

Плазменные маркеры деградации экстрацеллюлярного матрикса при внутриутробной герпетической инфекции

С. Н. БЕНИОВА^{1,2}, С. Ю. ФИГОЛЬ¹, О. А. КОРНИЛОВА²

Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины¹,
Тихоокеанский государственный медицинский университет², Владивосток, Россия

Проведено изучение динамики сывороточных уровней матриксных металлопротеиназ (ММП-8, ММП-9) и их тканевого ингибитора (ТИМП-1) у новорожденных детей с внутриутробной герпетической инфекцией в ранний неонатальный период. Было исследовано 38 детей, рожденных от матерей с хроническим течением герпетической инфекции (ГИ). Высокие концентрации плазменных матриксных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора у новорожденных с внутриутробной герпетической инфекцией свидетельствует об активации процессов разрушения внеклеточного матрикса и предшествуют реализации клинических проявлений инфекции. Увеличение уровня ММП-9 при сохранении стабильных или снижающихся значений ТИМП-1 отражает патогенетическую активность инфекционного процесса, сопровождающегося избыточным протеолизом.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы (ММП-8, ММП-9), тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ (ТИМП-1), герпетическая инфекция, новорожденные дети

Plasma Markers of Degradation of Extracellular Matrix with Intrauterine Herpes Infection

S. N. Beniova^{1,2}, S. Y. Figol¹, O. A. Kornilova²

Far Eastern Federal University, School of Biomedicine¹
Vladivostok State Medical University², Russian Federation

The study of the dynamics of serum levels of matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9) and tissue inhibitor (TIMP-1) in newborns with intrauterine herpes infection in the early neonatal period. It has been studied 38 children born to mothers with chronic herpes infections (HI). High concentrations of plasma matrix metalloproteinase and tissue inhibitor in infants with intrauterine herpes infection indicates the activation of the destruction of the extracellular matrix and is preceded by the implementation of the clinical manifestations of infection. Increased levels of MMP-9, while maintaining stable or decreasing values of TIMP-1 reflects the pathogenic activity of the infectious process, accompanied by excessive proteolysis.

Keywords: matrix metalloproteinases (MMP-8, MMP-9), tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1), herpes infection, newborn children

Контактная информация: Фиголь Сергей Юрьевич — зав. отделением реанимации и интенсивной терапии новорожденных, Приморский краевой перинатальный центр, г. Владивосток; 690011, г. Владивосток, ул. Можайская 16; sergeyfgl@rambler.ru

Figol Sergey — Head of the Department of Resuscitation and neonatal intensive care, Primorsky Regional Perinatal Center; Russian Federation, 690011, Vladivostok, st. Mozhayskaya 16; sergeyfgl@rambler.ru

УДК 616.9:578.825.11

Основной причиной мертворождаемости, преждевременных родов, младенческой смертности, заболеваемости новорожденных и ранней инвалидизации детей является внутриутробная инфекция. Доказано, что у 11—50% новорожденных из группы высокого инфекционного риска выявляется внутриутробное инфицирование вирусом простого герпеса (ВПГ), обуславливая до 45% перинатальных потерь [1, 2]. Неблагоприятные исходы перинатальной герпетической инфекции обусловлены рядом причин: поздней диагностикой инфекции, возможностью отсроченной реализации клиники при интранатальном заражении, отсутствием четкой взаимосвязи между клиническими проявлениями инфекции у матери и степенью поражения новорожденного ребенка и, как следствие, несвоевременным назначением этиотропной терапии [3].

