

УДК 616.24-002:612.24-005.98

Пруткина Е.В., Сепп А.В., Цыбиков Н.Н.

**ЛОКАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ "МАТРИКСНАЯ
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА-2 - ИНГИБИТОР МАТРИКСНЫХ
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ-2" В ЛЕГКИХ ПРИ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ
НА ФОНЕ ВИРУСНОЙ ПНЕВМОНИИ**

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия

Исследовали парафиновые срезы легких 35 погибших во время эпидемии гриппа А/Н1N1, имеющих патоморфологические маркеры острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Методом иммуногистохимии определяли экспрессию матриксной металлопротеиназы-2 (ММП-2) и тканевого ингибитора металлопротеиназ-2 (ТИМП-2) клетками легких. В экссудативную стадию ОРДС экспрессия ММП-2 была самой высокой в нейтрофилах, макрофагах, эндотелии и фибробластах, самой низкой - в альвеолоцитах 1 типа. В пролиферативную стадию она оставалась на высоком уровне в нейтрофилах и альвеолоцитах 2 типа, уменьшалась в макрофагах и эндотелии. В фибротическую стадию синтез ММП-2 в нейтрофилах и альвеолоцитах 2 типа снижался, а в макрофагах и эндотелиоцитах оставался на предыдущем уровне. Экспрессия ТИМП-2 в экссудативную фазу самой большой была в нейтрофилах, минимальной - в альвеолоцитах 1 типа и фибробластах. В пролиферативную стадию экспрессия ТИМП-2 увеличивалась в фибробластах, а в фибротическую - она снижалась. В остальных клетках синтез ТИМП-2 не изменялся.

Ключевые слова: пневмония, респираторный дистресс-синдром, матриксная металлопротеиназа-2, ингибитор металлопротеиназ-2.

E. V. Prutkina, A. V. Sepp, N. N. Tsybikov

**LOCAL CHANGES IN THE SYSTEM "MATRIX METALLOPROTEINASE-2 -
INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2" IN THE LUNGS DURING
DISTRESS SYNDROME AMID VIRAL PNEUMONIA**

Chita State Medical Academy, Chita

Lung paraffin sections of 35 subjects with pathological markers of acute respiratory distress syndrome (ARDS) died during the epidemic of influenza A/H1N1 were investigated. The expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) by cells of the lungs were determined by immunohistochemistry. In the exudative stage of ARDS expression of MMP-2 was the highest in neutrophils, macrophages, endothelium, and fibroblasts, the lowest - in alveolocytes type 1. In the proliferative phase it remained at a high level in neutrophils and alveolocytes type 2, but it decreased in macrophages and endothelium. In the fibrotic stage the synthesis of MMP-2 decreased in neutrophils and alveolocytes type 2 and in macrophages and endothelial cells it remained at the previous level. In the exudative phase the expression of TIMP-2 was the largest in neutrophils, the lowest - in alveolocytes type 1 and fibroblasts. In the proliferative stage TIMP-2 expression increased in fibroblasts, and fibrotic stage it declined. In other cells synthesis of TIMP-2 did not change.

Key words: pneumonia, acute respiratory distress syndrome, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-2.

Во время эпидемии высокопатогенного гриппа А/Н1N1 на фоне вирусной пневмонии отмечалось необычно частое разви-

тие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), в том числе у молодых людей без сопутствующей патологии [3]. Не-

смотря на активное изучение, ОРДС остается одной из основных проблем современной реаниматологии. С 90-х годов XX века выделяют его раннюю обратимую стадию - острое повреждение легких (ОПЛ). Механизмы перехода обратимого ОПЛ в последующие фазы процесса исследованы недостаточно [4], что делает фундаментальные изыскания в этом направлении особенно актуальными.

Основным звеном патогенеза ОПЛ/ОРДС является повреждение альвеоло-капиллярной мембраны с развитием некардиогенного отека легких. Учитывая, что в состав аэрогематического барьера входят соединительно-тканые структуры альвеол и капилляров, возникло предположение об участии матриксных металлопротеиназ (ММП) в патогенезе синдрома. ММП - семейство протеолитических ферментов, расщепляющих основные компоненты внеклеточного матрикса. Они играют важную роль как в физиологических процессах (рост плаценты, эмбриогенез, репарация тканей), так и при патологии (опухольная инвазия, фиброз легких, атеросклероз и др.) [2, 5, 6, 7]. Одним из механизмов динамического сдерживания избыточной активности металлопротеиназ является синтез специфических тканевых ингибиторов - TIMP 1-4 [5, 9].

