

УДК 616.8-005-053.35:612.273.2:616.15-07

## ДИНАМИКА МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В КРОВИ У НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Перинатальный центр (клинический) Алтайского края, г. Барнаул  
Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Чугунова Т.Н., Кореновский Ю.В., Лобанов Ю.Ф.

*У новорождённых детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы повышены концентрации матриксных металлопротеиназ-1,-9 и снижен уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 в плазме пуповинной крови в сравнении со здоровыми детьми. На 3-4-й день в плазме венозной крови продолжается повышение данных концентраций, тогда как у здоровых новорождённых они снижаются.*

**Ключевые слова:** новорождённые дети, гипоксия, матриксные металлопротеиназы-1,-9 и тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1.

*Newborns with hypoxic lesions of the central nervous system are characterized by increased concentration of matrix metalloproteinases-1,-9 and reduced levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in plasma of umbilical cord blood in comparison with the healthy children. On the 3rd-4th day, the increase of these concentrations proceeds in plasma of venous blood, while in the healthy new-born – they decrease.*

**Key words:** newborns, hypoxia, matrix metalloproteinases-1,-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1.

Имеющиеся в настоящий момент сведения о клинико-функциональном статусе новорожденных в раннем неонатальном периоде при перинатальной гипоксии и роли в его нарушении системы матриксных металлопротеиназ (ММП) и системных сдвигов метаболизма носят отрывочный характер, методологически разнородны и противоречивы [1, 2].

**Целью** настоящего исследования явилось изучение динамики матриксных металлопротеиназ в крови новорожденных детей в раннем неонатальном периоде для диагностики гипоксических поражений центральной нервной системы.

### Материалы и методы

В основу работы положены результаты обследования 124 детей, 74 из которых родились недоношенными. Основную группу составили 25 детей с гипоксически-ишемическим поражением центральной нервной системы (ЦНС), группу сравнения – 25 детей с геморрагическим поражением ЦНС, и контрольную группу составили 24 условно здоровых недоношенных ребенка. У доношенных детей основную группу составили 25 детей с церебральной ишемией I-II степени, группу сравнения – 25 условно здоровых детей.

При проведении данного исследования использовались клинические, ультразвуковые (нейросонография) и лабораторные методы (иммуноферментное определение concentra-

ций матриксных металлопротеиназ 1, 9 (ММП-1 и ММП-9) и тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ (ТИМП-1). Оценка неврологического статуса проводилась по общепринятой методике, нейросонография новорожденным детям проводилась на аппарате Viv-i (General Electrics, США), исследование проводилось с помощью линейного 12v и конвексного 8v датчиков, использовалась общепринятая методика: через большой родничок и височную кость в различных плоскостях. Для проведения иммуноферментного анализа использовались наборы RayBio® ELN-MMP1-001, RayBio® ELN-MMP9-001 и RayBio® ELN-ТИМП1-001 (RayBiotech, США). Концентрации ММП-1, ММП-9 и ТИМП-1 определялись в плазме пуповинной и плазме венозной крови на 3-4-й день жизни. Для выявления относительных изменений в системе матриксных металлопротеиназ вычислялись отношения концентраций ММП-1/ТИМП-1 и ММП-9/ТИМП-1. Клиническая картина гипоксического поражения центральной нервной системы у новорожденных детей неспецифична, поэтому признаки поражения ЦНС регистрировались в форме синдромов угнетения или возбуждения. Статистический анализ полученных результатов исследования проводился с использованием пакета SigmaPlot 11. Достоверность межгрупповых различий оценивались по U-критерию Манна-Уитни, различие параметров в динамике – по критерию Вилкоксона.