В качестве маркеров выраженности воспалительной реакции и предикторов прогноза при различной патологии у новорожденных детей достаточно широко используются отдельные иммунологические и биохимические показатели [2—4]. Одним из перспективных направлений в разработке критериев объективизации тяжести и течения инфекционного процесса представляется изучение патогенетической значимости матриксных металлопротеиназ (ММП). Матриксные металлопротеиназы секретируются как проферменты различными нормальными или трансформированными клетками: нейтрофилами, моноцитами,

макрофагами, фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками и активируются путем протеолитического расщепления [5]. Активность ММП регулируется их специфическими тканевыми ингибиторами (ТИМП). Основная биологическая функция ММП заключается в деградации межклеточного матрикса, необходимой для протекания многих физиологических и патологических процессов: эмбриогенеза, воспаления, ремоделирования ткани и репарации, мобилизации матрикс-связанных факторов роста, разрушения гематоэнцефалитического барьера и лейкоцитарной инфильтрации [5, 6].

Роль плазменных маркеров деградации экстрацеллюлярного матрикса в патогенезе герпетической инфекции изучена недостаточно. Скланкиной Н.Н. с соавт. [6] в эксперименте получены данные, подтверждающие участие ММП в развитии герпетической инфекции. Авторы наблюдали увеличение спонтанной продукции проММП-1 эндотелиальными клетками, выделенными из вен пупочных канатиков, в течение 24—48 часов после инфицирования вирусом простого герпеса. Кроме того, в ряде исследований установлена роль матриксных металлопротеиназ в формировании патологии ЦНС у новорожденных [7], развитии внутриутробных пневмоний, бронхолегочной дисплазии, патологии пищеварительного тракта у новорожденных [8—10].

Вышеизложенное определило **цель** настоящего исследования: изучить динамику уровней ММП-8, ММП-9 и

ТИМП-1 в плазме новорожденных с внутриутробной герпетической инфекцией в ранний неонатальный период.

Материалы и методы исследования

Настоящее исследование проведено на базе КГБУЗ Владивостокский клинический родильный дом №2 (глав. врач — Курлеева Т.Ю.) в 2012–2014 гг. В основную группу были включены 38 детей, рожденных от матерей с хроническим течением герпетической инфекции (ГИ). Всем детям было проведено клиничко-биохимическое исследование согласно стандартам, верификация этиологического диагноза проводилась методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем для обнаружения специфических антител класса IgM и IgG к ВПГ 1-го и 2-го типов, а также методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Материалом для ПЦР-исследования у детей служили кровь, ликвор, отделяемое носоглотки, моча. Оценивали также уровень специфических антител и вирусной нагрузки в сыворотке крови матери. Исследование специфического иммунитета для определения активности инфекционного процесса у детей проводили повторно с интервалом в 1–2 недели.

У 27 детей (71,1%) клинические проявления внутриутробной ГИ выявлены при рождении. Новорожденные имели массу тела от 1050 до 2850 г (среднее значение 2120 ± 380 г), рост от 40 до 48 см, рождались с оценкой по шкале Апгар от 3 до 7 баллов, гестационный возраст составил $36,8 \pm 3,7$ нед. У всех детей была диагностирована генерализованная форма ГИ, которая проявлялась симптомами поражения нервной системы различной выраженности и степени тяжести (100%), у 4-х детей выявлены кисты в головном мозге, у 2-х — менингоэнцефалит, у 2-х зарегистрирован порок сердца (функционирующее овальное окно), у 2-х — неполный и тотальный ателектаз легких, у 8 — гепатоспленомегалия, у 6 — пневмония, у 2-х — врожденный везикулез. У 9 новорожденных регистрировали признаки задержки внутриутробного развития по гипотрофическому варианту I, II и III степени.

У 11 новорожденных (28,9%) клинических проявлений болезни при рождении не регистрировали, однако, на 3–5 день жизни выявлена клиника постнатальной ГИ. В 4-х случаях заболевание протекало в локализованной форме с преимущественным поражением кожи, слизистой оболочки носа и рта. У 7 детей зарегистрированы симптомы, характерные для генерализованной формы болезни: неврологические симптомы, у 6 детей признаки пневмонии, у 5 — гепатоспленомегалия, у 4-х детей — отечный синдром, у 2-х детей — пиелонефрит, у 1 ребенка — энтероколит.

