изучение роли матричных металлопротеиназ и факторов апоптоза в развитии бронхолегочной дисплазии (БЛД) у детей, рожденных с низкой массой тела. К обследованию привлечены 32 ребенка грудного возраста, с бронхолегочной патологией, рожденные с низкой массой тела при рождении. Всем обследованным новорожденным проведены клинические, инструментальные, общеклинические лабораторные обследования. Определение матричных металлопротеиназ (ММП-1, ММП-2, ММП-9, ММПТИ), маркеров апоптоза (цитохром-С и аннексин-V) выполнялось стандартным иммуноферментным анализом с использованием диагностических тест-систем производства «GeneTexMMPs». В ходе исследования было установлено, что как при классической, так и при новой форме бронхолегочной дисплазии уровни маркеров апоптоза (цитохром-С и аннексин-V) увеличиваются в зависимости от тяжести патологического процесса и носят однонаправленный характер. На фоне понижения уровня металлопротеиназ (ММП) возможно повышение концентраций ММП-2, ММП-9 и ММПТИ, приводящее к нарушению изомерного содержания компонентов экстрацеллюлярного матрикса, аккумуляции коллагена и других белков, развитию в легких фиброзной ткани. Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно предположить, что нарушение баланса между маркерами апоптоза, металлопротеиназами и их ингибиторами у детей грудного возраста, рожденных с низкой массой тела, является важным механизмом при развитии БЛД.

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, металлопротеиназы, маркеры апоптоза, дети, рожденные с низкой массой тела

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND MARKERS OF APOPTOSIS IN THE PATHOGENESIS OF BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA IN CHILDREN BORN WITH LOW BODY WEIGHT

Mursalova Z.Sh.

*The Scientific Research Institute of Pediatrics named after K.Ya. Faradzheva,
Baku, e-mail: zenamursalova@gmail.com*

The purpose of this research was the study of the role of matrix metalloproteinases and apoptosis factors in the development of bronchopulmonary dysplasia (BLD) in children. 32 infants with bronchopulmonary pathology born with low birth weight were involved in the survey. All examined newborns underwent clinical, instrumental, general clinical laboratory examinations. Determination of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-TI), markers of apoptosis (Cytochrom-C and Annexin-V) was performed by standard enzyme-linked immunosorbent assay using diagnostic test systems manufactured by Gene Tex MMPs. The study found that in both classical and new forms of bronchopulmonary dysplasia, levels of apoptosis markers (Cytochrom-C and Annexin-V) increase depending on the severity of the pathological process and are unidirectional. Against the background of lower levels of metalloproteinase (MMP), there may be increases in concentrations of MMP-2, MMP-9 and MMP-9, leading to a violation of the isomer content of components of extracellular matrix, accumulation of collagen and other proteins, development in the lungs of fibrous tissue. Thus, based on the results, it can be assumed that the imbalance between markers of apoptosis, metalloproteinases and their inhibitors in infants born with low body weight is an important mechanism in the development of BPD.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, metalloproteinases, markers of apoptosis, children born with low body weight

Несмотря на усовершенствование методов лечения с целью повышения выживаемости недоношенных детей, частота респираторных нарушений у них остаётся высокой. Острая дыхательная недостаточность у недоношенных детей, осложненная воспалительным процессом, при условии наличия неблагоприятных факторов риска, в дальнейшем переходит в хроническую стадию с развитием бронхолегочной дисплазии. Поэтому бронхолегочная дисплазия, являясь полиэтиологическим хроническим заболеванием легких, которое

формируется с периода новорожденности и является частой причиной летальности и заболеваемости у недоношенных детей, имеющих морфофункциональную незрелость легких [1–3]. Установлено, что при БЛД в легочной ткани, развивающийся заместительный фиброз в результате протеолиза, а также локальные эмфизематозные изменения обуславливают клиническое течение заболевания.

В последнее время большое значение имеет изучение состояния внеклеточного матрикса, который разрушается под дей-

ствием протеолитической активности ферментов. Ключевыми эффекторами тканевого ремоделирования являются матриксные металлопротеиназы (ММП) [4–6]. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса, приводить к денатурации фибриального коллагена и развитию фиброза [7, 8].

В настоящее время уделяется большее внимание изучению редукции алвеоризации, наблюдающихся в протеолизе и легочной паренхиме при повреждении экстрацеллюлярного матрикса в патогенезе БЛД [9, 10]. Установлено, что во время БЛД происходит деградация компонентов экстрацеллюлярного матрикса, которые обладают протеолитической активностью при фибролизации легочной ткани и в этом процессе главную роль играют ММП и его тканевые ингибиторы, а также апоптоз [10, 11].