Роль ММП в развитии ОРДС изучалась путем определения концентрации ферментов в крови и/или бронхоальвеолярной лаважной жидкости [4], что не всегда отражает истинную картину локального процесса. В связи с чем целью настоящей работы стало исследование экспрессии ММП-2 и ее ингибитора TIMP-2 различными клетками в легких в зависимости от стадии развития ОРДС.

Материалы и методы.

В исследовании были использованы парафиновые блоки секционного материала 35 погибших больных во время эпидемии гриппа А/Н1N1 2009-10 гг. в Забайкальском крае. Среди них было 16 мужчин и 19 женщин в возрасте от 18 до 45 лет. У всех больных диагноз гриппа А/Н1N1 был дополнительно подтвержден посмертно путем обнаружения в секционных образцах тканей генома вируса методом полимераз-

ной цепной реакции. Анализировались протоколы патологоанатомических исследований и патологоанатомические диагнозы аутопсий, учитывалось наличие сочетанной, фоновой и сопутствующей патологии. Вирусная пневмония была выявлена у 26 человек (74%), вирусно-бактериальная у 9 (26%), во всех случаях были обнаружены патоморфологические маркеры ОРДС. Наиболее частой причиной ко-инфекции являлся *Staphylococcus aureus* [3]. Погибшие были разделены на 3 группы: 1-ая (n=10) - имеющие морфологические маркеры эксудативной (острой) стадии ОРДС (собственно ОПЛ); 2-ая (n=16) - критерии пролиферативной (подострой) фазы; в паренхиме легких больных 3-ей группы (n=9) были выявлены начальные признаки фибротической стадии [4].

Иммуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах легочной паренхимы биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом. В качестве первичных использовали видоспецифичные мышинные антитела к ММП-2(8B4) и TIMP-2 (3A4) ("SantaCruzbiotechnology", США). В качестве вторичных применяли биотинилированные анти-мышинные антитела в составе рекомендованной производителем системы визуализации ABSStaining System ("Santa Cruzbiotechnology", США), использующей в качестве хромогена 3,3'-диаминобензидина тетрахлорид. Дополнительную докраску срезов, в частности клеточных ядер, проводили водным раствором гематоксилина Гаррисона. Величину экспрессии ферментов в срезе определяли для всех продуцирующих клеток отдельно: при 400-кратном увеличении производился подсчет не менее 100 целевых клеточных элементов, в 10 случайно выбранных полях зрения. В каждом поле количественную оценку экспрессии антигена проводили в баллах по следующей шкале: отрицательный уровень - если позитивных клеток было менее 10% в поле зрения; 1 балл - при наличии 10-25% клеток; 2 балла - 25-50% клеток; 3 балла - 50-75% клеток; 4 балла - в случае окрашивания более 75% клеток [9].

Статистический анализ результатов

проводили с использованием пакета программ BIOSTAT версии 3.03. При сравнении групп использовали критерий χ^2 , различия считали значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде процента полей зрения с соответствующим уровнем экспрессии антигена по отношению к исследованному числу полей в срезе.

Результаты исследования и их обсуждение.

Вне зависимости от стадии ОРДС ММР-2 продуцировали нейтрофилы, макрофаги, фибробласты, эндотелий и альвеолоциты 1 и 2 типов.

В 1 группе погибших, в случае наступления летального исхода на 1-3 сутки от начала заболевания (5 наблюдений), в паренхиме легких наблюдались морфологические признаки неравномерно выраженного острого диффузного десквамативно-макрофагального альвеолита. Максимально был выражен интерстициальный компонент отека легочной паренхимы, также отмечался диффузный, но неравномерный альвеолярный отек. В просвете альвеол наблюдались: отечная жидкость со значительным количеством белка, нейтрофилы, мононуклеарные фагоциты, эритроциты и десквамированные альвеолоциты. В мелких бронхах и бронхиолах помимо комплекса воспалительных изменений отмечалась трансформация мерцательного эпителия (клетки принимали "оплывшую" форму), на поверхности слизистых наблюдались наложения фибриновых пленок и слизи с эритроцитарно-лейкоцитарной примесью. В сосудах микроциркуляторного русла встречались агрегация и сладжирование форменных элементов крови, реже - тромбов всех вариантов. У умерших на 5-7 сутки от начала заболевания (5 случаев) дополнительно фиксировались: "гиалиновые мембраны", наблюдалось присоединение вторичной инфекции с развитием гнойно-геморрагической пневмонии, нередко с фокусами микроабсцедирования.

