УДК 616.092:616.921.5:616-06:616.24-002

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ «МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗЫ – ИНГИБИТОР МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ» ПРИ ГРИППЕ У ДЕТЕЙ

Мироманова Н.А., Мироманов А.М.

ГОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Чита, e-mail: detinf-chita@mail.ru

Проведено исследование содержания в сыворотке крови содержания металлопротеаз (MMP) 2, 9 и их специфического тканевого ингибитора (MMPTI) у детей при неосложненном течении гриппа A H1N1 pdm09 и при развитии осложнений в виде вирусно-бактериальной пневмонии. Выявлено, что содержание MMP-2, MMP-9 повышается только при среднетяжелых и тяжелых формах неосложненного гриппа, а также при развитии вирусно-бактериальной пневмонии с нарушением физиологического равновесия MMP/MMPTI в результате снижения выработки MMPTI. Максимальное повышение MMP-2 и MMP-9 зарегистрировано у детей с тяжелым течением пневмонии, ассоциированной с гриппом A H1N1 pdm09, повышаясь соответственно в 4,1 и 4,2 раза по сравнению с контролем. Таким образом, выявленная гиперпродукция металлопротеаз у детей при пневмонии, обусловленной вирусом гриппа H1N1pdm09, может расцениваться как фактор риска не только тяжелого течения пневмонического процесса, но и свидетельствовать о риске развития фиброза легочной ткани, что требует тщательного катамнестического наблюдения за данной категорией пациентов.

Ключевые слова: грипп, пневмония, металлопротеазы, дети

CHANGES IN THE SYSTEM «MATRIX METALLOPROTEASE – INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEASE» AT CHILDREN'S INFLUENZA

Miromanova N.A., Miromanov A.M.

Chita State Medical Academy, Chita, e-mail: detinf-chita@mail.ru

Research of the content in serum of blood of the content of metalproteases (MMP) 2, 9 and their specific fabric inhibitor (MMPTI) at children is conducted at the uncomplicated course of flu of A H1N1 pdm09 and at development of complications in the form of virus and bacterial pneumonia. It is revealed that the maintenance of MMP-2, MMP-9 raises only at medium-weight and heavy forms of uncomplicated flu, and as at development of virus and bacterial pneumonia with violation of physiological balance of MMP/MMPTI as a result of decrease in development of MMPTI. The maximum increase of MMR-2 and MMR-9 is registered at children with the heavy course of the pneumonia associated with flu of A H1N1 pdm09, raising respectively in 4,1 and 4,2 times in comparison with control. So, the revealed hyperproduction of metalproteases at children at the pneumonia caused by a virus of flu of H1N1pdm09, can be regarded as risk factor not only the heavy course of pneumonic process, but also to testify to risk of development of fibrosis of pulmonary fabric that demands careful catamnesistic supervision over this category of patients.

Keywords: influenza, pneumoniae, matrix metalloproteinase, children

Многочисленными исследованиями показано, что одним из ключевых патогенетических звеньев формирования тяжелых и осложненных форм гриппа, в том числе вызванного вирусом типа A H1N1pdm09 (причина последней крупной эпидемии в XXI веке), является гиперцитокинемия, часто коррелирующая с неблагоприятным исходом болезни [9, 11]. Интимные механизмы патогенеза гриппа A H1N1pdm09, унесшего более 18 тысяч человеческих жизней, до настоящего времени служат объектом пристального исследования. Проводимые ранее исследования Kido H. (2010) тяжелых форм гриппа A H5N1 (птичий грипп) также продемонстрировали роль гиперцитокинемии в формировании полиорганной недостаточности и отека, обусловленные активацией цикла трипсин/матриксная металлопротеаза-9 в клетках (особенно в эндотелиоцитах), приводя к разрушению матрикса вокруг микрососудов, увеличению сосудистой проницаемости с подавлением в клетках продукции аденозинтрифосфата, что вызывает «энергетический кризис клеток» [7].