В 12 случаях (31,6% от всех детей данной группы) заболевание было вызвано ВПГ 1-го типа, в 16 (42,1%) — ВПГ 2-го типа, у 4 детей (10,5%) выделены вирусы обоих типов.

Группу сравнения составили 20 детей, рожденных здоровыми матерями. Новорожденные рождались не менее 8 баллов по шкале Апгар на 1-й минуте и 9 баллов на 5-й минуте, масса тела в среднем в данной группе составляла 2900 ± 650 г, гестационный возраст $39,2 \pm 2,6$ нед.

Двукратное лабораторное исследование специфических маркеров ГИ у детей контрольной группы положительных результатов не выявило.

Определение содержания металлопротеиназы-9, металлопротеиназы-8 в сыворотке крови новорожденных проведено методом твердофазного ИФА с применением специфических реактивов «R&D Diagnostics Inc.» (USA). Обследование проводили двукратно: при рождении и на 5–7 сутки жизни. Кровь для исследования забирали сразу после рождения ребенка из катетеризированной пупочной вены в течение первого часа жизни и на 5–7 сутки из периферической вены.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых непараметрических методов с помощью программы MS Excel и лицензионной статистической программы Biostat. Достоверными считались различия между группами при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Известно, что герпесвирусы отличаются наибольшей тропностью к короткоживущим клеткам с высоким темпом обмена веществ, колонизируя клетки эпителия и слизистых оболочек, нервной системы, крови и лимфатических клеток [11, 12], что приводит к активной продукции провоспалительных цитокинов, биологически активных веществ и других химических агентов, являющихся факторами-промоторами индукции ММП [4, 13]. Кроме того, у ДНК-содержащих вирусов, к которым относится ВПГ, описан механизм кодирования гомологов ряда цитокинов, хемокинов и их рецепторов, играющих ключевую роль в иммунном ответе [11] и, возможно, самостоятельно влияющих на экспрессию ММП в ходе патологического процесса.

Уровни ММП-9 в плазме пуповинной крови у обследованных нами младенцев (табл. 1) были достоверно повышены у 88,9% новорожденных основной группы в сравнении с новорожденными группы сравнения. Необходимо отметить, что все новорожденные с постнатально развившейся клиникой ГИ (11 пациентов) имели высокие значения ММП-9 (выше 240 нг/мл) уже при рождении. В динамике при повторном обследовании детей с внутриутробной ГИ наблюдали нарастание уровня плазменной ММП-9, причем интенсивность прироста показателя положительно коррелировала с клиническими проявлениями болезни. Максимальные значения уровня ММП-9 с увеличением показателя в 1,5–2 раза в плазме крови были выявлены у детей с признаками менингоэнцефалита и кистозными поражениями ЦНС, что согласуется с ранее полученными данными о роли ММП-9 в патогенезе перинатальных поражений ЦНС у новорожденных детей [7, 10].

При исследовании уровня ММП-8 в плазме пуповинной крови у всех новорожденных опытной группы было выявлено достоверное превышение показателей, регистрируемых в контроле. В динамике при повторном обследовании детей основной группы наблюдали снижение уровня плазменной ММП-8 в сравнении с первым этапом

Таблица 1. Динамика уровней плазменных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора у новорожденных детей с внутриутробной герпетической инфекцией

Плазменные маркеры	Новорожденные с внутриутробной герпетической инфекцией (n = 38)	Здоровые новорожденные (n = 20)	Значимость межгрупповых различий, p
ММП-9, нг/мл — в плазме пуповинной крови — в плазме крови на 5—7 сутки жизни	338,5 ± 55,4 389,5 ± 58,4	190,3 ± 30,0 179,4 ± 39,7	< 0,01 < 0,001
ММП-8, нг/мл — в плазме пуповинной крови — в плазме крови на 5—7 сутки жизни	38,5 ± 15,4 20,5 ± 5,8	7,3 ± 2,0 9,5 ± 1,8	< 0,001 < 0,01
ТИМП-1, нг/мл — в плазме пуповинной крови — в плазме крови на 5—7 сутки жизни	316,4 ± 82,3 302,5 ± 59,4	237,1 ± 10,0 217,4 ± 9,0	< 0,05 < 0,05

