

Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей

Научный центр здоровья детей РАМН: 119991, Москва, Ломоносовский пр-т, 2/62

I.V.Davydova, G.V.Yatsyk, T.V.Bershova, M.A.Basargina, M.I.Bakanov

Matrix metalloproteinases as biomarkers of bronchopulmonary dysplasia in children

Summary

The article introduces current approaches to lung tissue fibrosis under development of bronchopulmonary dysplasia with regards to matrix metalloproteinases and their inhibitors in prematurely born children treated or not treated with surfactant in early neonatal period.

Key words: mechanical ventilation, bronchopulmonary dysplasia, matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases.

Резюме

В статье отражены современные взгляды на процессы фиброзирование легочной ткани при формировании бронхолегочной дисплазии с участием матриксных металлопротеиназ и их ингибитора у недоношенных детей, получивших и не получивших терапию сурфактантом в раннем неонатальном периоде.

Ключевые слова: искусственная вентиляция легких, бронхолегочная дисплазия, матриксные металлопротеиназы, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ.

Согласно современным представлениям о патогенезе бронхолегочной дисплазии (БЛД), это заболевание рассматривается как совокупность патологических изменений, среди которых немаловажную роль играет развитие фиброза и / или нарушение репликации структуры альвеол на фоне гипоксии и воспаления [1, 2]. В нарушении метаболизма легочного коллагена большое значение имеет изменение содержания матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИММП) [3]. Особенности как функционального, так и биохимического состояния легочных структур у детей, получавших искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) в неонатальном периоде, зависят от биомеханических свойств легких – сопротивления и растяжимости легочной ткани, определяемых степенью зрелости процессов, ответственных за выработку сурфактанта [4]. С этой точки зрения, комплексное динамическое определение уровня ММП и ТИММП у детей с БЛД может использоваться для оценки выраженности разрушения коллагена и компонентов внеклеточного матрикса (ВМ) у больных, получавших пролонгированную ИВЛ как на фоне заместительной терапии сурфактантом, так и без нее, и позволит судить о принципиально новом понимании роли ВМ в развитии фиброзирование легочной ткани.

Цель работы – исследовать содержание сывороточных металлопротеиназ (ММП) и их тканевого ингибитора (ТИММП) в сыворотке крови у детей с бронхолегочной дисплазией в зависимости от терапии сурфактантом и оценить роль этих ферментов в развитии фиброза легочной ткани.

Материалы и методы

Основную группу составили 116 недоношенных детей (73 мальчика, 43 девочки), получавших с момента рождения пролонгированную ИВЛ (в среднем $25,49 \pm 1,72$ сут.), у которых сформировалась БЛД; из них 31 ребенок был обследован в катамнезе до 2-летнего возраста (40 образцов сыворотки крови). Дети основной группы имели гестационный возраст от 25 до 36 нед. (в среднем $29,58 \pm 0,25$ нед.), массу тела при рождении – от 620 до 2 500 г (в среднем $1 350,36 \pm 41,11$ г). В ходе исследования в основной группе был изучен 151 образец сыворотки крови. Параметры вентиляции в работе не учитывались.

В группу сравнения вошли 39 недоношенных новорожденных (15 мальчиков, 24 девочки) с сопоставимыми с детьми основной группы гестационным возрастом и массой тела при рождении, но не получавших ИВЛ в неонатальном периоде и не имевших бронхолегочной дисплазии. Объем исследований в группе сравнения составил 39 образцов сыворотки крови.