Матриксные маталлопротеазы (MMP) – группа родственных по структуре цинк-зависимых эндопептидаз, участвующих в деградации базальной мембраны и внеклеточного матрикса. MMP – единственные протеолитические ферменты, способные денатурировать фибриллярные коллагены. В состав MMP входит 28 ферментов, которые делятся на пять подсемейств: коллагеназы (MMP-1, MMP-8, MMP-13), стромализины (MMP-3, MMP-10), матрилизины (MMP-7, MMP-26) и желатиназы (MMP-2, MMP-9). К соединениям, образуемым эндотелиальными клетками, относятся коллагеназы, стромализины и желатиназы, секретирующиеся в физиологических условиях в межклеточное пространство и разрушающие фибриллярные коллагены, фибронектин и другие белки внеклеточного матрик-

са [2]. Кроме того, ММР экспрессируются в мышечных клетках и фибробластах [3]. Установлено, что ММР-2, в отличие от ММР-9, экспрессируется в поврежденных артериях, благодаря чему является одним из маркеров воспаления [1]. Содержание ММР в физиологических условиях регулируется содержанием специфических тканевых ингибиторов матриксных металлопротеаз (ММРТІ), представляющих собой небольшие белки, вступающие во взаимодействие с ММР в соотношении 1:1. Но ММРТІ могут инактивироваться действием протеолитических ферментов – трипсина, хемотрипсина, эластазы нейтрофилов, благодаря чему значительно возрастает активность различных ММР [8]. Проведенные исследования показали, что при заболеваниях сердечно-сосудистой системы в сыворотке крови нарушается нормальное соотношение ММР и ММРТІ, приводящее к развитию фиброза [1, 2].

Однако изучение системы «матриксные металлопротеазы – ингибитор матриксных металлопротеаз» практически не коснулось гриппа А H1N1pdm09. Тем не менее единичные исследования *in vitro,* проведенные во время эпидемии гриппа А H1N1pdm09, показали увеличение экспрессии ММР-2 нейтрофилами и эндотелиоцитами легких у умерших пациентов с проявлениями острого респираторного дистресс-синдрома на фоне вирус-индуцированной пневмонии [4].

Цель исследования – изучить содержание матриксных металлопротеаз (ММР-2, ММР-9) и их специфических ингибиторов у детей с неосложненным гриппом и при его течение, осложненном пневмонией.

Материалы и методы исследования

В исследование включен 201 ребенок с гриппом А H1N1pdm09, рандомизированный в две группы: первую группу составили 114 детей с неосложненным гриппом. Для определения тяжести течения гриппа А H1N1pdm09 пользовались общепринятой классификацией гриппа [5]. Группу сравнения для этой группы составили 27 детей с сезонным гриппом А H3N2 в постэпидемический период. 87 детей с развившейся внебольничной вторичной вирусно-бактериальной пневмонией на фоне пандемического гриппа объединены во вторую группу. Диагноз внебольничной пневмонии устанавливался на основании достоверных критериев, предложенных А.Г. Чучалиным и соавт. [6]. В качестве критериев тяжести внебольничной пневмонии у детей использовали модифицированную шкалу тяжелых внебольничных пневмоний у взрослых (2007) [10]. Группой сравнения для второй клинической группы стали 50 детей с внебольничной пневмонией в постэпидемический по гриппу период. Дети с атипичной этиологией внебольничной пневмонии (микоплазменная, хламидийная) из данной группы исключались.

Диагноз гриппа А H1N1pdm09 устанавливался на основании эпидемиологического анамнеза, комплекса характерных клинических симптомов и верифицировался путем обнаружения РНК вируса в назофарингеальных мазках методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) в парных сыворотках с нарастанием тира антител. Сезонный грипп устанавливался на основании идентификации РНК вируса гриппа А H3N2 в назофарингеальных мазках.

Распределение исследуемых по группам, полу и возрасту представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение больных по группам, полу и возрасту

Группы обследуемых	*n*	Возраст, мес. (M ± m)	Пол (абс.ч./%)	
			Мальчики	Девочки
I клиническая группа	**114**		63 (72,4%)	51 (27,6%)
Грипп А H1N1pdm09 легкой степени тяжести	40	38,5 ± 8,7	27 (67,5%)	13 (32,5%)
Грипп А H1N1pdm09 средней степени тяжести	56	56,5 ± 8,7	29 (51,8%)	27 (48,2%)
Грипп А H1N1pdm09 тяжелой степени тяжести	18	59,3 ± 8,2	7 (38,9%)	11 (61,1%)
Группа сравнения (сезонный грипп)	**27**	45,6 ± 5,5	12 (44,5%)	15 (55,5%)
II клиническая группа	**87**		53 (60,9%)	34 (39,1%)
Нетяжелая пневмония как осложнение гриппа А H1N1pdm09	67	19,98 ± 1,6	43 (64,2%)	24 (35,8%)
Тяжелая пневмония как осложнение гриппа А H1N1pdm09	20	21,35 ± 4,8	10 (50%)	10 (50%)
Группа сравнения (внебольничная пневмония), из них: – пневмония нетяжелая – пневмония тяжелая	**50** 35 15	 21,6 ± 3,1 19,73 ± 3,6	 21 (60%) 9 (60%)	 14 (40%) 6 (40%)

Контрольную группу составили 20 здоровых детей, сопоставимые по возрасту и полу с исследуемыми клинических групп.