При БЛД особый интерес вызывает изучение процесса апоптоза и его параметров. Общеизвестно, что митохондриальный путь апоптоза характеризует трансмембранный потенциал, мембранозный путь – изменения плазматической мембраны. Происходящие в митохондриях метаболические изменения и структурные нарушения ассоциируются проапоптотными факторами, в том числе и релизингом цитохрома-С. Цитохром-С, являясь основным ферментом дыхательного звена митохондрий, представляет собой важнейший белок при реализации апоптоза митохондриальных путей. Аннексин-V (маркер мембранного пути апоптоза), соединяясь с фосфотидилсеринем, способствует нарушению асимметрии внутренних и внешних слоев плазматической мембраны. В клетке происходит распознавание апоптотной клетки благодаря сродству к фосфотидилсерину [12–14].

Несмотря на то что, изучение БЛД у детей проводят на протяжении многих лет, информация о механизмах развития и формирования БЛД, вариантах и результатах течения у детей, рожденных с низкой массой тела, неточная. Также следует отметить, что в этой группе детей сроки и механизм развития легочного фиброза недостаточно освещены и поэтому исследования, проводимые в этом направлении, требуют дальнейшего изучения [15].

В работе была изучена роль матричных металлопротеиназ и маркеров апоптоза в патогенезе бронхолегочной дисплазии у детей, рожденных с низкой массой тела, находящихся на ИВЛ в неонатальный период с риском баротравмы, волюмотравмы, ателектотравмы легочной ткани.

Цель исследования: изучить роль матричных металлопротеиназ и факторов апоптоза в развитии бронхолегочной дисплазии у детей, рожденных с низкой массой тела.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в Научно-исследовательском институте педиатрии имени К.Я. Фараджевой. К обследованию привлечены 32 ребенка грудного возраста, с бронхолегочной патологией, рожденные с низкой массой тела при рождении. Дети неонатального, грудного возраста с клиническими диагнозами РДСН (респираторный дистресс-синдром), пневмония, транзиторное тахипноэ новорожденных, БЛД находились на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, патологии недоношенных новорожденных и пульмонологии. В ходе исследования дети были разделены на две группы. В первую группу вошли 24 ребенка с классической формой БЛД (получавшие сурфактант). Во вторую группу вошли 8 детей с БЛД в новой форме, рожденные с гестационным возрастом менее 32 недель. Все дети за исключением четырех в первой группе были недоношенными. В группу сравнения были включены 20 условно-здоровых детей с соответствующим гестационным возрастом и массой тела.

В ходе работы всем новорожденным проведены клинические, инструментальные, общеклинические лабораторные обследования. Определение матричных металлопротеиназ (коллагеназа, ММП-1, ММП-2, ММП-9, ММПТИ), маркеров апоптоза (цитохром-С и аннексин-V) выполнялось стандартным методом твердофазового («сэндвич»-вариант) иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностических тест-систем производства «GeneTexMMPs» на анализаторе ElisysUnoHuman (Германия).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью статистической программы 6.0. Параметрические показатели оценивались при помощи теста Стьюдента, непараметрические – методом Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно анамнестическим, клиническим, рентгенологическим признакам степень тяжести БЛД у обследованных детей была распределена следующим образом: у 62,5 % детей – тяжелая степень, у 37,5 % – среднетяжелая степень. У детей с тяжелой степенью БЛД в анамнезе получали СРАР и 30 % кислород или ис-

кусственную вентиляцию легких (ИВЛ), а в клинике имели ярко выраженные симптомы бронхиальной обструкции. На рентгенологической картине отмечалось повышение воздушности в легких и наблюдение сетчатой структуры.

Все новорожденные имели сочетанную патологию: гипоксически-ишемическая энцефалопатия 21 (65,6%), внутрижелудочковые кровоизлияния 10 (31,2%), перивентрикулярная лейкомаляция 4 (12,5%), гидроцефалия 3 (9,4%), апноэ 12 (37,5%), легочная гипертензия, открытый артериальный проток 11 (34,3%), трахеобронхомаляция 4 (12,5%), гипотрофия 10 (31,2%), гипертензия легких 9 (28,1%), анемия 12 (37,5%), трахеобронхомаляция 7 (21,8%), врожденные пороки развития легких и гидроцефалия 5 (15,6%).

У детей с БЛД частые приступы апноэ и цианоза, возникающие вследствие обструкции и коллапса дыхательных путей, отмечались у детей с длительной интубацией и инфекцией. Острое течение заболевания клинически проявлялось совместно с выраженными тяжелыми бронхолитическими симптомами. Специфичный для БЛД «мозаичный» перкуторный шум выражался в легких в виде фиброза, ателектаза и других изменений.