Взятие крови для исследования производилось в строго ограниченном количестве не ранее 29-го дня жизни ребенка после стабилизации состояния, при этом учитывали массу тела, возраст и тяжесть состояния детей изучаемой группы. У всех обследуемых имелась сопутствующая патология – гипоксически-ишемическое поражение центральной нервной системы (ЦНС), в ряде случаев – гипоксически-травматическое поражение ЦНС, у части больных были диагностированы анемия недоношенных (85 %)

Динамика содержания ММП и их ТИММП у детей с БЛД, не получавших терапию сурфактантом, в зависимости от возраста

Биохимический показатель	Возраст обследованных				
	29 дней – 2 мес. 29 дней	3 мес. – 5 мес. 29 дней	6 мес. – 11 мес. 29 дней	12 мес. – 24 мес.	Группа сравнения
ММП-1, у. е.	7,39 ± 0,86 (n = 42; p ₂ < 0,01)	12,13 ± 1,40 (n = 26; p ₁ < 0,02)	7,71 ± 0,65 (n = 41; p ₂ < 0,01)	8,40 ± 0,94 (n = 39; p ₂ < 0,05)	8,16 ± 1,00 (n = 26)
ММП-2, у. е.	438,97 ± 18,75 (n = 20)	477,66 ± 18,88 (n = 10)	417,00 ± 31,27 (n = 8)	433,95 ± 23,80 (n = 14)	435,47 ± 22,74 (n = 12)
ММП-9, у. е.	971,04 ± 89,19 (n = 20; p ₁ < 0,01; 0,05 < p ₂ < 0,1)	217,09 ± 97,69 (n = 19; p ₁ < 0,001)	458,83 ± 34,28 (n = 18; p ₁ < 0,01; p ₂ < 0,001)	659,53 ± 46,79 (n = 28; p ₂ < 0,001)	674,40 ± 59,45 (n = 16)
ТИММП, у. е.	235,41 ± 54,54 (n = 14; p ₂ < 0,05)	445,57 ± 65,44 (n = 7; p ₁ < 0,05)	278,83 ± 32,40 (n = 12; p ₂ < 0,05)	199,83 ± 32,69 (n = 21; p ₂ < 0,001)	268,65 ± 60,07 (n = 15)

Примечание: p₁ – достоверность различия показателя в отношении группы сравнения; p₂ – достоверность различия показателя по сравнению с другими подгруппами.

и ретинопатия (15 %). Основная группа была разбита на 4 подгруппы больных с БЛД соответственно возрасту: от 29 дней до 2 мес. 29 дней, от 3 мес. до 5 мес. 29 дней, от 6 мес. до 11 мес. 29 дней и 1–2 лет. В каждой подгруппе были выделены дети, получавшие заместительную терапию препаратом сурфактанта (Куросурфом) в постнатальном периоде. Окончательный клинический диагноз устанавливался по результатам комплексной оценки клинических и лабораторных показателей в соответствии с клинико-анамнестическими и рентгенологическими критериями диагностики БЛД [1, 5, 6]. В комплексную терапию недоношенных на 2-м этапе выхаживания входили: кислородотерапия (> 21 % кислорода во вдыхаемой смеси через назальные канюли, кислородную палатку или в кювезе); антибиотикотерапия в соответствии с чувствительностью микрофлоры; ингаляции будесонида через небулайзер в дозе 250 мкг в сутки, дополнявшиеся ингаляциями ипратромиума бромид / фенотерола при выраженном бронхообструктивном синдроме; противовирусная и антиоксидантная терапия.

В сыворотке крови наблюдаемых больных исследовано содержание следующих металлопротеиназ и их ингибитора: ММП-1, ММП-2, ММП-9, ТИММП-2.

В работе использован метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием наборов реактивов *Biosource* (Бельгия). Подсчет результатов осуществляли с помощью микропланшетного ридера *Anthos 2020* (Австрия). Статистическая обработка результатов выполнялась с помощью программы *Statistica 6.0*.

Результаты

Как свидетельствуют данные проведенных исследований, у детей с БЛД обнаружена зависимость содержания изученных ферментов и их ингибитора в сыворотке крови от возраста пациента и наличия заместительной терапии сурфактантом. Так, у больных с БЛД преимущественно среднетяжелого и тяжелого течения, не получавших сурфактант в раннем постнатальном периоде, на 1–3 мес. жизни клинически проявлялись признаки дыхательной недостаточности на фоне бронхообструктивного синдрома.