Объектом для исследования явилась сыворотка крови. Количественное содержание ММР-2 и ММР-9 оценивали с использованием тест-систем «Quantikine MMP-2 и MMP-9 Immunoassay» производства R&D Systems, США. Определение концентрации ММРТІ проводили тест-системой «BioSource HuTIMP-1 kit» производства BioSourse Europe S.A., Бельгия.

Все измерения проводили с помощью автоматического вертикального фотометра «Multiscan MCC 340» согласно требованиям тест-систем. После чего производился расчет отношения MMP-2 и MMP-9 к MMPTI.

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью программы «BIOSTAT». Количественные данные выражали в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Достоверность различий между двумя независимыми совокупностями оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Различия сравниваемых показателей считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что выраженность клинических симптомов заболевания определяется степенью активности иммунных реакций, в процессе которых реализуется эффекторный цитолитический потенциал к вирусинфицированным клеткам-мишеням при помощи физиологически активных медиаторов микробоцидного действия – катионных белков: ферментных (миелопероксидаза, лизоцим, эластаза) и неферментных (лактоферрин, ферритин, дифензины), осуществляющих нарушение целостности клеточной оболочки возбудителя и блокаду в нем ключевых метаболических процессов, благодаря действию продуктов метаболизма арахидоновой кислоты, секретируемых нейтрофилами в околоклеточное пространство, стимулирующих образование свободных радикалов и окиси азота, также необходимых для инактивации возбудителя. Поэтому нами первоначально исследовано содержание MMP-2, MMP-9, MMPTI в сыворотке крови у больных с неосложненным течением гриппозной инфекции.

Нами установлено, что уровень MMP-2, MMP-9, MMPTI достоверно отличался у пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением гриппа A H1N1pdm09 (табл. 2).

Таблица 2

Содержание MMP-2, MMP-9, MMPTI в сыворотке крови у больных с неосложненным гриппом, M ± SD

Показатель	Группа контроля, $n = 20$	Грипп A H1N1pdm09 легкое течение, $n = 40$	Грипп A H1N1pdm09 среднетяжелое течение, $n = 56$	Грипп A H1N1pdm09 тяжелое течение, $n = 18$	Группа сравнения, $n = 27$
MMP-2	101,7 ± 25,9	99,9 ± 12,6	242,9 ± 94,4*/**	317,7 ± 25,9*/**	102,1 ± 41,2
MMP-9	104,6 ± 47,6	101,7 ± 10,9	246,7 ± 95,8*/**	298,5 ± 21,5*/**	105,9 ± 15
MMPTI	102,3 ± 16,9	101,3 ± 10,9	234 ± 91,3*/**	259,8 ± 32,8*/**	103,1 ± 9
MMP-2/MMPTI	1,0 ± 0,14	1,0 ± 0,09	1,1 ± 0,13*/**	1,2 ± 0,11*/**	1,0 ± 0,11
MMP-9/MMPTI	1,0 ± 0,09	1,0 ± 0,08	1,1 ± 0,12*	1,15 ± 0,12*/**	1,0 ± 0,14

Примечания: * – статистическая значимость различий с контролем;
** – статистическая значимость различий с группой клинического сравнения.

Между тем в группе детей с сезонным гриппом, а также при легком течении пандемического гриппа уровень исследуемых металлопротеаз не только не отличался от группы здоровых детей, но и не нарушалось физиологическое отношение данных металлопротеаз к их специфическому ингибитору. Продукция MMP-2, MMP-9 у детей со среднетяжелой формой гриппа A H1N1pdm09 превышала показатели контроля и аналогичные показатели при сезонном гриппе в 2,4 и 2,3 раза соответственно ($p = 0,0001$), тогда как тяжелое течение пандемического гриппа сопровождалось более высоким содержанием MMP-2, MMP-9, превышая показатели здоровых детей в 3,1 раза, а уровень у больных с гриппом A H3N2 – в 2,8 раза ($p = 0,0001$). Кроме того, отмечено, что при тяжелом течении гриппа наблюдалась не только гиперпродукция металлопротеаз, но и нарушалось их физиологическое отношение с продукцией MMPTI ($p = 0,0001$).