Было установлено, что первый месяц клинического течения БЛД был волнообразным и зависел от интенсивности морфологических нарушений. У 75% больных наблюдалась нормализация после 6–12 месяцев, у 25% пациентов изменения продолжались. В первый год жизни ребенка по сравнению со вторым чаще встречались следующие состояния: стабильное тахипноэ, периодический стридор, повторная пневмония. Тяжелая форма БЛД характеризовалась хронической дыхательной недостаточностью (одышка, цианоз), они были близки бронхообструктивному синдрому с персистентным респираторным синдромом. Обострение заболевания наблюдалось в форме бронхита, бронхолита, а также пневмонии.

Анализ частоты встречаемости респираторных проявлений БЛД показал, что если не было обострения, то одышка встречалась в 62,5% в первой группе и в 25,0% во второй группе. Обострение БЛД (эпизод бронхообструктивного синдрома) 75,0% в первой группе, 12,5% во второй группе. Хрипы, не относящиеся к обострению 25,0% в первой группе. Госпитализация детей, связанная с обострением отмечалась в 37,5% – в первой группе, 12,5% – во второй группе. Пневмония наблюдалась у 25,0% в первой группе. Хрипы, не связанные с обострени-

ем, и пневмония не наблюдались у детей во второй группе.

Клинические наблюдения показали, что с увеличением возраста ребенка признаки заболевания уменьшаются, это связано с постнатальным развитием легких и с ярко выраженным проявлением признаков современного клинически гетерогенного течения БЛД.

Таким образом, у грудных детей признаки БЛД характеризуются максимальной выраженностью клинических проявлений и признаками обострения заболевания.

У всех обследованных детей были изучены количество металлопротеиназы и их тканевых ингибиторов, уровень параметров апоптоза. Как видно из таблицы, уровень цитохрома-С превосходит в первой группе в 3,2 раза, во второй группе в 2,4 раза показатели контрольной группы. У обследованных новорожденных уровень аннексина-V был выше в среднем в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). Установлено, что при классической, так и при новой форме БЛД уровни апоптозных маркеров (цитохром-С и аннексин В) изменяются в зависимости от тяжести патологического процесса и носят однонаправленный характер. Выявленные изменения, происходящие на уровне биологических маркеров, указывают на общий характер биохимических ауторегуляционных механизмов в программной смерти клетки. При БЛД повышение концентрации маркеров апоптоза подразумевает процесс модификации мертвых клеток, ускорение фагоцитоза, поэтому эти параметры можно рассматривать как фактор по выявлению степени апоптоза.

Результаты исследования показали, что на начальном этапе развития БЛД происходят значительные изменения в балансовой системе металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов. У детей второй группы было выявлено низкое значение концентраций металлопротеиназы (ММП-1, ММП-9) по сравнению с детьми первой группы ($p < 0,01$). Это свидетельствует о снижении протеолитического процесса, несмотря на сурфактантную защиту легочной паренхимы у этих детей.

По-видимому, на фоне низких концентраций ММП-1 повышение уровня концентраций ММП-2, ММП-9 и ММПТИ, приводящее к нарушению изомерного содержания компонентов внеклеточного матрикса, аккумуляции коллагена и других белков, способствует развитию в легких фиброзной ткани. Структурные изменения во внеклеточном матриксе становятся причиной патологической ремоделизации в легких, что обуславливает функциональную недостаточность.

Уровень факторов апоптоза, ММП и их ингибиторов у детей, рожденных с низкой массой тела ($M \pm m$)

Показатели нг/мл	Группы			χ^2 ; p
	Контрольная группа n = 20	I группа n = 24	2 группа n = 8	
Цитохром-С	0,24 ± 0,03	0,78 ± 0,05*	0,58 ± 0,04*, ^^	$\chi^2 = 4,511$ p < 0,05 $\chi^2 = 10,29$ p < 0,01
Аннексин-V	4,10 ± 0,21	9,21 ± 0,46	8,62 ± 0,39*, ^^	$\chi^2 = 14,32$ p < 0,01 $\chi^2 = 5,314$ p ₁ < 0,05
ММП-1	3,16 ± 0,25	7,92 ± 0,51*	6,81 ± 0,26*, ^^	$\chi^2 = 14,32$ p < 0,01 $\chi^2 = 5,314$ p ₁ < 0,05
ММП-2	215,4 ± 10,9	452,1 ± 3,5*	416,1 ± 12,0*	$\chi^2 = 4,61$ p < 0,05
ММП-9	280,6 ± 20,6	702,9 ± 60,5*	330,5 ± 22,5^^	$\chi^2 = 6,412$ p ₁ < 0,05
ММПТИ	202,4 ± 18,0	366,4 ± 32,8*	242,0 ± 23,1*	$\chi^2 = 3,54$ p < 0,05

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$. M – среднее значение, m – стандартная ошибка, (min – max) – размах вариации: минимальные и максимальные значения ряда. Статистическая достоверность разницы:

- 1) показателями контрольной группы: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001;
2) с показателями I и II группы: ^ – p₁ < 0,05; ^^ – p₁ < 0,01; ^^ ^ – p₁ < 0,001.