Все дети получали дополнительную оксигенацию (> 21 % кислорода во вдыхаемой смеси) через назальные канюли, кислородную палатку или в кювезе до 30–92-го дней жизни. При оценке рентгенограмм грудной клетки, выполненных в этом периоде, чаще всего выявлялись вздутие грудной клетки, неравномерность пневматизации, усиление интерстициального компонента по сетчатому типу, свидетельствующие о формировании легочного фиброза. В данной подгруппе больных зарегистрировано достоверно более высокое содержание ММП-9 (p < 0,01) относительно показателей группы сравнения на фоне нормальной концентрации ММП-2 и несколько сниженного уровня ММП-1, сопровождавшихся снижением содержания ТИММП-2 (табл. 1).

В ходе динамического анализа была выявлена максимальная активность ММП у детей 3–6 мес. на фоне уменьшения частоты и тяжести эпизодов бронхиальной обструкции и отказа от дополнительной оксигенации у некоторых больных. Рентгенологические изменения в этом возрасте в виде участков эмфиземы, чередующихся с локальным пневмофиброзом, свидетельствуют о нарастании фиброзировании легочной ткани [7]. У пациентов данного возраста выявлены пиковые значения концентрации ММП-1 и ММП-9 (12,13 ± 1,40 нг/мл и 1 217,09 ± 97,69 нг/мл), а также высокий уровень ТИММП (445,57 ± 65,44 нг/мл), достоверно превышающие показатели группы сравнения (табл. 1). Важным представляется не только определение изолированных концентраций ММП, но и их соотношения с уровнем ТИММП. Усиление продукции ММП-1 и ТИММП-2 у детей этой группы указывает не только на индукцию коллагенолитических процессов за счет высокой активности ММП-1, но и на дальнейшее развитие легочного фиброза в результате активации ТИММП-2.

У детей старше 0,5 года в хронической стадии заболевания, отличающейся волнообразным течением с обострениями по обструктивному типу на фоне острой респираторной вирусной инфекции, установлено достоверное снижение уровня ММП-1; ММП-2 и ММП-9 по сравнению с детьми 3–6 мес. (p < 0,01; 0,001 и 0,001 соответственно). При этом уровень ТИММП достоверно не отличался от такового в группе сравнения.

Динамика содержания матриксных металлопротеиназ у детей с БЛД, получавших терапию сурфактантом, в зависимости от возраста

Биохимический показатель	Возраст обследованных			
	29 дней – 2 мес. 29 дней	3 мес. – 5 мес. 29 дней	6 мес. – 11 мес. 29 дней	12–24 мес.
ММП-1, у. е.	4,28 ± 0,77 (n = 11; p < 0,01)	5,69 ± 1,45 (n = 6; p < 0,001)	7,48 ± 0,79 (n = 7)	4,95 ± 1,10 (n = 11; p < 0,02)
ММП-2, у. е.	374,81 ± 14,83 (n = 6; p < 0,02)	465,18 ± 45,68 (n = 5; p < 0,001)	405,10 ± 40,47 (n = 8)	297,97 ± 19,34 (n = 4; p < 0,001)
ММП-9, у. е.	280,04 ± 12,47 (n = 9; p < 0,001)	584,60 ± 56,39 (n = 5; p < 0,001)	152,2 ± 19,2 (n = 8; p < 0,02)	541,43 ± 52,35 (n = 3; 0,1 > p > 0,05)

Примечание: анализ содержания ТИММП у детей с БЛД, получавших терапию сурфактантом, не проводился в связи с ограничением возможности взятия крови у глубоко недоношенных детей с низкой массой тела при рождении; p – показатель достоверности различий концентраций ММП у больных, получавших и не получавших терапию сурфактантом.