Содержание MMP-2, MMP-9, MMPTI у больных с осложненным течением гриппа представлено в табл. 3.

Уровень исследуемых металлопротеаз повышался во всех исследуемых нами группах больных с пневмонией относительно здоровых индивидуумов. При этом обнаружено, что если при пневмонии, этиологически не связанной с пандемическим гриппом, уровень MMP-2 и MMP-9 превышал контрольные значения в 1,8 и 2,5 раза, независимо от тяжести ее течения, то значения исследуемых металлопротеаз при осложненном гриппе A H1N1pdm09 превышали аналогичные показатели соответственно в 3,4 и 4,1 раза. Причем тяжелое течение пневмонии при пандемическом гриппе сопровождалось более значимым повышением уровня MMP-2 и MMP-9 не только

по сравнению с контролем и группой сравнения ($p = 0,0001$), но и относительно детей с нетяжелыми формами пневмонии при гриппе А H1N1pdm09 ($p = 0,0001$). Повышение показателей соотношения MMP-2 и MMP-9 к MMPTI также отмечено во всех исследуемых группах больных с пневмонией, исключая соотношение MMP-9 к MMPTI у детей с тяжелой пневмонией группы сравнения ($p = 0,061$). Показатель отношения исследуемых металлопротеаз к их физиологическому ингибитору максимально увеличивался у детей с тяжелой пневмонией при гриппе и достоверно отличался от группы детей с нетяжелым ее течением ($p = 0,0001$).

Таблица 3

Содержание MMP-2, MMP-9, MMPTI в сыворотке крови у больных с осложненным гриппом, M ± SD

Показатель	Группа контроля, $n = 20$	Нетяжелая пневмония, как осложнение гриппа А H1N1pdm09, $n = 67$	Тяжелая пневмония, как осложнение гриппа А H1N1pdm09, $n = 20$	Пневмония нетяжелая (группа сравнения), $n = 35$	Пневмония тяжелая (группа сравнения), $n = 15$
MMP-2	101,7 ± 25,9	350,1 ± 46,4*/**	413,5 ± 37,3*/***	179,6 ± 65,2*	249,8 ± 99,9*
MMP-9	104,6 ± 47,6	354,3 ± 57,4*/**	439,4 ± 45,5*/***	173,2 ± 55*	234,1 ± 99,9*
MMPTI	102,3 ± 16,9	289,2 ± 34,5*/**	240,5 ± 26,3*	157,5 ± 60,2*	228,8 ± 90,1*
MMP-2/ MMPTI	1,0 ± 0,14	1,22 ± 0,17*/**	1,73 ± 0,21*/***	1,15 ± 0,16*	1,09 ± 0,1*
MMP-9/ MMPTI	1,0 ± 0,09	1,25 ± 0,24*/**	1,84 ± 0,27*/***	1,15 ± 0,16*	1,1 ± 0,18

Примечания: * – статистическая значимость различий с контролем;
** – статистическая значимость различий с группой клинического сравнения (нетяжелая пневмония);
*** – статистическая значимость различий с группой клинического сравнения (тяжелая пневмония).

В ходе проводимого исследования нас интересовали и возможные различия между содержанием изучаемых показателей в сыворотке крови у детей с неосложненным течением пандемического гриппа и при уже развившейся пневмонии. Нами зафиксировано, что различия всех исследуемых показателей у детей с тяжелой пневмонией при пандемическом гриппе значительно превышали аналогичные у детей с тяжелым гриппом ($p = 0,0001$). Помимо этого, уровень MMP-2, MMP-9, MMPTI у детей с тяжелым течением гриппа превышал таковые показатели у детей с пневмонией, этиологически не связанной с гриппом H1N1pdm09, что подтверждает потенциальную способность вируса пандемического гриппа к фиброзу легочной ткани.

Таким образом, превышение показателей MMP-2, MMP-9 и MMPTI у детей со среднетяжелым и тяжелым течением гриппа обуславливает течение физиологических процессов, приводящих к инактивации патогена. Однако выявленные нарушения при данных формах физиологического соотношения исследуемых металлопротеаз к их ингибитору могут объяснить, с одной стороны, интенсивность воспалительной реакции, характерной для более тяжелых форма гриппа, а с другой стороны, уже на этой стадии патологического процесса может стать значимым фактором риска развития фиброза легочной ткани. Гиперпродукция металлопротеаз при пневмонии, обусловленной вирусом гриппа H1N1pdm09, должна расцениваться как фактор риска не только тяжелого течения пневмонического процесса, но и свидетельствовать о риске развития фиброза легочной ткани, что требует тщательного катамнестического наблюдения за данной категорией пациентов.