## Результаты и обсуждение

Учитывая последние данные о важной роли внеклеточной протеолитической системы в регуляции ремоделирования соединительной, в частности, нервной ткани [4, 5], нами проведено проспективное комплексное исследование клинического статуса в раннем неонатальном периоде у новорожденных детей с параллельным определением специфического профиля системы матричных металлопротеиназ у новорожденных детей. В ходе исследования установлены достоверно высокие показатели ферментов протеолитической системы у недоношенных детей (табл. 1) в 1-й и 2-й группах в плазме пуповинной крови в сравнении с детьми, не имеющими гипоксического поражения центральной нервной системы. У недоношенных детей 2-й группы с гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС в плазме пуповинной крови концентрация ММП-1 составила  $0,38 \pm 0,012$  нг/мл, что достоверно ( $p < 0,01$ ) превышало данные в 3-й группе ( $0,28 \pm 0,016$  нг/мл), но была сопоставима с данными в 1-й группе ( $0,32 \pm 0,012$  нг/мл). Также отмечается достоверное повышение ( $p < 0,01$ ) концентрации ММП-9 в 1-й ( $104,0 \pm 4,8$  нг/мл) и 2-й группах ( $118,4 \pm 8,75$  нг/мл) в сравнении с 3-й ( $92,23 \pm 2,08$  нг/мл), данные 1-й и 2-й групп статистически сопоставимы. Однако ТИМП-1 ( $30,7 \pm 1,51$  нг/мл) в 3-й группе в плазме пуповинной крови был достоверно выше ( $p < 0,01$ ), чем в 1-й и 2-й группах ( $23,5 \pm 1,47$  нг/мл и  $24,4 \pm 2,31$  нг/мл,  $p > 0,05$ ). Представленные данные свидетельствуют о повышении протеолитической активности матричных металлопротеиназ у новорожденных с перинатальной гипоксией. Подтверждением этого феномена является достоверно значимое повышение отношений в плазме пуповинной крови концентраций ММП-9/ТИМП-1 в 1-й и 2-й группах в сравнении с 3-й ( $p < 0,01$ ) и повышение отношений ММП-1/ТИМП-1 в 1-й и 2-й группах в сравнении с 3-й без достоверной значимости ( $p > 0,05$ ). Изменения уровней матричных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора ТИМП-1, ранее отмечаемые и другими исследователями [6, 7], при гипоксии объясняются повышенной продукцией матричных металлопротеиназ клетками соединительной ткани на уровне транскрипции и трансляции [8]. С точки зрения патогенеза эти данные указывают на возможную связь между перинатальным гипоксическим повреждением ЦНС и активацией системы матричных металлопротеиназ, что и прослеживается в нашем исследовании.

Таким образом, нами обнаружено, что наибольшая активность протеолитической системы в плазме пуповинной крови наблюдалась у недоношенных детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы, особен-

но у детей 2-й группы с гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС.

По данным исследований последних лет [5, 9, 10] известно, что изменения в системе матричных металлопротеиназ после первичного стимула (гипоксия, цитокины) могут происходить с некоторой задержкой. Принимая во внимание эту особенность повреждения ЦНС, при перинатальной гипоксии нами оценивалась динамика этих показателей в сравнении с исходным уровнем при рождении. Отмечалась более высокая ( $p < 0,01$ ) концентрация ММП-1 на 3-4-й день жизни в плазме венозной крови у детей 1-й ( $0,4 \pm 0,02$  нг/мл) и 2-й группы ( $0,4 \pm 0,02$  нг/мл) в сравнении с 3-й ( $0,3 \pm 0,02$  нг/мл), данные в 1-й и 2-й группах не имели статистических различий. Наибольшая активность ММП-9 на 3-4-й день наблюдалась у детей 2-й группы ( $188,6 \pm 14,31$  нг/мл), концентрация которой была значительно выше ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ ), чем у детей 1-й ( $108,9 \pm 4,99$  нг/мл) и 3-й групп ( $74,43 \pm 3,69$  нг/мл). В 1-й и 2-й группах в то же время отмечалась более высокая ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ ) концентрация ТИМП-1 ( $26,9 \pm 1,82$  нг/мл  $43,8 \pm 3,18$  нг/мл) в сравнении с 3-й ( $16,96 \pm 1,51$  нг/мл), между 1-й и 2-й группами ( $p < 0,05$ ) также регистрировалась статистическая разница. Представленные данные свидетельствуют о повреждении мембран клеток с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Нами была исследована динамика показателей матричных металлопротеиназ у новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС в раннем неонатальном периоде и без такового. В нашем исследовании отмечалось продолжение активации ММП-1 в 1-й и 2-й группах и снижение концентрации в 3-й группе без достоверно значимых различий ( $p > 0,05$ ) в сравнении с исходными данными. При сравнении концентрации ММП-9 на 3-4-й день с исходной было очевидно повышение без достоверной значимости у детей 1-й группы ( $p > 0,05$ ), тогда как отмечался достоверно значимый ( $p < 0,001$ ) рост концентрации ММП-9 у детей 2-й группы, но значимое ( $p < 0,05$ ) снижение в 3-й группе. Представленные данные продемонстрировали, что процесс повреждения центральной нервной системы у детей 2-й группы с гипоксически-геморрагическим поражением продолжается, что свидетельствует о сохраняющемся иммунопатологическом процессе на клеточно-тканевом уровне у этой категории детей. Активность продолжающегося процесса повреждения на 3-4-й день у детей 2-й группы подтверждалась значимым ( $p < 0,05$ ) повышением концентрации ТИМП-1 в плазме венозной крови. У детей 1-й группы также продолжалось повышение концентрации ТИМП-1 без достоверной значимости в сравнении с исходной, однако у детей 3-й группы отмечалось