При катamnестическом наблюдении за детьми 2-го года жизни изменения в содержании изученных ферментов не выявлены, за исключением снижения концентрации ТИММП по сравнению с пациентами без БЛД, что соответствует регрессу клинико-рентгенологических проявлений, отражающих относительное уменьшение фиброзированных участков легких в виде линейных тяжей на фоне увеличения объема здоровой легочной ткани по мере роста ребенка. Динамическое определение уровней ММП у детей, получавших ИВЛ, свидетельствует об увеличении продукции ММП-9 по сравнению с ММП-1 и ММП-2 в первые полгода жизни и указывает на то, что ММП-9 катализирует начальный этап деградации коллагена легочной ткани. Являясь триггером активации ММП-1 и ММП-2, ММП-9 поддерживает этот процесс на поздних стадиях течения БЛД у детей, находящихся на ИВЛ. Это позволяет сделать вывод, что у детей с БЛД показатель содержания ММП-9 является чувствительным маркером дисрегуляции ремоделирования легочного внеклеточного матрикса.

Во всех возрастных группах у детей с БЛД, получавших сурфактант в первые дни проведения ИВЛ, установлено достоверное снижение содержания ММП-9 по сравнению с пациентами основной группы, которых не лечили сурфактантом, наиболее выраженное у детей 3–6 мес. ($p < 0,001$). Концентрация ММП-1 и ММП-2 достоверно снижалась у детей 1-го полугодия жизни и у детей старше 1 года, лечившихся сурфактантом, по сравнению с пациентами, не получавшими такую терапию (табл. 2).

Полученные данные могут свидетельствовать о выраженной защитной функции экзогенного сурфактанта естественного происхождения, применяемого эндотрахеально у недоношенных новорожденных на фоне ИВЛ. Уменьшение сывороточного уровня ММП у таких детей можно рассматривать как фактор, снижающий риск развития фиброза легочной ткани.

Обсуждение

Тяжесть течения и исход БЛД в ее классическом варианте у недоношенных детей после пролонгированной ИВЛ во многом определяются сроками формирования и степенью выраженности фиброза легочной ткани. Определение таких показателей

деградации внеклеточного матрикса, как ММП (ММП-1, -2 и -9), позволило проследить активность коллагенолитического процесса с последующим фиброзированием легочной ткани у детей с БЛД с 1-го мес. жизни до 2 лет в катamnезе на всех этапах течения заболевания [8, 9].

Факторами, которые вносят свой вклад в повреждение незрелой легочной ткани на фоне недостаточной выработки сурфактанта, являются высокая концентрация кислорода и высокое положительное давление при ИВЛ, активирующие продукцию свободных радикалов и перекисное окисление липидов с образованием активных форм кислорода и цитокинов. Под воздействием последних усиливается экспрессия ММП, участвующих в разрушении внеклеточного матрикса. Не исключено, что обнаруженная высокая протеолитическая активность интерстициальной коллагеназы (ММП-1) и желатиназы (ММП-2 и -9) у детей с БЛД в возрасте 3–6 мес. является следствием связанных с ИВЛ воспалительных процессов (трахеобронхита, пневмонии) и вызвана усиленной продукцией фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкинов (IL-1, -6 и -8) [4].

Высокая концентрация ММП-1 у этих детей, обладая сильным литическим потенциалом в отношении фибриллярного коллагена и имея сродство к коллагену III типа, способствует протеолиту соединительной ткани легких. В результате деградации подвергается преимущественно коллаген III типа. Деградация этого коллагена ведет к снижению жесткости внутриклеточного каркаса, что может быть причиной развития эмфиземы в исходе БЛД [8, 9]. Денатурированный коллаген становится восприимчивым к дальнейшему расщеплению желатиназами ММП-2 и -9. При этом для реализации своего деструктивного действия желатиназы могут быть активированы ММП-1 и другими протеиназами. Возможно, усиление продукции ММП-1, -2 и -9 в сыворотке крови больных с БЛД в 1-м полугодии жизни отражает их взаимоактивацию, что может приводить к перманентному процессу фиброирования и нарастанию патологических изменений в легких. Кроме того, увеличение продукции ММП-2 может явиться причиной деструкции бронхоальвеолярной ткани, в частности эластических растяжек респираторных бронхиол, с экспираторным коллапсом, что способствует развитию обструкции, а также формированию интраальвеолярного фиброза. У новорожденных