Таким образом, развитие БЛД возникает в результате ремоделизации в легочной ткани, а также сложного биохимического и структурного дисбаланса.

Согласно Р. Мартосу и авторам [8] повышение концентрации ММП-2 и ММП-9 создает условие для нарушения структуры внеклеточного матрикса и образованию фиброза. Полученные данные позволяют нам сделать вывод, что любое изменение концентрации матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов становится причиной нарушения стабильного баланса коллагенового синтеза и расщепления, что выражается в начальной стадии фиброзного процесса в межклеточном матриксе. Следует отметить, что фиброзный процесс – многофакторный и необратимый сложный процесс, поэтому требует всестороннего изучения.

Таким образом, основываясь на полученных результатах, можно предположить, что нарушение баланса между маркерами апоптоза, ММП и их ингибиторами у детей грудного возраста, рожденных с низкой массой тела, является важным механизмом при развитии БЛД. Поэтому для этого контингента больных целесообразно определять уровни легочных ингибиторов, мар-

керов апоптоза и структурных изменений легочной ткани.

Выводы

1. Как при классической, так и при новой форме БЛД уровни маркеров апоптоза (цитохром-С и аннексин-V) увеличиваются в зависимости от тяжести патологического процесса и носят однонаправленный характер. Дисбаланс биологических маркеров указывает на изменения биохимических ауторегуляционных механизмов.

2. На фоне понижения ММП возможно повышение концентраций ММП-2, ММП-9 и ММПТИ, приводящие к нарушению изомерного содержания компонентов экстрацеллюлярного матрикса, аккумуляции коллагена и других белков, развитию в легких фиброзной ткани.

Список литературы

1. Овсянников Д.Ю., Комлева Н.А., Оболадзе Т.Б., Маркарян О.В., Кузьменко Л.Г. Современные алгоритмы диагностики бронхолегочной дискинезии // Вопросы диагностики в педиатрии. 2011. Т. 3. № 1. С. 12–20.
2. Современные подходы к профилактике, диагностике и лечению бронхолегочной дисплазии. Руководство для практикующих врачей / Под ред. А.А. Баранова, Л.С. Назаровой-Барановой, И.В. Давыдовой. М.: Изд. «ПедиатрЪ», 2013. 33 с.

3. Mosca F., Colnaghi M., Fumagalli M. BPD: old and new problems. *J. Matern Fetal Neonatal Med.* 2011. № 24 (1). P. 80–82.
4. Rojas-Reyes M.X., Morley C.J., Soll R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 14(3). CD000510.
5. John S. Bradley, Carrie L. Byington, Samir S. Shah et al. The management of community acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and Infectious Diseases Society of American. *Clin. Infect. Dis.* 2011. Oct 1. № 53 (7). P. 617–630. DOI: 10.1093/cid/cir625.
6. Мироманова Н.А. Изменения в системе «матриксные металлопротеазы – ингибитор матриксных металлопротеаз» при гриппе у детей // *Функциональные исследования.* 2014. № 10–2. С. 328–332.
7. Chen Q., Jin M., Yang F., Zhu J., Xiao Q., Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of Inflammation.* 2013. 14 p. DOI: 10.1155/2013/928315.
8. Аксененко М.Б., Рукша Т.Г. Оценка взаимосвязи ингибирования матриксной металлопротеазы-9 и содержания коллагеновых волокон в различных органах // *Сибирский медицинский журнал.* 2013. Т. 2. С. 6–8.
9. Choae Lee, Jaewoo An, Ji Hee Kim et al. Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth may be associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Korean Journal of Pediatrics.* 2015. № 58 (11). P. 415–420. DOI: 10.3345/kjp.2015.58.11.415.
10. Dufour A. Degradomics of matrix metalloproteinases in inflammatory diseases. *Front Biosci (Schol Ed).* 2015. № 7. P. 150–167.
11. Marchesi C., Dentali F., Nicolini E., Maresca A.M., Tayebjee M.H., Franz M., et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J. Hypertens.* 2012. № 30. P. 3–16.
12. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // *Гены&Клетки.* 2018. Т. XIII. № 1. С. 6–14. DOI: 10.23868/201805001.
13. Friedman J.R., Nunnar J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014. Vol. 505. P. 335–431.
14. Лютфалиева Г.Т. Участие аутоантител в процессах апоптотической регуляции иммунокомпетентных клеток // *Экология человека.* 2010. № 5. С. 24–29.
15. Lidys Rivera, Roopa Siddaiah, Christiana Oji-Mmuo, Gabriela R. Silveyra, Patricia Silveyra. Biomarkers for Bronchopulmonary Dysplasia in the Preterm Infant. *Front Pediatr.* 2016 Mar 31. № 4. P. 33. DOI: 10.3389/fped.2016.00033.