статистически значимое ( $p < 0,001$ ) снижение концентрации. Следовательно, чем больше концентрация ММП, тем больше возникает потребность в его ингибиторе. Сравнительный анализ параметров системы матричных металлопротеиназ у доношенных детей (табл. 2) при рождении показал, что у доношенных детей с гипоксическим поражением ЦНС в сравнении со здоровыми в плазме пуповинной крови концентрации ММП-1 были сопоставимы и составили  $0,31 \pm 0,01$  нг/мл и  $0,28 \pm 0,015$  нг/мл. Однако концентрация ММП-9 у детей 1-й группы составила  $100,8 \pm 6,0$  нг/мл и была достоверно ( $p < 0,05$ ) выше данных 2-й группы –  $77,5 \pm 3,6$  нг/мл, в то же время концентрация их тканевого ингибитора ТИМП-1 была ниже ( $25,8 \pm 1,5$  нг/

мл против  $27,3 \pm 1,3$  нг/мл,  $p > 0,05$ ). Это косвенно свидетельствует о наличии нарушений у новорожденных с перинатальной гипоксией – повышенной протеолитической активности матричных металлопротеиназ [12,13,14]. Подтверждением этого феномена является повышение отношений в плазме пуповинной крови концентраций ММП-1/ТИМП-1 ( $0,013 \pm 0,001$  нг/мл и  $0,012 \pm 0,0009$  нг/мл) и ММП-9/ТИМП-1 в 1-й группе ( $4,45 \pm 0,46$  нг/мл и  $3,17 \pm 0,29$  нг/мл), однако достоверной разницы в отношениях между группами выявлено не было. С точки зрения патогенеза эти данные указывают на возможную связь между перинатальным повреждением ЦНС и активацией системы матричных металлопротеиназ.

Таблица 1

Динамика показателей протеолитической системы матричных металлопротеиназ на 3-4-й день жизни у недоношенных детей,  $M \pm m$

Признак	Недоношенные дети с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС 1-я группа (n=25)		Недоношенные дети с гипоксически-геморрагическим поражением ЦНС 2-я группа (n=25)		Здоровые недоношенные дети 3-я группа (n=24)	
	плазма пуповинной крови	плазма венозной крови на 3-4-й день жизни	плазма пуповинной крови	плазма венозной крови на 3-4-й день жизни	плазма пуповинной крови	плазма венозной крови на 3-4-й день жизни
ММП-1, нг/мл	$0,3 \pm 0,01^*$	$0,4 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,01^{**}$	$0,4 \pm 0,02^{**}$	$0,3 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,02$
ММП-9, нг/мл	$104,0 \pm 4,8^*$	$108,9 \pm 4,99^*$	$118,4 \pm 8,75^{**1}$	$188,6 \pm 14,31^{**}$	$92,2 \pm 2,08$	$74,43 \pm 3,69$
ТИМП-1, нг/мл	$23,5 \pm 1,47^*$	$26,9 \pm 1,82^{\#}$	$24,4 \pm 2,31^{**1}$	$43,8 \pm 3,18^{**}$	$30,7 \pm 1,51^1$	$16,96 \pm 1,51$
ММП-1/ТИМП-1	$0,02 \pm 0,001$	$0,015 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,004^1$	$0,011 \pm 0,001^{**}$	$0,01 \pm 0,001^1$	$0,017 \pm 0,001$
ММП-9/ТИМП-1	$5,2 \pm 0,35^*$	$4,3 \pm 0,33^{\#}$	$4,8 \pm 0,47^{**}$	$4,5 \pm 0,49$	$3,2 \pm 0,17^1$	$4,94 \pm 0,44$

Примечание: по критерию U Манна-Уитни, \* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении 1-й и 2-й групп, \*\* – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении 2-й и 3-й групп, # – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении 1-й и 3-й групп на 3-й день жизни, <sup>1</sup> – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) при сравнении полученных данных в плазме пуповинной и венозной крови на 3-4-й день жизни в группах (по критерию Вилкоксона).