детей с БЛД и т. н. "ИВЛ-ассоциированной пневмонией" бронхообструктивный синдром определяется наличием распространенного трахеобронхита, появлением сегментарных и долевых бронхов и участков эмфизематозного вздутия [10].

Важным представляется не только изолированное содержание ММП, но и их соотношение с уровнем ТИММП. Преобладание концентрации ТИММП может свидетельствовать о снижении деградации коллагеновой сети, развитии и неуклонном росте легочного фиброза, а также указывает на усиление распада капиллярного русла межальвеолярных перегородок, определяя сосудистый путь формирования эмфиземы. ММП также вовлечены в деградацию альвеолярных стенок при эмфиземе. Продуцируемые нейтрофилами (ММП-9) и макрофагами (ММП-1), указанные ферменты способны нарушать структуру мембран альвеолоцитов [4, 11]. Это подтверждается патогистологическими исследованиями, демонстрирующими у больных с БЛД бронхоэктазии, мозаичный пневмосклероз, ателектазы и фиброателектазы [12].

Эффективность заместительной терапии сурфактантом оценивали не только по клиническому состоянию обследованных детей, но и по изменению показателей фиброобразования. Терапия сурфактантом в раннем постнатальном периоде ослабляет проявления респираторного дистресс-синдрома и сокращает длительность ИВЛ, снижает потребность недоношенного ребенка в высокой концентрации кислорода во вдыхаемой смеси. При этом экзогенно введенный легочный сурфактант, уменьшая степень гипоксии благодаря улучшению вентиляционно-перфузионных соотношений, стимулирует синтез эндогенного сурфактанта. Снижение активности ММП-1, -2 и -9 может быть связано с участием эндогенного сурфактанта в противоинфекционной защите органов дыхания и снижением количества цитокинов. Уменьшение коллагенолитической активности у этих пациентов обеспечивает сохранность структуры коллагенового домена белка SP-A эндогенного сурфактанта. Это поддерживает обновление поверхностно-активных веществ (ПАВ), нормализацию поверхностного натяжения альвеол в акте дыхания и уменьшение распространенности участков ателектазов. Обновление ПАВ ускоряет процесс эндоцитоза сурфактанта, важная роль в котором принадлежит апопротеину SP-A. При этом постоянная рециклизация молекул ПАВ обеспечивает воспроизводство его поверхностно-активных свойств [4]. Это ведет к снижению поверхностного натяжения в конце выдоха в дистальных отделах легких и улучшению газообмена. Кроме того, эндогенный сурфактант, обеспечивая гомеостатическое регулирование величины эластичности легочной ткани, модулирует состояние водного баланса легочной ткани, препятствует развитию отека альвеол. Способность сурфактанта снижать адгезивность бронхиальной слизи и повышать активность реснитчатого эпителия бронхов улучшает мукоциллиарный клиренс в легких.

Как показали результаты исследований, течение патологического процесса при БЛД у детей 1-го полугодия жизни характеризуется продолжающимся повреждением легочной ткани, обусловленным коллагенолитическим распадом внеклеточного матрикса, а также развитием заместительного фиброза, что может стать причиной развития обструктивного синдрома и эмфиземы.