исследования до $20,5 \pm 5,8$ нг/мл, но полученные результаты достоверно отличались от показателей группы сравнения ($p \leq 0,01$). Вероятно, динамика значений уровня матриксной металлопротеиназы-8 у новорожденных детей с внутриутробной ГИ сопряжена с ведущей ролью фагоцитов, являющихся одними из основных продуцентов ММП-8, на ранних этапах инфекционного процесса [4, 5, 14].

При анализе уровней ТИМП-1 у новорожденных с внутриутробной ГИ в пуповинной крови зарегистрировано достоверное превышение значений группы сравнения. Повторное исследование показателя на 5—7 день жизни выявило сходную динамику в сравниваемых группах, однако достоверного снижения маркера у детей основной группы не отмечено. Вместе с тем, необходимо отметить, что наиболее выраженное уменьшение уровня ТИМП-1 наблюдалось у детей с поздней клинической реализацией инфекции. Вероятно, это обусловлено снижением количества макрофагов и фибробластов, экспрессирующих ТИМП-1 и развитием воспалительных изменений в органах на ранних стадиях инфекционного заболевания [13], что согласуется с данными Аникиной А.Г. с соавт., выявившими, что у мышей, инфицированных вирусом гриппа, соотношение клеток, экспрессирующих ММП и ТИМП, изменяется на каждом сроке инфекционного процесса с наибольшим преобладанием ТИМП к 14-му дню заболевания [13].

Заключение

Таким образом, выявленное увеличение концентрации плазменных матричных металлопротеиназ и их тканевого ингибитора у новорожденных с внутриутробной герпетической инфекцией свидетельствует об активации процессов разрушения внеклеточного матрикса и предшествует реализации клинических проявлений инфекции. Увеличение уровня ММП-9 при сохранении стабильных или снижающихся значений ТИМП-1 отражает патогенетическую активность инфекционного процесса, сопровождающегося избыточным протеолизом. Подобные исследования у новорожденных немногочисленны, поэтому представляется необходимым и перспективным дальнейшее изучение взаимосвязей патогенетически значимых повреждающих и протективных факторов для обо-

снования развития новых стратегий терапии вирусиндуцированных нарушений.

Литература/References:

1. Санталова Г.В., Гасилина Е.С., Валеева Г.Р. и др. Оценка состояния здоровья детей, рожденных от герпес-инфицированных матерей // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013; 3: 1—20.
Santalova G.V., Gasilin E.S., Valeeva G.R., et al. [Assessment of health status of children born to mothers infected with herpes] // *Bulletin of Medical Internet Conferences*. 2013; 3: 1—20. (In Russ)
2. Кравченко Л.В. Клинико-патогенетические аспекты герпес вирусных инфекций у детей первых месяцев жизни: Автореферат дис. ... к.м.н. — Ростов-на-Дону, 2009. — 27 с.
Kravchenko L.V. [Clinico-pathogenetic aspects of herpesvirus infections in children during the first months of life]: Author's abstract dis. ... CMS. — Rostov-on-Don, 2009. — 27 p. (In Russ)
3. Косенкова Е.Г., Лысенко И.М. Критерии внутриутробного инфицирования новорожденного // Охрана материнства и детства. 2014; 1(23): 35—40.
Kosenkova E.G., Lysenko I.M. [Criteria of intrauterine infection of the newborn] // *Protection of Motherhood and Childhood*. 2014; 1(23): 35—40. (In Russ)
4. Зайцева О.В. Инфекция и иммунитет: актуальные вопросы в практике педиатра // Детские инфекции. 2015; 14(1): 36—43.
Zaitseva O.V. [Infection and Immunity: Current issues in pediatric practice] // *Childrens Infections*. 2015; 14(1): 36—43. (In Russ)
5. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. 2010; 5: 7—17.
Poteryaeva O.N. [Matrix metalloproteinases: structure, regulation, role in the development of pathological conditions (review)] // *Health and Education in Siberia*. 2010; 5: 7—17. (In Russ)
6. Скланкина Н.Н., Болдырева Н.В., Бабаянц А.А., Фролова И.С., Беляев Д.Л., Портнова Ю.А., Щегловитова О.Н. Продукция проММП-1 культивируемыми клетками сосудистого эндотелия *in vitro* и в организме человека // Инфекция и иммунитет. 2011; 1(3): 271—274.
Sklyankina N.N., Boldyreva N.V., Babayants A.A., Frolova I.S., Belyaev D.L., Portnova Y.A., Shcheglovitova O.N. [ProMMP-1 production by cultured vascular endothelial cells *in vitro* and in humans] // *Infection and Immunity*. 2011; 1(3): 271—274. (In Russ)
7. Ремнева О.В., Фадеева Н.И., Кореновский Ю.В., Черкасова Т.М. Прогнозирование и ранняя диагностика тяжелых церебральных расстройств у недоношенных новорожденных // Педиатрия. 2015; 1: 13—18.
Remneva O.V., Fadeyeva N.I., Korenevskiy Y.V., Cherkasova T.M.

- [Forecasting and early diagnosis of severe cerebral disorders in preterm infants] // *Pediatrics*. 2015; 1: 13–18. (In Russ)
8. Давыдова И.В., Яцык Г.В., Бершова Т.В., и др. Матриксные металлопротеиназы как биомаркеры формирования бронхолегочной дисплазии у детей // *Пульмонология*. 2009; 4: 80–84. Davydova I.V., Yatsyk G.V., Berhova T.V., et al. [Matrix metalloproteinases biomarkers formation of bronchopulmonary dysplasia in children] // *Pulmonology*. 2009; 4: 80–84. (In Russ)
 9. Хворостов И.Н., Дамиров О.Н., Смирнов И.Е., и др. Кальпротектин и матриксные металлопротеиназы при язвенно-некротическом энтероколите у новорожденных детей // *Российский педиатрический журнал*. 2013; 6: 37–44. Khvorostov I.N., Damirov O.N., Smirnov I.E., et al. [Calprotectin and matrix metalloproteinases in the necrotizing enterocolitis in newborn infants.] // *Russian Journal of Pediatrics*. 2013; 6: 37–44. (In Russ)
 10. Yang Y., Hill J.W., Rosenberg G.A. [Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders] // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 99: 241–263.
 11. Собчак Д.М., Волский Н.Е., Свинцова Т.А., и др. Иммунная система человека и особенности патогенеза герпетической инфекции (обзор) // *Современные технологии в медицине*. 2014; 6(3): 118–127. Sobchak D.M., Volsky N.E., Svintcova T.A., et al. [The human immune system and especially the pathogenesis of herpes infection (Review)] // *Modern Technologies in Medicine*. 2014; 6(3): 118–127. (In Russ)
 12. Bostikova V., Salavec M., Smetana J., Sleha R., Coufalova M., Splina M., Bostik P. [Infections caused by human alpha herpes viruses] // *Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 2014; 63(3): 205–212.
 13. Аникина А.Г., Потапова О.В., Шкурупий В.А., Шаповалов А.М. Роль матриксных металлопротеиназ и их ингибитора в развитии раннего фиброза легких при гриппе А/Н5N1 А/Goose/Krasnoozersoye/627/05 у мышей // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(7): 17–20. Anikina A.G., Potapova O.V., Shkurupiy V.A., Shapovalov A.M. [The role of matrix metalloproteinase and their inhibitors in the development of early lung fibrosis in influenza A / H5N1 A / Goose / Krasnoozersoye / 627/05 in mice] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 156(7): 17–20. (In Russ)
 14. Paim L.R., Schreiber R., Matos-Soura J.R., Silva A.A., Campos L.F., Azevedo E.R. [Oxidized low-density lipoprotein, matrix-metalloproteinase-8 and cecotid atherosclerosis in spinal cord injured subjects] // *Atherosclerosis*. 2013; 231(2): 341–345.