На 3-4-й день жизни в нашем исследовании, как и у недоношенных детей, отмечается продолжение активации системы матричных металлопротеиназ. Продолжает увеличиваться концентрация ММП-1 ( $0,32 \pm 0,02$  нг/мл против  $0,25 \pm 0,001$  нг/мл,  $p > 0,05$ ), но без достоверных различий в группах, концентрация ММП-9 в плазме пуповинной крови достоверно выше у детей в 1-й группе ( $104,6 \pm 11,0$  против  $73,1 \pm 3,8$ ,  $p < 0,05$ ). В то же время достоверно значимо отмечается повышенная концентрация ТИМП-1 в 1-й группе наряду со снижением во 2-й группе ( $23,3 \pm 2,7$  нг/мл против  $15,7 \pm 0,7$  нг/мл,  $p < 0,05$ ).

Однако достоверных различий в группах соотношений ММП-1/ТИМП-1 и ММП-9/ТИМП-1 ( $p > 0,05$ ), как и в 1-е сутки, не выявлено.

Оценивая взаимосвязь синдромов и системы матричных металлопротеиназ в нашем исследовании (табл. 3), нами установлено, что достоверной разницы между концентрациями ММП-1 у доношенных и недоношенных детей в плазме пуповинной крови не выявлено (при угнетении  $p = 0,675$ , при возбуждении  $p = 0,148$ ). В то же время достоверно значимо ( $p = 0,012$ ) отмечается повышение концентрации ММП-1 в плазме венозной крови на 3-4-й

день жизни у недоношенных детей при синдроме угнетения, а у доношенных снижение – при синдроме возбуждения ( $p=0,443$ ). Табл. 3 демонстрирует продолжающуюся активацию ММП-9 у недоношенных детей на 3-4-й день с достоверностью различий (110,11±4,838 нг/мл и 143,88±10,333 нг/мл,  $p=0,002$  и 117,89±19,669 нг/мл и 178,56±28,468 нг/мл,  $p=0,023$ ) при различных синдромах, однако у доношенных детей продолжение активации наблюдается только при синдроме угнетения (с 122,34±9,606 нг/мл до 145,51±20,321 нг/мл,  $p=0,292$ ). В плазме пуповинной крови концентрация ТИМП-1 у детей исследуемых групп достоверно значимых раз-

личий при синдромах не имела. А в плазме венозной крови у недоношенных детей на 3-4-й день жизни при угнетении и возбуждении отмечается достоверное повышение концентрации ТИМП-1 (23,94±1,454 и 34,88±2,394,  $p<0,001$ , 24,04±3,499 и 28,23±4,621,  $p=0,023$ ). У доношенных детей при синдроме возбуждения на 3-й день отмечается достоверно значимое снижение концентрации ТИМП-1 ( $p=0,016$ ) в сравнении в сравнении с исходной. Однако у недоношенных детей при синдроме возбуждения на 3-й день жизни в плазме венозной крови концентрация ТИМП-1 в сравнении с доношенными была значительно выше ( $p<0,001$ ).

Таблица 2

Динамика системы матриксных металлопротеиназ на 3-4-й день жизни у доношенных детей,  $M\pm t$

Признак	Основная группа (n=25)		Контрольная группа (n=25)	
	плазма пуповинной крови	плазма венозной крови на 3-4-й день	плазма пуповинной крови	плазма венозной крови на 3-4-й день
ММП-1, нг/мл	0,31±0,01	0,32±0,02	0,28±0,001	0,25±0,01
ММП-9, нг/мл	100,8±29,43	104,6±11,0	77,52±16,224	73,1±3,8
ТИМП-1, нг/мл	25,8±1,5	23,3±2,7	27,3±1,7*	15,7±0,7
ММП-1/ТИМП-1	0,013±0,001	0,016±0,002	0,0115±0,0009	0,017±0,001
ММП-9/ТИМП-1	4,45±0,46	4,82±0,41	3,17±0,29	4,72±0,28

\*-  $p<0,05$

Таблица 3

Взаимосвязь синдромов и протеолитической системы матриксных металлопротеиназ,  $M\pm t$