Заключение

1. У недоношенных детей с БЛД отмечено усиление экспрессии ММП-1, -2, -9 и ТИММП, наиболее выраженное в возрасте 3–6 мес., что позволяет считать эту стадию заболевания периодом наиболее интенсивного фиброобразования легочной ткани.
2. Высокий уровень ММП-9 у детей с БЛД в 1-м полугодии жизни свидетельствует о перманентном коллагенолитическом процессе и может служить диагностическим критерием легочной деструкции.
3. Усиление продукции ММП-1 у детей 3–6 мес. указывает на индукцию коллагенолитических процессов, активация ТИММП-2 на этом фоне ведет к развитию легочного фиброза.
4. Регресс клинических проявлений БЛД по мере роста ребенка сопровождался снижением концентрации изученных ММП и ТИММП, начиная со 2-го полугодия жизни.
5. Терапевтическая роль сурфактанта обусловлена ослаблением воспалительного процесса и снижением влияния цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6) на экспрессию металлопротеиназ. Являясь заместительной терапией, сурфактант изменяет биомолекулярные свойства легочной ткани, что улучшает ее эластичность.

Литература

1. Овсянников Д.Ю., Давыдова И.В. Бронхолегочная дисплазия: вопросы терминологии и классификации. Рос. педиатр. журн. 2008; 2: 18–23.
2. Greenough A., Kotecha S., Vrijlandt E. Bronchopulmonary dysplasia: current models and concepts. Eur. Respir. Monogr. 2006; 37: 217–233.
3. Henry M.T., McMahon K., Mackarel A.J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in sarcoidosis and IPF. Eur. Respir. J. 2002; 20: 1220–1227.
4. Чучалин А.Г. (ред.). Респираторная медицина. М.: Изд. группа "ГЭОТАР-Медиа"; 2007; т. 1: 156–160, 657–658.
5. Jobe A.H., Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 163: 1723–1729.
6. Edwards D.K. Radiographic aspects of bronchopulmonary dysplasia. J. Pediatr. 1979; 95: 823–829.
7. Цыгина Е.Н., Давыдова И.В., Кустова О.В. и др. Радиологические исследования при бронхолегочной дисплазии у детей. Мед. визуализация 2008; 2: 116–121.
8. Богданова А.В., Старевская С.В., Попов С.Д. Хроническая обструктивная болезнь легких у детей. В кн.: Кокосов А.Н. (ред.). Хроническая обструктивная патология легких у взрослых и детей. СПб.: СпецЛит; 2004. 263–285.

9. Wong P.M., Less A.N., Louw J. Emphysema in young adult survivors of moderate – to – severe bronchopulmonary dysplasia. Eur. Respir. J. 2008; 32: 321–328.
10. Балашова Е.Д. Эффективность ингаляционных β_2 -агонистов и глюкокортикоидов при бронхообструктивном синдроме у новорожденных детей с "ИВЛ-ассоциированной" пневмонией и бронхолегочной дисплазией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2008.
11. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания. Пульмонология 2006; 5: 74–79.
12. Самохин П.А., Цветкова Ю.В. Бронхолегочная дисплазия новорожденного: морфогенез, морфологическая диагностика. Арх. пат. 2008; 70 (4): 37–42.

Информация об авторах

Давыдова Ирина Владимировна – к. м. н., ведущий научный сотрудник отделения пульмонологии и аллергологии НЦЗД РАМН; тел.: (499) 134-93-31; e-mail: diva171258@yandex.ru

Яцык Галина Викторовна – д. м. н., проф., заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отделения для недоношенных детей НЦЗД РАМН; тел.: (499) 134-15-19; e-mail: macadamia@yandex.ru

Бершова Татьяна Владимировна – д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической биохимии НЦЗД РАМН; тел.: (499) 134-03-41; e-mail: bershova@nczd.ru

Басаргина Милана Александровна – аспирант отделения для недоношенных детей НЦЗД РАМН; тел.: (499) 134-15-19; e-mail: milanablu@mail.ru

Баканов Михаил Иванович – д. м. н., проф., руководитель лаборатории клинической биохимии; тел.: (499) 134-03-41; e-mail: bakanov@nczd.ru

Поступила 08.04.09

© Коллектив авторов, 2009

УДК 616.233/24-007.17-053.2-092