Изменение структуры хромосом лимфоцитов при персистирующих инфекциях у детей

В. С. СЕВРЮКОВА¹, Е. О. ХАЛТУРИНА², П. Е. ДОБРЯКОВ¹, В. С. КОЖЕВНИКОВ¹

АО «ДиЛУЧ» Санаторно-курортный комплекс¹, Анапа,

ГБОУ ВПО Первый московский медицинский университет им. И.А. Сеченова², Москва, РФ

Дети с хроническими заболеваниями респираторного тракта были обследованы на наличие IgM и IgG антител в сыворотке крови против вирусов (Herpes simplex, Epstein-Barr, Cytomegalovirus) и бактерий (*Chlamydia trachomatis* + *pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) методом ELISA. Параллельно определяли длину теломер лимфоцитов периферической крови с помощью гибридизации *in situ* и проточной цитометрии (FlowFISH) с целью сравнения длины теломер у серопозитивных и серонегативных пациентов. Применение регрессионного анализа и анализа альтернативных признаков (в процентах) позволило нивелировать возрастные отличия серопозитивной и серонегативной групп и установить, что теломеры лимфоцитов детей, имеющих антитела против вирусов в различных сочетаниях, в том числе в сочетаниях с антителами против бактерий, короче теломер лимфоцитов серонегативных детей того же возраста.

Ключевые слова: теломеры, лимфоциты, вирусные инфекции, дети

Changes in the Structure of the Chromosomes of Lymphocytes during Persistent Infection in Children

V. S. Sevryukova¹, E. O. Khalturina², P. E. Dobryakov¹, V. S. Kozhevnikov¹

The Joint Stock Company «DiLUCH» Health Resort Complex¹, Anapa,

First Moscow State Medical University after I.M. Sechenov², Moscow, Russia

Children with chronic diseases of respiratory tract were investigated for IgM and IgG serum antibodies to viruses (Herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus) and bacteria (*Chlamydia trachomatis* + *pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) by ELISA and for telomere length of their lymphocytes by fluorescent hybridization *in situ* followed by flow cytometry (FlowFISH). The purpose of the study was to compare the lymphocyte telomere length of these seropositive and seronegative children. Regression analysis and analysis of percent distribution relative to the regression line have compensated age differences between seropositive and seronegative groups and demonstrated shorter telomeres in lymphocytes of children those have serum antibodies to viruses in all combinations (including combinations with antibodies to bacteria) in contrast to seronegative children of the same age.

Keywords: telomeres, lymphocytes, viral infections, children

Контактная информация: Кожевников Владимир Сергеевич - д.м.н., профессор, консультант клинико-иммунологической лаборатории, АО «ДиЛУЧ» Санаторно-курортный комплекс; 353440, Краснодарский край, г-к Анапа, улица Пушкина, 22; 8(861)335-09-78; kvsiki@mail.ru
Kozhevnikov Vladimir, Ph.D., professor, consultant at laboratory of clinical immunology, The Joint Stock Company «DiLUCH» Health Resort Complex; 353440, Krasnodarskyi Krai, g-k Anapa, 22 Pushkina str.; kvsiki@mail.ru

УДК 616.9-005

Каждое деление соматической клетки сопровождается укорочением ДНК, входящей в состав концевых

структур хромосом — теломер [1]. Потеря части теломерной ДНК проявляется, в частности, тем, что с воз-