Показатель	Недоношенные дети		Доношенные дети	
	Синдром угнетения	Синдром возбуждения	Синдром угнетения	Синдром возбуждения
ММП-1				
1 день	0,35±0,0096	0,34±0,030	0,34±0,021	0,29±0,018
3-4-й день	0,397±0,0134*	0,32±0,0263	0,39±0,033*	0,27±0,016
	$p=0,012$	$p=0,574$	$p=0,121$	$p=0,443$
ММП-9				
1 день	110,11±4,838	117,89±19,669	122,34±9,606	86,38±4,743
3-4-й день	143,88±10,333*	178,56±28,468	145,51±20,321*	77,34±4,407
	$p=0,002$	$p=0,022$	$p=0,292$	$p=0,614$
ТИМП-1				
1 день	23,94±1,454	24,04±3,499	25,48±2,585	25,98±1,887
3-4-й день	34,88±2,394	28,23±4,621**	34,64±4,363*	15,67±1,398
	$p<0,001$	$p=0,023$	$p=0,079$	$p=0,016$

Примечание. По критерию U Манна-Уитни:\* - достоверность различий ( $p<0,05$ ) при сравнении синдромов угнетения и возбуждения в группах доношенных или недоношенных детей, \*\* - достоверность различий ( $p<0,05$ ) при сравнении синдрома возбуждения у недоношенных и доношенных детей. По критерию Вилкоксона сравнивались исходные данные с данными на 3-4-й день жизни.

Таким образом, максимальная активность ММП-1 наблюдалась у детей в группах с синдромом угнетения на 3-й день, также на 3-й день отмечалось и увеличение концентрации ММП-9, однако наибольший уровень наблюдался у недоношенных детей с синдромом возбуждения. Минимальная концентрация тканевого ингибитора ММП (ТИМП-1) была у доношенных детей с синдромом возбуждения на 3-й день.

#### Выводы

1. У детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы отмечаются повышенные концентрации матриксных металлопротеиназ (ММП-1,-9) и пониженный уровень ТИМП-1 в плазме пуповинной крови в сравнении со здоровыми детьми.

2. На 3-4-й день жизни у доношенных и недоношенных детей с гипоксическим поражением центральной нервной системы в плазме венозной крови отмечается повышение концентрации ММП-1, ММП-9 и ТИМП-1 в сравнении с исходными данными, тогда как у здоровых новорожденных они снижаются.

3. На 3-4-й день жизни в плазме венозной крови у недоношенных детей при синдроме угнетения отмечается достоверно значимое повышение концентраций матриксных металлопротеиназ (ММП-1,-9) и тканевого ингибитора (ТИМП-1).

#### Список литературы

1. Bednarek N., Svedin P., Garnotel R. et al. Increased MMP-9 and TIMP-1 in mouse neonatal brain and plasma and in human neonatal plasma after hypoxia-ischemia: a potential marker of neonatal encephalopathy. *Pediatr Res.* 2011; 71(1): 63-70.
2. Perlman J.M. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. *Pediatrics.* 1997; 99: 851.
3. Классификация перинатальных поражений нервной системы у новорожденных: Метод. Рекомендации. М.: Рос. Ассоц. специалистов перинатальной медицины, 2000.
4. Yan C., Boyd D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Cell Physiol.* 2007; 211: 19-26.
5. Y. Yang, J. W. Hill, G. A. Rosenberg. Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 99: 241-263.
6. Sunagawa, S., Ichiyama T., Honda R. et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in perinatal asphyxia. *Brain & Development.* 2009; 31: 588-593.
7. Tong W., Zhang L. Fetal hypoxia and programming of matrix metalloproteinases. *Drug Discovery Today.* 2012; 17(3/4): 124-134.

8. Dejonckheere E., Vandenbroucke R.E., Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug Discov Today.* 2011; 16(17/18): 762-78.

9. Sandoval K.E., Witt K.A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 200-219.

10. Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol. Life Sci.* 2013; 71(4): 659-672.

11. Rosell A., Cuadrado E., Ortega-Aznar A. et al. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke.* 2008; 39: 1121-1126.

12. Wang C.X., Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Neurobiol.* 2007; 83: 140-148.

#### Контактные данные

Автор, ответственный за переписку: Кореновский Юрий Владимирович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, д. 126.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: timidin@gmail.com

#### Информация об авторах

Чугунова Татьяна Николаевна, к.м.н., заместитель главного врача по педиатрической работе КГБУЗ «Перинатальный центр (клинический) Алтайского края», г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, д. 126.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: chugunova.t@inbox.ru

Кореновский Юрий Владимирович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой общей и биологической химии, клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, д. 126.

Тел.: (3852) 566938.

E-mail: timidin@gmail.com

Лобанов Юрий Федорович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики детских болезней Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Тел.: (3852) 400883.

E-mail: luf@list.ru