Список литературы

1. Бобкова И.Н. Роль матриксных металлопротеиназ в патогенезе заболеваний почек / И.Н. Бобкова, Л.В. Козловская, О.А. Ли // Терапевтический архив, 2008. – № 6. – С. 86–90.

2. Гасанов А.Г. Роль изменений внеклеточного матрикса при возникновении сердечно-сосудистых заболеваний / А.Г. Гасанов, Т.В. Бершова // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – С. 155–167.

3. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.

4. Пруткина Е.В. Локальные изменения в системе «матриксная металлопротеиназа-2- ингибитор матриксных

металопротеиназ-2» в легких при дистресс-синдроме на фоне вирусной пневмонии [Электронный ресурс] / Е.В. Пруткина, А.В. Сепп, Н.Н. Цыбиков // Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – № 1. – С. 46–51. – Режим доступа: http://medacadem.chita.ru/zmv (дата обращения: 29 апр. 2013).

5. Учайкин В.Ф. Диагностика, лечение и профилактика гриппа и острых респираторных инфекций у детей. – М., 2001. – 16 с.

6. Внебольничная пневмония у детей: распространенность, диагностика, лечение и профилактика / А.Г. Чучалин и др. – М.: Оригинал-макет, 2011. – 64 с.

7. Mechanisms of multi-organ failure in severe influenza / H. Kido et al. // Nippon Rinsho. – 2010. – Vol. 68 (8). – P. 1565–1573.

8. Polymorphism in matrix metalloptoteinas-1, 2, 3 and 12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage / B. Zhang et al. // Srtoke. – 2001. – Vol. 32. – P. 1198–1202.

9. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza / J.F. Bermejo-Martin et al. // Crit. Care. – 2009. – Vol. 13(6). – P. 201.

10. 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 America / Bradley J.S. et al. // Clin. Infect. Dis. – Aduance Access published August 30, 2011. – P. 1–5.

11. Three fatal cases of pandemic 2009 influenza A virus infection in Shenzhen are associated with cytokine storm / X.W. Cheng et al. // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2011. – Vol. 175(1). – P. 185–187.

References

1. Bobkov I.N., Kozlovsky L.V., O. Do. The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of kidney disease. *Therapeutic Archives*, 2008, no. 6, pp. 86–90.

2. Hasanov A.G., Bershova T.V. The role of extracellular matrix changes in the event of cardiovascular disease. *Biomedical Chemistry*, 2009, no. 55. pp. 155–167.

3. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease. *Chita: Express Publishing*, 2010. 832 p.

4. Prutkina E.V., Sepp A.V., Tsybikov N. Local changes in the «matrix metalloproteinase-2 inhibitor of matrix metaloproteinaz-2» in the lungs during distress syndrome on the background of viral pneumonia [electronic resource]. *Transbaikalia Medical Gazette*, 2013, no. 1, pp. 46–51. – Mode of access: http://medacadem.chita.ru/zmv (date accessed: April 29. 2013).

5. Uchaikin V.F. Diagnosis, treatment and prevention of influenza and acute respiratory infections in children. *Moscow*, 2001. 16 p.

6. Chuchalin A.G. Community-acquired pneumonia in children: prevalence, diagnosis, treatment and prevention. *Moscow: Camera-ready*, 2011. 64 p.

7. H. Kido, J. Chida, M. Yao, S. Wang Mechanisms of multi-organ failure in severe influenza. *Nippon Rinsho*, 2010, no. 68 (8), pp. 1565–1573.

8. Zhang B. Polymorphism in matrix metalloptoteinas-1, 2, 3 and 12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage. *Srtoke*, 2001, no 32, pp. 1198–1202.

9. Bermejo-Martin J.F. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit. Care*, 2009, no. 13(6), pp. 201.

10. Bradley J.S. 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 America. *Clin. Infect. Dis.* – Aduance Access published August 30, 2011, pp. 1–5.

11. Cheng X.W., Lu J., Wu C.L., Yi L.N., Xie X., Shi X.D., Fang S.S., Zan H., Kung H.F., He M.L. Three fatal cases of pandemic 2009 influenza A virus infection in Shenzhen are associated with cytokine storm. *Respir. Physiol. Neurobiol* , 2011, no. 175(1), pp. 185–187.

Рецензенты:

Цыбиков Н.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита;

Гаймоленко И.Н., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой госпитальной педиатрии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Чита.

Работа поступила в редакцию 15.09.2014.