В эту фазу наиболее активно ММР-2 продуцировали нейтрофилы, макрофаги, эндотелиоциты и фибробласты. В меньшей степени фермент экспрессировали альвео-

лоциты 2 типа. Самый низкий синтез энзима наблюдался в альвеолоцитах 1 типа (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1
Уровень экспрессии ММР-2
в экссудативную фазу ОРДС
(n=10, 100 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1-2 балла (% полей зрения)	3-4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
нейтрофилы	10	50	40	
макрофаги	22	50	28	p=0,29
эндотелий	30	46	24	p=0,12 p ₁ =0,77
фибробласты	13	71	10	p=0,92 p ₁ =0,59 p ₂ =0,26
альвеолоциты 1 типа	73	27	0	p=0,000* p ₁ =0,000* p ₂ =0,002* p ₃ =0,000*
альвеолоциты 2 типа	36	44	20	p=0,033* p ₁ =0,39 p ₂ =0,78 p ₃ =0,10 p ₄ =0,009*

Примечание: p - значение различий в сравнении с нейтрофилами; p₁ - значение различий в сравнении с макрофагами; p₂ - значение различий в сравнении с эндотелием; p₃ - значение различий в сравнении с фибробластами; p₄ - значение различий в сравнении с альвеолоцитами 1 типа; * - значимые различия.

У пациентов 2 группы летальный исход наступал преимущественно на 9-11 сутки от момента заболевания. В легких у них, помимо отека, отмечались: инфильтрация паренхимы нейтрофилами и макрофагами, признаки повреждения аэрогематического барьера, одномоментные организация и лизис "гиалиновых" мембран. Наряду с этим регистрировалась пролиферация сохранившихся альвеолоцитов 2 типа с их гиперплазией. По мере разрешения от отека и развития репаративных процессов появлялись признаки дифференцировки больших альвеолоцитов в клетки 1 типа. В зонах перехода терминальных бронхиол в альвеолы регистрировалась доброкачественная плос-

коклеточная метаплазия сохранившегося реснитчатого эпителия.

В эту стадию наибольшая экспрессия MMP-2 зафиксирована в нейтрофилах (86% суммарно), минимальная - в альвеолоцитах 1 типа (12% суммарно) (табл. 2).

Таблица 2
Уровень экспрессии MMP-2
в пролиферативную фазу ОРДС
(n=16, 160 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1-2 балла (% полей зрения)	3-4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
нейтрофилы	14	54	32	
макрофаги	48	50	2	p=0,000*
эндотелий	58	38	4	p=0,000* p ₁ =0,36
фибробласты	32	68	0	p=0,000* p ₁ =0,09 p ₂ =0,006*
альвеолоциты 1 типа	88	12	0	p=0,000* p ₁ =0,000* p ₂ =0,000* p ₃ =0,000*
альвеолоциты 2 типа	42	50	8	p=0,000* p ₁ =0,58 p ₂ =0,10 p ₃ =0,18 p ₄ =0,000*

Примечание: те же, что к табл. 1.

Пациенты 3 группы погибли в среднем на 14-16 сутки от начала заболевания. Микроскопически в паренхиме легких у них доминировали процессы фиброобразования с деформацией и нарушением архитектоники значительной части ацинусов, множественными зонами хронической эмфиземы, модификацией микроциркулярного русла. В интерстиции формировались зоны скопления фибро- и миофибробластов, воспалительный инфильтрат сокращался и приобретал лимфоцитарно-макрофагальный характер. Сосуды характеризовались эффектом перекалибровки за счет утолщения миоинтимальных слоев, приобретали извитую форму. На этом фоне наибольшая экспрессия MMP-2 отмечалась в нейтрофилах (62% суммарно) и фибробластах (59%), минимальная - в альвеолоцитах 1 типа (7%) (табл. 3).

Таблица 3
Уровень экспрессии MMP-2 в начале
фибротической фазы ОРДС
(n=9, 90 полей зрения)

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1-2 балла (% полей зрения)	3-4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
нейтрофилы	38	56	6	
макрофаги	68	32	0	p=0,039*
эндотелий	63	37	0	p=0,07 p ₁ =1,0
фибробласты	41	59	0	p=1,0 p ₁ =0,07 p ₂ =0,12
альвеолоциты 1 типа	93	7	0	p=0,000* p ₁ =0,024* p ₂ =0,012* p ₃ =0,000*
альвеолоциты 2 типа	68	32	0	p=0,039* p ₁ =0,78 p ₂ =1,0 p ₃ =0,07 p ₄ =0,000*

Примечание: те же, что к табл. 1.

Сопоставление степени экспрессии MMP-2 каждым видом клеток в зависимости от стадии ОРДС выявило следующие закономерности. Динамика продукции фермента в нейтрофилах и альвеолоцитах 2 типа была идентичной: в экссудативную и пролиферативную фазу они синтезировали протеиназу в одинаковой степени, в фибротическую стадию экспрессия фермента в них снижалась (p=0,003 для нейтрофилов; p=0,039 для альвеолоцитов 2 типа). В макрофагах и эндотелиоцитах экспрессия MMP-2 в фазу экссудации была самой высокой, в пролиферативную стадию она уменьшалась (p=0,04 для макрофагов; p=0,021 для эндотелия), сохраняясь на таком уровне и при начале фибротической фазы (p=0,15 для макрофагов; p=0,82 для эндотелия). Продукция фермента фибробластами во все стадии ОРДС была одинаково высокой (p=0,09). А синтез фермента в альвеолоцитах 1 типа был низким также вне зависимости от фазы синдрома (p=0,06).

Ингибитор металлопротеиназ TIMP-2 во все стадии ОРДС продуцировали те же клетки, что и MMP-2. В экссудативную фазу

синдрома наибольшая продукция ингибитора отмечалась в нейтрофилах (87% суммарно); в макрофагах, эндотелии и альвеолоцитах 2 типа синтез протеина был на одинаковом уровне (50-60%); меньше остальных синтезировали TIMP-2 альвеолоциты 1 типа и фибробласты (табл. 4, рис. 2).

Таблица 4

Уровень экспрессии TIMP-2
в экссудативную фазу ОРДС
(n=10, 100 полей зрения)

Примечание: те же, что к табл. 1.

Клетки	0 баллов (% полей зрения)	1-2 балла (% полей зрения)	3-4 балла (% полей зрения)	Значение различий между группами
нейтрофилы	13	77	10	
макрофаги	50	50	0	p=0,006*
эндотелий	40	60	0	p=0,41* p ₁ =0,60
фибробласты	70	30	0	p=0,000* p ₁ =0,19 p ₂ =0,04*
альвеолоциты 1 типа	90	10	0	p=0,000* p ₁ =0,002* p ₂ =0,000* p ₃ =0,11
альвеолоциты 2 типа	50	50	0	p=0,006* p ₁ =0,79 p ₂ =0,60 p ₃ =0,19 p ₄ =0,002*

При сравнении уровня экспрессии TIMP-2 каждым видом клеток в зависимости от стадии ОРДС оказалось, что динамика синтеза белка отмечается только в фибробластах: в пролиферативную фазу продукция ингибитора увеличивалась до 1-2 баллов в 53% полей зрения (p=0,05 при сопоставлении с предыдущей стадией), а в фибротическую она вновь снижалась до уровня экссудативной фазы. В остальных клетках степень экспрессии ингибитора протеиназот стадии синдрома не зависела.

Известно, что ОПЛ/ОРДС инициируется выраженной адгезией нейтрофилов к эндотелию сосудов малого круга кровообращения и инфильтрацией ими паренхимы легких[4]. В экссудативную стадию процесса (собственно ОПЛ) нами была зафиксирова-

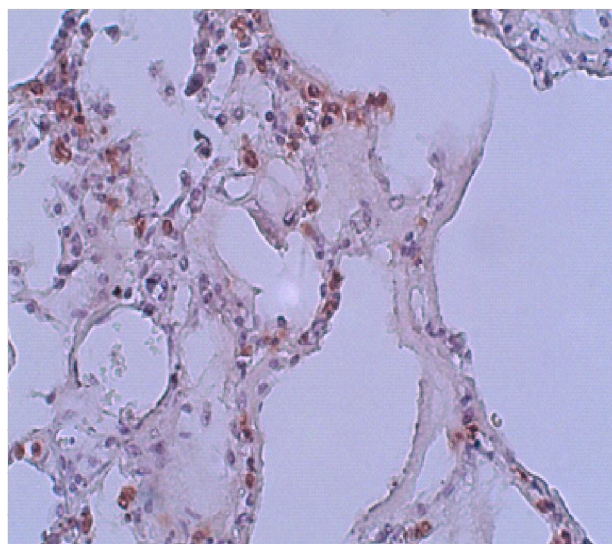


Рис. 1. Микрофото легочной паренхимы погибшего от вирусно-бактериальной пневмонии: острая (экссудативная) стадия ОРДС. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к ММР-2; хромоген - продукты реакции с диаминобензидином, фоновое докрасивание гематоксилином Гаррисона. Увел.х400.

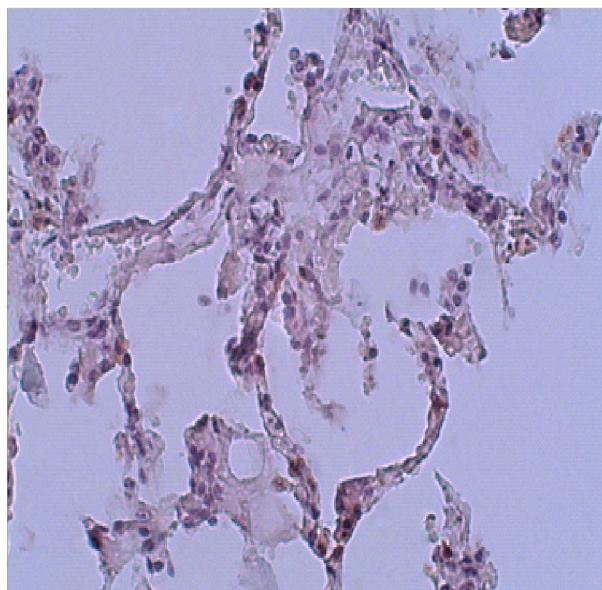


Рис. 2. Микрофото легочной паренхимы погибшего от вирусно-бактериальной пневмонии: острая (экссудативная) стадия ОРДС. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TIMP-2; хромоген - продукты реакции с диаминобензидином, фоновое докрасивание гематоксилином Гаррисона. Увел.х400

на наибольшая локальная экспрессия MMP-2, прежде всего за счет нейтрофилов и эндотелиоцитов (табл. 1, рис.1), на фоне менее выраженного синтеза TIMP-2. В итоге, вероятно, происходит смещение равновесия в системе "MMP-2 - TIMP-2" в сторону избыточного протеолиза не только в паренхиме легких, но и в сосудах микроциркуляторного русла. Указанные процессы вносят свой вклад как в повреждение аэрогематического барьера, так и развитие ДВС-синдрома, который часто наблюдался у этой категории погибших [3, 4].

Менее значимый перевес синтеза MMP-2 в пролиферативную стадию синдрома, возможно, поддерживает необходимое в этот момент умеренное повышение уровня протеазы в локусе воспаления. Есть данные, что MMP-2 при небольшом повышении концентрации активирует трансфор-

мирующий фактор роста β (TGF β) и параллельно разрушает важнейший провоспалительный цитокин IL-1 β [6, 9]. Следовательно, в эту стадию синдрома MMP-2 препятствует адгезии нейтрофилов к эндотелию и их гиперактивации (нивелируются свойства IL-1 β , разрушается фибронектин), а также опосредованно участвует в привлечении в очаг моноцитов крови (TGF β является их хемоаттрактантом). Сдвиг в системе в сторону TIMP-2 в 3 фазу ОРДС, безусловно, вносит свой вклад в развитие фибротических изменений в легких.

Заключение.

В каждую стадию развития ОРДС соотношение в системе "MMP-2 - TIMP-2" имеет свои особенности, внося вклад как в повреждение альвеоло-капиллярной мембраны, так и в развитие фиброза в исходе процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин А.А. Роль адгезии в активации нейтрофилов и цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием / А.А. Галкин, В.С. Демидова // Успехи современной биологии. - 2011. - Т.131, №1. - С.62-78.
2. Коган Е.А. Механизм ремоделирования легочной ткани при прогрессировании идиопатического легочного фиброза / Е.А. Коган, Ф.В. Тьюнг, С.А. Демура // Архив патологии. - 2010. - Т.72, №4. - С. 30-36.
3. Морфологическая характеристика поражения дыхательной системы при гриппе А/Н1N1 в Забайкальском крае / Н.Н. Чарторижская [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2011. - Т. 39. - С. 8-12.
4. Острый респираторный дистресс-синдром: практическое руководство / Под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля - М.: Литтера, 2007. - 232 с.
5. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. - 2010. - №5. - С. 7-17.
6. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких / Я.Н. Шойхет [и др.] // Проблемы клинической медицины. - 2008. - №3(15). - С. 99-101.
7. Экспрессия матриксных металлопротеиназ-2 и -9 при раке желудка: клинико-морфологические особенности / А.С. Зенюков [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. - 2010. - Т.21, №4. - С. 23-30.
8. Imatinibmesylate inhibits cell invasion of malignant peripheral nerve sheath tumor induced by platelet-derived growth factor-BB / M. Aoki [et al] // Laboratory Investigation. - 2007. - Vol.87. - P. 767-779.
9. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse [et al] // Circulation Res. - 2003. - №2. - P. 827-839.